

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INMUNOTERAPIA CON FACTOR DE TRANSFERENCIA
EN PACIENTES CON COCCIDIOIDOMICOSIS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PERESENTA

Q.B.P. ADRIANA MARIA CAVAZOS CAVAZOS

Monterrey, N.L.

Diciembre 1989

TM

Z532

FCB

1989

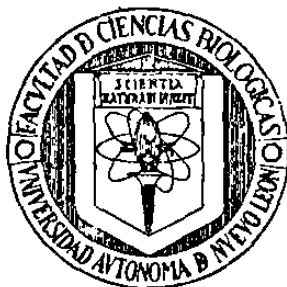
C3



1020066507

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INMUNOTERAPIA CON FACTOR DE TRANSFERENCIA
EN PACIENTES CON COCCIDIOIDOMICOSIS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PERESENTA

Q.B.P. ADRIANA MARIA CAVAZOS CAVAZOS

Monterrey, N.L.

Diciembre 1989

25320
FCB
1989
C3



16187L

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INMUNOTERAPIA CON FACTOR DE TRANSFERENCIA
EN PACIENTES CON COCCIDIOIDOMICOSIS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

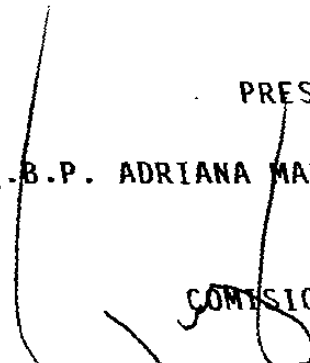
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PRESENTA

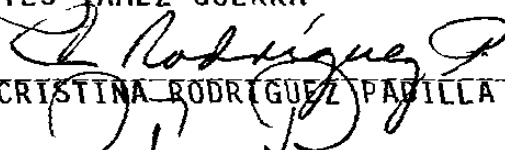
Q.B.P. ADRIANA MARIA CAVAZOS CAVAZOS

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE:


~~DR. REYES TAMEZ GUERRA~~

SECRETARIO:


~~Dra. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA~~

VOCAL:


~~DR. RICARDO FUENTES PENSAMIENTO~~

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., en el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario, U.A.N.L. y en el Departamento de Patología del Hospital de Altas Especialidades del Noreste N.25, I.M.S.S.

GRACIAS A DIOS

Por darme la luz para encontrar el camino
por brindarme la paciencia y tranquilidad
para poder cruzar todos los obstáculos.
Agradezco la dicha de disfrutar este andar,
en compañía de personas tan maravillosas
que me rodearon y me rodean
brindandome siempre su apoyo
para lograr llegar al final de está etapa.

INDICE

ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	
NATURALEZA Y ACTIVIDADES	3
MECANISMO DE ACCION	12
USO CLINICO	14
HIPOTESIS	17
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	
PACIENTES	19
DISEÑO EXPERIMENTAL	19
PREPARACION DEL FT	20
POTENCIA DEL FTe	21
APLICACION DEL FTe	22
PERFIL INMUNOLOGICO	
Intradermorreacciones	22
Determinación de LT	22
Determinación de LB	23

Determinación de CH	24
50	
Capacidad fagocítica	24
Determinación de IL-2	25
Factor inhibidor de la migración de leucocitos	26
Quantificación de Inmunoglobulinas	27
Evaluación Bacteriológica	28
Evaluación Clínica	28
RESULTADOS	29
TABLAS	33
FIGURAS	54
DISCUSION Y CONCLUSIONES	63
APENDICE	65
SOLUCION DE ALSEVER'S	66
SOLUCION DE HANK'S	67
REGULADOR DE SALINA TRIETANOLAMINA	68
NITRO-AZUL DE TETRAZOLIO	69
AMORTIGUADOR DE LAVADO (PBS-Tween)	70
BIBLIOGRAFIA	71

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
°C	Grado centigrado
C ₃	Componente 3 del complemento
C ₄	Componente 4 del complemento
CH50	Complemento hemolítico al 50%
Cocci	Coccidioidina
Con A	Concanavalina A
DNA	Acido desoxirribonucleico
ELD	Extracto de leucocitos dializado
ELISA	Ensayo de inmunabsorción enzimática
FI	Factor inductor
FIL	Factor inhibidor de la migración de leucocitos
FIM	Factor inhibidor de migración
FS	Factor supresor
FT	Factor de transferencia
FTd	Factor de transferencia dializado
FTe	Factor de transferencia específico
µg	Microgramos
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HT	Hipersensibilidad tardía
IDR	Intradérmica reacción

IL-2	Interleucina - 2
ILM	Ensayo de inhibición de la migración de leucocitos
l	Litros
ul	Microlitros
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
M	Molar
um	Micras
MEMD	Medio esencial minimo modificado por Dulbecco
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
N	Normal
NET	Nitro-azul de tetrazoilo
nm	Nanómetros
PHA	Fitoheماغلوتينina
PPD	Derivado protéico purificado de tuberculina
rpm	Revoluciones por minuto
Tb	Tuberculosis

TEP	Tuberculosis pulmonar
Tc	Linfocito T cooperador
Ts	Linfocito T supresor
U	Unidades
Var	Varidasa

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades del Factor de Transferencia	34
Tabla 2	Factor Inductor	35
Tabla 3	Factor Supresor	36
Tabla 4	Perfil Inmunológico	37
Tabla 5	Aplicaciones del Factor de Transferencia	38
Tabla 6	Porcentaje de Linfocitos T	39
Tabla 7	Intradermorreacciones a PPD	40
Tabla 8	Intradermorreacciones a Var	41
Tabla 9	Intradermorreacciones a Cocci	42
Tabla 10	Porcentaje de LIF a PPD	43
Tabla 11	Porcentaje de LIF a Var	44
Tabla 12	Porcentaje de LIF a Cocci	45

Tabla 13	Porcentaje de Linfocitos B	46
Tabla 14	Determinación de IgA en suero	47
Tabla 15	Determinación de IgG en suero	48
Tabla 16	Determinación de IgM en suero	49
Tabla 17	Capacidad fagocítica	50
Tabla 18	Complemento hemolítico al 50%	51
Tabla 19	Determinación de C ₃ en suero	52
Tabla 20	Determinación de C ₄ en suero	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo Estructural de la Molécula de FT	55
Figura 2	Modelos Estructurales de las fracciones del FT	56
Figura 3	Análisis cualitativo del dializado de leucocitos	57
Figura 4	Obtención de los factores inductor y supresor	58
Figura 5	Determinación de IL-2 en pacientes tratados con FT	59
Figura 6	Determinación de IL-2 en pacientes control	60
Figura 7	Estudio Bacteriológico en pacientes tratados con FT	61
Figura 8	Estudio Bacteriológico en pacientes control	62

RESUMEN

Con objeto de evaluar el FT como inmunoterapia conjunta al tratamiento antifímico en pacientes con Tb pulmonar (TbP), se realizó un estudio de doble ciego en un grupo de 26 pacientes, el cual por elección al azar se dividió en dos grupos: uno de 17 pacientes a los cuales se les administró 10 dosis de FT y otro grupo de 9 pacientes "control" a los cuales se les administró las mismas dosis placebo (solución salina fisiológica). Antes de aplicar el FT específico (FTE) de cada paciente se probó la potencia del mismo para modificar la respuesta celular in vivo por medio de una intradermorreacción (IDR) y/o in vitro por medio de la prueba de Factor inhibidor de la migración de leucocitos (FIL).

Se valoró el estado inmunológico clínico y bacteriológico de los pacientes antes, durante y después del tratamiento.

El perfil inmunológico comprendió: Población total de linfocitos T y linfocitos B, concentración de inmunoglobulinas séricas IgA, IgG e IgM, concentración de complemento hemolítico al 50% y de sus componentes C₃ y C₄, IDR y FIL a tres antígenos (Ag): Derivado Protéico Purificado de Tuberculina (PPD), Varidasa (Var) y Coccidioidina (Cocci), capacidad fagocítica y capacidad de producción de interleucina-2 (IL-2).

El perfil clínico de los pacientes comprendió la evaluación de los siguientes parámetros: tos, hemoptisis, síntomas generales junto con una curva ponderal.

La evaluación bacteriológica consistió en la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes.

Se observó que en general los pacientes que recibieron la terapia combinada con FT mejoraron desde el punto de vista clínico y bacteriológico en comparación con los que recibieron placebo y terapia convencional solamente. Respecto a los parámetros inmunológicos no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, a excepción de la capacidad de producción de IL-2 la cual aumentó en forma considerable después del tratamiento en aquellos pacientes tratados con FT.

Se concluye que el tratamiento combinado proporciona mejores resultados que el tratamiento convencional y se propone que en estudios posteriores se incremente el número de dosis de FT con el propósito de obtener mejores resultados.

INTRODUCCION

Las altas tasas de morbilidad y mortalidad en tuberculosis (Tb) indican que sigue siendo una de las enfermedades crónicas más importantes de salud pública en el mundo.

En 1986 la Organización Mundial de la Salud reportó, de 8 a 10 millones de personas con diagnóstico nuevo de Tb; mientras que en los Estados Unidos de Norteamérica, se reportaron cerca de 23,000 casos nuevos de Tb, lo que representó un 2.6% de incremento respecto al año anterior.

En México en 1985 el número de casos notificados por el Sector Salud fué de 18,023, lo cual representó una tasa de 22.6 por cada 100,000 habitantes. Este mismo año en el estado de Nuevo León el Instituto Mexicano del Seguro Social reportó durante el periodo de enero a agosto 0.27 casos de Tb por cada 10,000 detecciones hospitalarias (1). En el primer semestre de 1988 también en el estado de Nuevo León la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), reporta un promedio de 4 nuevos casos de Tb pulmonar por semana (2)

La Tb es una enfermedad de difícil control debido a las características particulares del bacilo tuberculoso, a pesar de que en la actualidad se cuenta con medicamentos altamente efectivos para su manejo. En este padecimiento el estado inmunológico del individuo es de vital importancia, ya que el paciente con Tb presenta una alteración en su respuesta inmune de tipo celular, lo que probablemente se relaciona con la alta incidencia de fallas terapéuticas.

En base a lo anterior y con la idea de mejorar la respuesta inmune con ayuda de inmunomoduladores como apoyo a los fármacos antifímicos convencionales se utilizó Factor de Transferencia (FT) en pacientes con Tb pulmonar.

ANTECEDENTES

NATURALEZA Y ACTIVIDADES DEL FT

La definición funcional del FT incluye la capacidad de transferir inmunidad celular medida por Hipersensibilidad Tardía (HT) de un individuo sensible a otro receptor no sensible.

Landstainer y Chase en 1940 (3) fueron los primeros que transfirieron hipersensibilidad tardía (HT) a cobayos no sensibles utilizando leucocitos viables de cobayos sensibles a tuberculina.

Lawrence en 1949 (4) fué el primero en transferir HT en humanos por medio de la transferencia de leucocitos viables obtenidos de donadores sensibles. Posteriormente modificó su ensayo y en 1955 (5) transfirió HT a individuos no sensibles utilizando extractos de células de donadores sensibles a la tuberculina y a la sustancia M estreptocócica. A partir de 1956 Lawrence y Papenheimer (6) denominaron "Factor de transferencia" (FT) a la sustancia contenida en el extracto de leucitos dializado (ELD), cuya actividad biológica era la responsable de la transferencia de la HT.

Baram y col. (7) en un intento de aislar la fracción responsable de la transferencia pasiva de la HT, fraccionaron leucocitos de sangre periférica de humanos altamente sensibles y no sensibles a el derivado protéico purificado de Mycobacterium tuberculosis (PPD). Por cromatografía en DEAE celulosa separaron diferentes fracciones y para cada una se probó la capacidad de transferir HT. En sus resultados observaron que entre las células de donadores no sensibles y sensibles al antígeno no existían diferencias en el número de componentes, ni en su capacidad de

migración, y el único componente común en todas las fracciones se determinó como una proteína parecida a la de las gamma-globulinas por medio de una inmunoelectroforesis.

En los intentos por obtener un modelo de evaluación de la actividad del FT varios grupos de investigadores emplearon ensayos de inducción en linfocitos. Dentro de éstos se encuentra el grupo de Asher y col. (8) quienes midieron la incorporación de timidina en la proliferación de linfocitos no inmunes tratados con FT como método in vitro para correlacionarlo con la actividad in vivo. Observaron que el ELD que contenía el FT obtenido a partir de donadores sensibles in vivo, incrementó la proliferación de linfocitos no inmunes al antígeno relacionado en un rango de 2 a 25 veces más que los controles tratados solamente con el antígeno (Ag).

Eichber y col. observaron que el FT obtenido de donadores inmunes induce inmunidad celular in vivo e in vitro en primates libres de gérmenes (9).

Burger y col. realizaron estudios sobre la transferencia de la respuesta inmune específica obteniendo FT de un mismo grupo de donadores antes y después de sensibilizarlos a Hemocianina (KLH), y observaron que el FT preparado después de la sensibilización fue capaz de transferir esta respuesta (10).

Kirkpatrick y col. (11) realizaron transferencias seriadas específicas utilizando FT obtenido a partir de un paciente restablecido de candidiasis mucocutánea quien a su vez había recibido FTe. Este FTe demostró tener capacidad para sensibilizar pasivamente a otros dos individuos.

Posteriormente en 1974 Gallin y Kirkpatrick (12) utilizando cromatografía en Sephadex G-25 analizaron las diferentes fracciones de el FTe, encontrando que la fracción II tenía una actividad quimotáctica, con actividad débil para monocitos y granulocitos, la cual pierde su potencia por almacenamiento durante 2 semanas a 4°C o con calentamiento a 56°C por 30 min. Neidhart y col. (13) estudiaron más ampliamente esta fracción II, y determinaron que era la fracción responsable de la actividad en la transferencia de la reactividad a KLH en el hombre, y reportaron que contenía hipoxantina. Estos mismos autores mediante un ensayo de transferencia local y sistémica de tuberculina determinaron en la fracción IV la más alta actividad biológica in vivo.

Otra de las estrategias utilizadas para estudiar el FTe fue la utilización de un modelo animal que facilitara las preparaciones de FTe. Así tenemos que Welch y col. en 1975 (14) mediante la administración de FTe obtenido a partir de humanos inmunes a PPD y varidasa (SK-SD) transfirieron la reactividad de HT hacia estos antígenos en cobayos.

Wilson y col. (15) utilizando Sephadex G-25 obtuvieron una fracción responsable de transferir HT en cobayos estimulados y la denominaron "TFg", esta fracción fue similar a la fracción "TFc" obtenida por Zuckerman y col. (16, 17). En el análisis cromatográfico de la fracción Tfg se encontró dos subfracciones responsables de la actividad: "Tx" y "Tfg1" siendo sus principales componentes la hipoxantina y el uracilo. Sin embargo se demostró contrario a otros trabajos (N-2)

que la hipoxantina no juega un papel directo en la transferencia de HT pero si tiene efecto en la producción de FIL. La fracción Tx por otro lado mostró ambas actividades biológicas (18).

Gottlieb (19) separó los componentes del Factor de transferencia humano (TFh). Aproximadamente el 85% de los polipéptidos los recuperaba mediante una membrana de diálisis de 3,500 Da, en este mismo trabajo demostró que los polipéptidos producían una reacción dérmica la cual involucraba elementos de sensibilidad inmediata y tardía.

Miyagawa y col. en 1978 (20) utilizaron células de pacientes con leucemias linfoblásticas y con inmunodeficiencias celulares, y demostraron que el FT induce en los linfocitos no inmunes de estos pacientes la producción de FIL en presencia de PPD.

Krohn y col. (21) demostraron que la actividad de conversión de las pruebas dérmicas se encuentra en una fracción que contiene cromóforos, los cuales muestran absorbancia máxima a 260 nm.

Kirkpatrick y col. (18, 22) denominaron fracción IIIa a la fracción responsable de la transferencia dérmica. Esta fracción eluye tiene un punto isoelectrico de 1.6 y cuando se somete a cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se obtienen múltiples regiones cromofóricas; encontrando el 90% de la reactividad del FT en la región denominada "R1a" (22).

Lawrence y col. (5) mediante diálisis múltiple calcularon el peso molecular del FT, entre 3,500 y 12,000 Da probablemente no mayor de 4,000 Da. Observaron también que el FT es resistente a ribonucleasa,

desoxirribonucleasa y tripsina por lo que reportan que no es una proteína o ácido nucleico convencional, además es resistente a acetona, alcohol y urea 6M (5, 23).

Burger y col. (24) examinaron la estructura polipeptídica del FT, utilizando peptidasas específicas terminales: carboxipeptidasa A, específica para el extremo carboxilo terminal la cual destruyó la actividad del FT, también utilizaron la leucina amino peptidasa, específica para el extremo amino terminal y ésta última no alteró la actividad del FT.

La configuración molecular exacta no se ha identificado, sin embargo Burger y col. (22, 25) propusieron un modelo que contiene inosina o IMP (5' - fosfato mononucleótido), ribosa, un grupo fosfodiéster y una cadena polipeptídica (Fig. 1).

Por otro lado Fudenberg y col. (22, 26 y 25) estudiaron las fracciones del DLE precipitadas con solventes orgánicos, obtuvieron la fracción activa denominandola IVb. Esta fracción fue sometida a cromatografía HPLC obteniendo las subfracciones HPLC-Pk5 y HPLC-Pk7 con un tamaño de 1,000 a 2,000 Da cada una, en base a estos resultados y los obtenidos mediante procesamientos enzimáticos proponen dos modelos estructurales para los componentes del FT denominandolos "FT-H5 y FT-H7" (Fig. 2).

Lawrence y Borkowsky en 1981 (27, 28) encontraron en el ELD dos actividades específicas de Ag; una que tiene función cooperadora-inductora denominada "Factor Inductor" y otra que tiene función supresora denominada "Factor Supresor".

estos datos concluyeron que el FI es un producto de células Tc el cual se une selectivamente a células Ts y a macrófagos (28). Posteriormente con objeto de caracterizar el FI, utilizaron anticuerpos monoclonales anti-región variable pesada de inmunoglobulina (VH), anti-región variable kappa de inmunoglobulina VK, anti-región variable lambda de inmunoglobulina VL, anti-región antígeno I (Ia) del complejo principal de histocompatibilidad humano (HLA) y anti-región $\beta - 2$ microglobulina humana como inmunoabsorbentes para el ELD y probaron los eluidos en la prueba de IML y encontraron que la actividad del FI desaparece del eluido cuando se absorbe con anticuerpos anti-región VH y anti-Ia humano, sin embargo, esta actividad no se altera con anticuerpos anti - $\beta - 2$ microglobulina. Con todo esto concluyeron que el FI expresa determinantes de la región VH, probablemente de la región Ia, pero no de la $\beta - 2$ microglobulina. En base a esto sugirieron que el FI puede ser un fragmento proteolítico dializable de un receptor de Ag que confiere reactividad inmune a poblaciones de células T no inmunes en virtud de su capacidad de unión al Ag; sugieren además que está involucrada en un proceso regulatorio por su actividad de unión selectiva a células T supresoras (Ts) y macrófagos (28).

El Factor Supresor (FS) específico de Ag que tiene un peso molecular entre 3,500 y 12,000 Da se encuentra en el dializado proveniente de poblaciones de linfocitos no purificados (29). Este dializado contiene también actividad supresora no específica de Ag que puede ser separada mediante diálisis quedando ésta en el dializado de menos de 3,500 Da (28). Al probar la actividad del FS en poblaciones de células no inmunes por IML, no se detectó la inhibición en ausencia del FT; el FS no se une

al Ag específico pero si al anticuerpo específico. Esto se observó cuando eliminaron el FS específico de Ag del dializado mediante anticuerpos específicos, y se comprobó cuando este anticuerpo inmuoabsorbente se absorbía previamente con el Ag relacionado y luego se usaba como inmuoabsorbente del dializado y no había disminución del FS en el eluido (27). Además el FS que se une al anticuerpo, se puede recuperar por tratamiento con glicina-HCl y su actividad es comparable a la de preparaciones de dializado crudo en la prueba de IML (Fig. 3 y 4).

Para rastrear el origen celular del FS, los mismos autores separaron poblaciones celulares de Tc y Ts usando anticuerpos (Acs) monoclonales y observaron que el dializado preparado de las células Ts contenía la actividad supresora en la prueba de IML. En sus estudios de absorción del dializado que contiene FS con poblaciones de células purificadas observaron que el FS era absorbido completamente por células Tc y macrófagos pero no por células Ts ni polimorfonucleares. Para determinar la existencia de determinantes de la región V, de la región Ia sobre el FS, usaron Acs inmuoabsorbentes anti-región Ia y observaron que el FS se une a anti-VK y a anti-VH pero no a anti- β -2 microglobulina, concluyendo que el FS expresa un determinante de la región V, probablemente de la región Ia, pero no de el determinante β - 2 microglobulina (28). Cuando trataron células inmunes primero con FS y luego con Ag observaron que la respuesta al antígeno se abatía en una IML, en cambio si las células inmunes se trataban primero con el antígeno y luego con el FS entonces no ocurría alteración de la respuesta, sin embargo, si las células inmunes se trataban con el FS y con el Ag al mismo tiempo entonces la respuesta se

suprimida parcialmente. Con este sistema sugirieron que el FS compite con el Ag específico por el sitio de unión al Ag en las células Tc inmunes (27).

Por otro lado Lawrence y Borkowsky (25) en coordinación con Burger (1983) demostraron que podían restaurar la actividad de las fracciones de FI dializable que inicialmente no presentaban actividad en un ensayo de IML, al remover un inhibidor de la actividad de FI; parecido al FS el inhibidor se une a inmunoabsorbentes preparados con Acs específicos, pudiendo ser recuperado con glicina-HCl. Se cree que este inhibidor de la actividad del FI y el FS específico son dos cosas diferentes, sin embargo la identidad de este inhibidor es aún desconocida. Con todos los estudios anteriores Lawrence y Borkowsky (1983) concluyeron que el FS disminuye la respuesta de las células inmunes a los antígenos relacionados (25).

En las Tablas 1, 2 y 3 se resumen las propiedades de el Factor de Transferencia, el Factor Inductor y el Factor Supresor.

MECANISMO DE ACCION

El mecanismo de acción exacto de el FT en el sistema inmune no se conoce sin embargo se han propuesto varios modelos:

En 1974 Burnet y col. sugieren que el FT funciona como una molécula que aumenta la sensibilidad antigénica de células potencialmente respondedoras. Proponen un modelo de efecto en cascada, postulando que la membrana citoplasmática de las células T posee receptores para determinantes antigénicos y para FTe. La activación de las células mediante la interacción entre el antígeno y su receptor estimula la producción y liberación de linfocinas y FTe; las moléculas de el FT así liberadas interactúan con los receptores de otras células que responden potencialmente al antígeno y aumentan de esta forma la respuesta al mismo (32).

Kirkpatrick en 1975 (18) sugirió que el FT contiene una información instructora que genera en las células que no responden, la capacidad para responder a ciertos antígenos, también propone un modelo en el que el FT funciona amplificando o desenmascarando la respuesta de células previamente sensibilizadas. Hamblin y col. (1975, 1976), han reportado otro posible modo de acción, en el que el FT actúa como un expansor clonal y que además aumenta la proliferación de cualquier clona de linfocitos que responda pobremente.

Lawrence y Borkowsky (27, 28), postularon que la actividad específica de antígeno en el ELD es la de aumentar y armar subpoblaciones de células T directa o indirectamente a través de macrófagos con una estructura específica, la cual se une al antígeno ya que la actividad

específica de antígeno: a) Convierte células no inmunes a un estado de reactividad al antígeno con un patrón dependiente de la dosis; b) La actividad se puede absorber pasándola a través de los Ac monoclonales purificados.

En base a lo anterior sugieren que la actividad específica de antígeno puede ser un fragmento dializable de un sitio receptor de células T inmunes o bien la porción de un producto del gene de la región V o quizá un producto único del gene de la región Ir que presenta el antígeno a otras células.

Wilson y col. en 1982 (25, 33) proponen un mecanismo de acción del FT humano basándose en los datos obtenidos del FT liberado por el antígeno específico para tuberculina: a) Cuando los linfocitos inmunes se incuban con el antígeno liberan sólo FT-H5 desfosforilado, este aparentemente es derivado de la superficie celular y es liberado no específicamente por linfocitos incubados por periodos prolongados a 37°C como parte de un proceso de cambio normal de los constituyentes de membrana; b) El FT-H5 defosforilado parece ser la estructura del FT actual, la cual lleva parte del receptor específico del antígeno de las células T, éste aparentemente es derivado de un precursor de FT-H5 el cual es modificado por fosfodiesterasas y nucleasas (por eso la diferencia en su estructura); c) El papel de FT-H7 es producir la respuesta de linfocitos al antígeno. También suponen que el FT-H7 no es liberado normalmente por la célula, sino que es un componente intracelular cuya posible función es la de actuar como regulador genético además de estar involucrado en la síntesis de FT-H5.

USO CLINICO

Fue en 1970 que Levin y col. (34) iniciaron la inmunoterapia con FT particularmente en pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich. Su aplicación se extendió a otras inmunodeficiencias tales como Ataxia-Talagictacia. Hipogammaglobulinemia variable e inmunodeficiencia combinada (35).

En enfermedades malignas también se ha reportado la utilización de FT con buenas perspectivas, por ejemplo en osteosarcoma, en donde una vez diagnosticado el paciente, el período de sobrevivencia es de 1 a 2 años, y se ha demostrado que aplicando el FT como inmunomodulador adjunto al tratamiento ortodoxo se ha logrado aumentar la vida de los pacientes (37).

También se ha reportado la utilización de el FT en algunas enfermedades virales por ejemplo, en hepatitis activa y crónica como inmunoproláctico (36), en herpes simple (38) e incluso en herpes zoster oftalmológico, donde se observó remisión a las 6 h después de su aplicación (39).

Con respecto a las enfermedades infecciosas se han observado resultados muy satisfactorios. Se ha aplicado en candidiasis mucocutánea (40), coccidioidomicosis (41), coccidioidomicosis crónica anérgica (42) y toxoplasmosis (43); dentro de las enfermedades micobacterianas se ha utilizado en lepra lepromatosa (44) y tuberculosis.

La respuesta inmunológica a la infección tuberculosa involucra todo el sistema, sin embargo, la más importante es la respuesta celular

principalmente los linfocitos T. El papel de los linfocitos B no es muy claro. no obstante se ha reportado que los pacientes con Tb tienen niveles elevados de Acs contra Ags diferentes a los de las micobacterias (45, 46). Los linfocitos T tienen un papel primordial en esta respuesta los linfocitos T cooperadores interactúan con el bacilo o con sus antígenos y provocan la liberación de mediadores como linfocinas y otras sustancias que amplifican la respuesta (47)..

En 1973 Whitcomb y Rocklin (48) utilizaron por primera vez el FTe como inmunoterapia de apoyo en un caso de Tb miliar.

En pacientes con infecciones con Mycobacterium Fortitum se utilizó el ELD como agente inmunoterapéutico e inmunoprolifáctico obteniendo una evolución total de la enfermedad, lográndose además eliminar los medicamentos antituberculosos (49); también se ha utilizado el ELD en pacientes con ostiomielitis fistulante tuberculosa como inmunoterapia adjunta y se observó disminución de los síntomas (50).

En infecciones por Mycobacterium xenopi con resistencia a antifímicos, se aprovechó la reacción cruzada que presenta con Mycobacterium tuberculosis y se preparó FTe a este Ag; La utilización de este FTe revirtió el curso de la infección (51).

Estrada-Parra y col. realizaron varias investigaciones utilizando Fte en pacientes con Tb pulmonar avanzada resistentes al tratamiento antifímico, demostrando una franca mejoría clínica e inmunológica. Sin embargo existen algunas ocasiones en donde la utilización

del FTe falla como apoyo inmunoterapéutico (53).

Debido a la controversia que existe en la utilización del FTe; en este trabajo se probó la potencia in vitro y/o in vivo del FTe, antes de su aplicación en cada paciente, además se ha reportado que los pacientes con Tb pulmonar se caracterizan por presentar una baja producción de IL-2 (54); es por eso que en el perfil inmunológico que se determinó en cada paciente se introdujo la técnica para evaluar la capacidad de la producción de IL-2.

HIPOTESIS

Suponemos que los pacientes con Tuberculosis Pulmonar activa tratados con Factor de Transferencia específico y quimioterapia presentarán una mejoría clínica e inmunológica, de mayor relevancia que aquellos tratados solamente con quimioterapia.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar el tipo de alteraciones que existen a nivel de la respuesta inmune en los pacientes con Tuberculosis Pulmonar activa.
- 2.- Demostrar que la inmunoterapia con Extracto de Leucocitos Dializado conteniendo Factor de Transferencia combinada con la quimioterapia antifimica, produce mejores resultados clinicos en los pacientes que cuando se utiliza solamente la quimioterapia.
- 3.- Probar si el Factor de Transferencia es capaz de restaurar algunas de las alteraciones inmunológicas.

MATERIALES Y METODOS

PACIENTES

En el presente estudio se trabajó con pacientes con TbP activa, con baciloscopia positiva y que al momento de iniciar el estudio no padecieran otra(s) enfermedad(es). El rango de edad de los pacientes fué de 26 a 56 años, siendo el promedio de 41 años. Se incluyeron pacientes tanto resistentes al tratamiento los cuales tenían de 2 a 21 años en tratamiento sin curación (siendo 11 años el promedio) así como pacientes vírgenes al tratamiento.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se realizó siguiendo un sistema de "doble ciego" donde ninguna de las personas que trabajaron en forma directa con los pacientes (médicos, enfermeras, químicos, etc) conocía la distribución de los pacientes del grupo control o del placebo.

Los 26 pacientes se dividieron al azar en dos grupos:

- Pacientes "problema" los cuales recibieron quimioterapia más 10 dosis de FT, una por semana, las primeras 5 semanas y cada 15 días hasta concluir.
- Pacientes "control" los cuales recibieron quimioterapia más 10 dosis de placebo (solución salina fisiológica).

Para la quimioterapia antifimica convencional se utilizaron combinaciones de las siguientes drogas: Isoniacida, Etambutol, Rifampicina, Pirazinamida y Morfocinamida.

El FT se obtuvo de personas sanas, preferentemente convivientes de pacientes, con IDR positiva a PPD (induración mayor de 10 mm), en cada

paciente el lote de FTe que se utilizó fué seleccionado previamente probando su capacidad de modificar la respuesta del paciente a PPD in vivo y/o in vitro como se describe más adelante.

A cada paciente se le realizó un perfil inmunológico y clínico antes (semana 0), durante (semana 6) y después (semana 17) del tratamiento o placebo.

La evaluación inmunológica comprendió: población total de linfocitos T y de linfocitos B, cuantificación de inmunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM), IDRs (PPD, Var. Cocci), LIF (PPD, Var. Cocci), capacidad fagocítica, capacidad de producción de IL-2, complemento hemolítico al 50% y los componentes C₃ y C₄.

El perfil clínico comprendió los siguientes parámetros: tos, hemoptisis, fiebre, síntomas generales y una curva ponderal.

Además se realizaron en forma periódica exámenes baciloscópicos para la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes en esputo por la técnica de Ziehl-Neelsen.

PREPARACION DEL FT

La obtención del FTe se realizó utilizando el método de Lawrence (18): se obtuvieron 500 ml de sangre periférica de cada donador reactor a PPD. en bolsas de colección de sangre triples (CPDA-1, Fenwal Laboratories, Deerfield, Illinois, USA), se centrifugó a 800 rpm durante 15 min (centrifuga Beckman JB-21). Se separó el paquete de plasma en una de las bolsas laterales y se sometió a una segunda centrifugación a 1,500 rpm durante 15 min para separar el paquete de leucocitos. Posteriormente se realizó una cuenta leucocitaria para determinar las unidades de FTe de cada lote. (Una unidad de FTe = 1×10^8 linfocitos).

El paquete celular obtenido se lisó por 10 ciclos sucesivos de congelación y descongelación, y el extracto se sometió a diálisis contra agua destilada utilizando un tubo de diálisis de 12,000 Kd. El dializado se repartió en viales, se liofilizó en una liofilizadora (Freezzmobile 12, Virtis, Co. Gardiner, N.Y. USA) y congeló a -70°C hasta su uso (18).

POTENCIA DEL FTe

Determinación de la potencia in vitro mediante el ensayo de FIL:

Se utilizó el ensayo de FIL descrito por Bloom (55). Se obtuvieron 20 ml de sangre periférica y se dejaron sedimentar durante 45 min para separar el plasma, el cual se colocó en un tubo con tapón de rosca. Los leucocitos se lavaron 3 veces con una solución de Alsevers pH 6.8 (Apendice A), por centrifugación a 1,500 rpm durante 10 min en cada lavado (centrífuga Beckman JB-21), el último lavado se resuspendió en 1 ml de Medio Esencial Mínimo Modificado por Dulbecco (MEMD, Gibco Laboratories Grand Island N.Y.), la suspensión celular se dividió en dos tubos, uno conteniendo 0.1 ml del lote de FTe a probar y otro control con 0.1 ml de MEMD, se incubaron durante 30 min a 37°C . Posteriormente las células se centrifugaron y se resuspenden nuevamente en MEMD, para empaquetarse en capilares estériles, éstos se sellaron por uno de los extremos, y se centrifugaron a 1,800 rpm por 7 min, se cortaron en la interfase celular, se colocaron en las cámaras de Bloom previamente preparadas con parafina cubreobjetos y grasa de silicón, se llenaron con MEMD y se agregó 0.1 ml de los antígenos a probar utilizando como control el FTe sin estimulación antigénica.

Determinación de la Potencia in vivo mediante intradermorreacción al antígeno relacionado:

Se aplicó intradérmicamente en el antebrazo 0.1 ml de Fte del lote de FT a probar; 24 h después se aplicó el antígeno (PPD) en la misma zona, posteriormente a las 48 h se realizó la lectura de la prueba midiendo la zona de induración en mm.

APLICACION DEL FTe

A cada paciente se le aplicaron 10 unidades de FTe o placebo (solución salina fisiológica, liofilizada de apariencia y envase igual al del FTe). La vía de aplicación fue subcutánea en la región del músculo deltoides (L-10).

PERFIL INMUNOLOGICO

El perfil inmunológico evaluado en cada paciente antes (semana 0), durante (semana 6) y después (semana 17) de la inmunoterapia comprendió las siguientes pruebas (Tabla 4):

Intradermorreacción:

Se utilizó el PPD de 2 U. Coccidioidina 1:100 (donados por la Gerencia General de Reactivos Biológicos, Secretaría de Salubridad y Asistencia, México, D.F.) y Varidasa (Lakeside, México D.F.), a una concentración de 10 U.

Se aplicó intradérmicamente 0.1 ml de Ag y se realizó la lectura a las 48 h midiendo los mm de induración. Una prueba positiva es mayor o igual de 10 mm.

Determinación de LT:

Se obtienen 10 ml de sangre periférica y se hace una dilución al doble

con solución de Hank's (Apendice B), en un tubo que contenga 4 ml de histopaque (Sigma Chemical, St. Louis Mo. USA), se éstratifican 10 ml de esta mezcla, se centrifugaron a 1500 rpm durante 30 min (centrifuga Beckman BJ-21). Se separó la interfase de células mononucleares conteniendo de 80 a 90 % de linfocitos, el paquete celular se resuspendió en solución de Hank's, se lavaron 3 veces por centrifugación a 1,500 rpm durante 10 min, se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células por ml. A un tubo de ensayo que contenga 250 μ l de eritrocitos de carnero se le agregó 250 μ l de la suspensión celular ajustada, se incuban a 37°C por 15 min, se centrifugan a 500 rpm por 15 min y se dejan incubar toda la noche en refrigeración a 4°C; al día siguiente se resuspenden lentamente, se toma una gota y se monta sobre un portaobjetos con cubreobjetos y se realiza la lectura. Una célula positiva es aquella que tiene adheridos a su membrana más de 4 eritrocitos. Los valores normales son mayor o igual de 60% (57).

Determinación de Linfocitos B:

Los linfocitos B tienen receptores para el complejo formado por el Ac específico y la fracción C del complemento. Los eritrocitos se sensibilizan previamente con el Ac específico (anti-eritrocito) producido en conejo, en una concentración subhemolizante; una vez que se han adherido a la superficie del eritrocito se incuba con el complemento (suero humano 1:40). Una vez que los eritrocitos están sensibilizados se agregan 250 μ l al 1% a un tubo con 250 μ l de la suspensión celular ajustada obtenida de la misma forma que en la determinación de LT, y se deja a temperatura ambiente durante 15 min. Una roseta positiva es aquella célula que tiene 4 o más eritrocitos adheridos a su membrana. Valores normales de 13 a 33% (57).

Determinación cuantitativa de complemento en unidades 50% hemolíticas.

La medición del complemento sérico se realizó utilizando la lisis de eritrocitos por Ac específicos en presencia de complemento.

En tubos de ensayo se pusieron en contacto los sueros problema en diluciones decrecientes con el sistema hemolítico (eritrocitos de carnero al 5% y hemolisina a una concentración de 2U hemoaglutinantes en volúmenes iguales).

Se incuban durante 1 hora a 37°C y se paró la reacción con amortiguador salino de trietanolamina (apéndice C), se centrifuga a 1.500 rpm (en centrifuga Beckman JB-21) durante 5 min y se lee la absorbancia en cada uno a 550 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente se graficaron las absorbancias en papel semilogarítmico y se determinaron los valores de las muestras en unidades 50% hemolíticas por ml.

Valores normales 60-120 U CH50/ml (58).

Capacidad fagocítica

El mecanismo de muerte intracelular en el fagocito se puede medir utilizando el colorante NBT, ya que éste al reducirse denota la actividad metabólica de una célula funcionalmente fagocítica.

El ensayo se realizó agregando una gota de sangre periférica no heparinizada sobre un portaobjetos.

Se dejó coagular la sangre durante 30 min a 37°C en cámara húmeda, se eliminó el coágulo y se lavó con solución salina, posteriormente se agregó una gota de NBT (apéndice D) se incubó durante 30 min a 37°C en cámara húmeda, se lavó con solución salina, se fijó con una gota de metanol durante 1 min y se tificó con safranina durante 7 min, finalmente se lavó

con agua destilada y se realizó el conteo. Una célula positiva es aquella cuyos gránulos se reducen y se presentan de color azul-morado. Los valores normales son mayor del 40% de células positivas (59).

Determinación de la concentración de IL-2 en sobrenadantes de linfocitos estimulados con concanavalina A (Con A).

Para la estimulación de linfocitos se extrajeron 20 ml de sangre periférica heparinizada se diluyó al doble con solución de Hank's (apendice B) y se estratificó en tubos cónicos de polipropileno conteniendo histopaque (Sigma Chemical, S.Louis Mo.USA.)se centrifugaron a 1800 rpm (centrifuga BJ-10, Beckman) durante 30 min, y se recolectó con pipeta Pasteur la interfase celular de leucocitos, se lavó dos veces con solución de Hank's a 1200 rpm durante 10 min, se resuspendió en medio RPMI-1640, se realizó una cuenta leucocitaria y se ajustó a una concentración de 4×10^6 células/ml.

A 2 ml de esta suspensión celular se le agregó 0.1 ml de Con A a una concentración de 100 g/ml se incubó por 20 h a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂.

Posteriormente se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min, se colectó el sobrenadante en condiciones estériles y se almacenó a 70°C hasta su uso.

Para cuantificar la actividad biológica en estos sobrenadantes se utilizó un "Kit" de ELISA (Intertest 2 Human Interleukin-2 ELISA, Genzyme corporation, Boston, Ma., USA.). Se recubrió cada uno de los 96 pozos de la inmunoplaaca con el primer Ac (Anticuerpo monoclonal anti-IL-2) se tapó y se incubó en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

Inmediatamente antes de su uso, se lavó la placa 4 veces

con amortiguador de lavado PBS/ Tween (apéndice E).

Después del lavado, se agregaron 100 μ l de los estándares de IL-2 (500, 50, 5, 0.5 y 0.05 U) y como control negativo se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chemical Co.), esto se realizó en pozos por duplicado, y se agregaron 100 2301 de cada uno de los sobrenadantes estimulados se incubó la placa tapada por 4 h a 37°C en cámara húmeda.

Se aspiraron las muestras completamente y se lavaron todos los pozos con amortiguador de lavado repitiendo este procedimiento 4 veces.

Se agregó 100 μ l del segundo Ac (Anticuerpo polivalente de conejo anti IL-2). Se incubó la placa con tapa en cámara húmeda por 1 h a 37°C.

Se realizó aspiración y lavado como se menciona anteriormente.

Se agregó 100 μ l del tercer Ac (Anticuerpo de cabra anti Ig de conejo conjugado con fosfatasa alcalina) en la placa se incubó en cámara húmeda a 37°C por 1 h.

Se realizó aspiración y lavados como se mencionó anteriormente.

Se agregaron 100 μ l de sustrato y a los 45 min se observó la reacción por el cambio de color y se midió la absorbancia en cada uno de los pozos a 410 nm con un Lector de ELISA (Vertical photometry; Eflab; Helsinki, Finland) (60).

Factor inhibitorio de la migración de leucocitos

El FIL es una linfocina que inhibe la migración normal de leucocitos PMN, es producido por linfocitos T al estar en contacto con el Ag específico.

Se extrajeron 20 ml de sangre periférica con una jeringa heparinizada,

ésta se incubó en posición vertical a 37°C durante 1 h, en un tubo de ensayo se recuperó el plasma rico en leucocitos, éste se centrifugó a 1,800 rpm durante 15 min (centrifuga Beckman JB-21), el botón celular precipitado se lavó dos veces con solución de Hark's (apéndice B), el último precipitado se resuspendió en 1 ml de medio RPMI-1640, esta suspensión se utilizó para llenar los capilares, los cuales se centrifugaron a 1,800 rpm durante 15 min y se cortaron en la interfase del paquete de leucocitos.

Por otro lado se prepararon las cámaras de Bloom con parafina y cubreobjetos, a los cuales se les agregó una gota de grasa de silicón para sostener los capilares cortados, una vez colocados se sellaron las cámaras y se llenaron con medio de cultivo y los Ag correspondientes (PPD, var, cocci). Se midió la migración celular a las 24 h y se determinó el índice de inhibición de migración de leucocitos (55).

Los valores normales de inhibición de migración son igual o mayor de 20% con respecto a los controles.

Quantificación de IgG, IgA e IgM y de los componentes C₃ y C₄ del complemento mediante nefelometría

Se mezclaron 100 µl de los sueros problema diluidos 1:101 en solución salina con 200 µl de los antisueros estándares correspondientes diluidos 1:5 y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron las lecturas en un nefelómetro a 635 nm y el registro de las concentraciones se obtuvo directamente de la computadora integrada.

EVALUACION BACTERIOLOGICA

La evaluación bacteriológica se realizó mediante una baciloscopia en esputo con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada por Kingoun (61); la búsqueda de los bacilos ácido alcohol resistentes se realizó de acuerdo al método de la Unión Internacional de Tuberculosis (62).

EVALUACION CLINICA

La evaluación clínica se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes síntomas y signos que se consideran más importantes en cuanto a la evaluación de los pacientes con TbP, los cuales son: tos, hemoptisis, fiebre, síntomas generales, junto con una curva ponderal. En cada uno de éstos se consideraron cuatro parámetros: 1) leve, 2) moderado, 3) grave y 4) ausente.

RESULTADOS

En el presente trabajo se determinó la evolución clínica, bacteriológica e inmunológica de 26 pacientes, los cuales se dividieron en dos grupos: uno de 17 pacientes que recibieron inmunoterapia con FT y otro grupo de 9 pacientes que formaron el grupo placebo. Todos los pacientes recibieron el tratamiento antifímico convencional

La valoración inmunológica comprendió: respuesta celular, respuesta humoral y mecanismos de defensa no específicos

En lo que respecta a la respuesta celular específica los Linfocitos T (Tabla 6), el 35% de los pacientes se encontraban dentro de los valores normales antes de iniciar el tratamiento con FT y después se mantuvo sólo un 20%, mientras que en el grupo placebo el 11% de los pacientes se encontraba dentro de los valores normales y al finalizar el tratamiento aumentó a un 16%.

Con respecto a los resultados de las pruebas dérmicas, en la inducción con PPD (Tabla 7), en el grupo de pacientes tratado con FT aumentó la positividad de un 88 a un 93%, mientras que en el grupo placebo; antes del tratamiento el 12% de los pacientes eran positivos y al final del tratamiento ninguno era positivo. En la estimulación con Var (Tabla 8), antes del tratamiento ningún paciente del grupo tratado con FT presentaba prueba dérmica positiva y al finalizar el tratamiento el 8% de estos pacientes fueron positivos; por el contrario el grupo placebo al inicio de el tratamiento 16% de los pacientes daban la prueba dérmica positiva y al finalizar el mismo, todos fueron negativos. Respecto a la

intradermorreacción a Cocci (Tabla 9), después del tratamiento tanto en el grupo tratado con FT como en el grupo placebo aumentó el porcentaje de pacientes que presentaban positividad de un 6 a un 43% y de un 0 a un 16% respectivamente

En la evaluación de LIF con PPD (Tabla 10) en el grupo tratado con FT el porcentaje de pacientes que presentaban valores normales disminuyó después del tratamiento de un 60 a un 12%, lo mismo sucedió con el grupo placebo después del tratamiento disminuyó el porcentaje de pacientes con valores normales de un 77% a un 44%. Con respecto al LIF estimulado con Var (Tabla 11) en ambos grupos el porcentaje de pacientes que se encontraban dentro de los valores normales disminuyó después del tratamiento, de 65 a 38% en el grupo tratado y de 55 a 22% en el grupo placebo; finalmente en la evaluación de LIF estimulado con Cocci (Tabla 12), el cambio fué mínimo en el porcentaje de pacientes con valores normales antes y después del tratamiento con FT (43 a 42%) contrariamente en el grupo placebo, si hubo una marcada disminución de 33 a 14%.

En cuanto a la determinación de IL-2 en los sobrenadantes de linfocitos estimulados con Con A (Fig 5), en el grupo tratado con FT un 60% de los pacientes incrementó su producción de IL-2 después del tratamiento mientras que en el grupo placebo solo un 16% aumentó su producción

Con respecto a la respuesta humoral, particularmente en la determinación de linfocitos B (Tabla 3), en el grupo tratado con FT el 44% de los pacientes se encontraba dentro de los valores normales incrementandose después del tratamiento a un 60% no encontrandose cambios en el grupo placebo antes y después. En cuanto a la determinación de las

inmunoglobulinas después del tratamiento en ambos grupos aumentó el porcentaje de pacientes que presentaban valores normales de IgA (Tabla 14), en el grupo tratado con FT aumentó de 71 a 82% y en el grupo placebo de 77 a 86%; en el grupo tratado con FT el porcentaje de pacientes que presentaban valores normales de IgG (tabla 15) disminuyó después del tratamiento de 87 a 56% contrario al grupo placebo que aumentó de 66 a 86%; en la determinación de IgM (Tabla 16) todos los pacientes tratados con FT iniciaron el tratamiento dentro de los valores normales y al finalizar el mismo sólo el 87% mantenía valores normales y en el grupo placebo el porcentaje cambio levemente de 88 a 86%.

En la evaluación de los mecanismos de defensa no específicos se determinó la capacidad fagocítica mediante la reducción de NBT (Tabla 17) aumentando el porcentaje de pacientes que presentaban valores normales tanto en los tratados con FT (53% a 69%) como en los del grupo placebo (55% a 86%) al final del tratamiento.

En cuanto a la fracción C₃ (Tabla 19) del complemento en el grupo tratado con FT no se observó variación en el porcentaje de pacientes que presentó valores normales y se mantuvo en 64% en cambio en el grupo placebo antes del tratamiento el 86% de los pacientes presentaban valores normales y al finalizar todos presentaban estos valores.

La fracción C₄ del complemento en el grupo tratado con FT antes del tratamiento todos los pacientes se encontraban dentro de los valores normales y después del tratamiento bajó a un 64% contrariamente en el grupo placebo aumentó de 66 a 83%.

En la evaluación bacteriológica (Fig 6), al inicio del tratamiento todos los pacientes se encontraban baciloscopicamente activos y al

finalizarlo en el grupo tratado con FT 6 pacientes presentaron baciloscopia negativa mientras que en el grupo placebo sólo 1 paciente logró presentar baciloscopia negativa.

TABLAS

T A B L A 1

PROPIEDADES DEL FT

Soluble, dializable, liofilizable

No antigénico

Peso molecular de 3,500 a 12,000 Da

Oligorribonucleótido

Inactivado a 56°C por 30 min

Almacenable a 20°C por varios años

Punto isoeléctrico de 1.6

Resistente a alcohol, acetona y urea 6M

Contiene Factor Inductor y Factor Supresor

Orcinol y Biuret positivos

Sensibilidad enzimática

Resistente a:

Tripsina

Quimiotripsina

Fosfodiesterasa II

Ribonucleasa T

Fosfatasa alcalina

Ribonucleasa A

Desoxirribonucleasa

Sensible a:

Pronasa

Proteinasa K

Fosfodiesterasa I

Carboxipeptidasa A

Ribosil transferasa B

T A B L A 2

FACTOR INDUCTOR

Presente en la fracción de diálisis 3,500 a 12,000 Da

Reside en las células T cooperadoras

Es absorbido por las células Ts y macrófagos

Se une a antígeno específico

Recuperado de inmunoabsorbentes con urea 8M

Induce inhibición de migración específica de antígeno

T A B L A 3

FACTOR SUPRESOR

Se encuentra en la fracción de diálisis 3,500 > 12,000 Da

Reside en las células T supresoras

Es absorbido por las células Tc y macrófagos

Se une a anticuerpo específico

Recuperado de inmunoabsorbentes como glicina-HCl

Bloquea la actividad cooperadora-inductora del FT en células no inmunes en una forma dependiente de la dosis

T A B L A 4

PERFIL INMUNOLOGICO

INMUNIDAD HUMORAL

Linfocitos B

Quantificación de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM)

INMUNIDAD CELULAR

Linfocitos T

Intradermorreacciones (PPD, Var y Cocci)

LIF (PPD, Var y Cocci)

Producción de Interleucina - 2

MECANISMOS DE DEFENSA NO ESPECIFICOS

Reducción de NBT

Complemento hemolítico al 50%

Componente C del complemento
3

Componente C del complemento
4

T A B L A 5

ALGUNAS APLICACIONES DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA

DEFECTOS DE DISFUNCION AMPLIA EN INMUNIDAD CELULAR

Síndrome de Wiskott Aldrich
Ataxia Telangiectasia
Hipogammaglobulinemia variable
Inmunodeficiencia combinada severa
Síndrome DiGeorge
Disgammaglobulinemia
Sarcoidosis
Enfermedad de Hodking
Uveitis

DEFECTOS SELECTIVOS DE ANTIGENO

Micóticos:

Candidiásis mucocutánea crónica
Histoplasmosis diseminada
Coccidioidomicosis diseminada

Virales:

Infecciones por citomegalovirus
Herpes zóster y simplex
Sarampión
Hepatitis
Varicela

Parasitarios

Leishmaniasis cutánea
Toxoplasmosis

Malignos:

Osteosarcoma
Cáncer de pulmón
Hipernefroma
Cáncer nasofaríngeo
Otros

Micobacteriales:

Lepra
Tuberculosis

TABLA 6

LINFOCITOS T (%)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
68	64	65	52	74	ND
56	ND	17	58	ND	24
60	36	38	52	21	79
43	54	19	52	33	ND
48	51	54	37	68	58
68	44	54	58	66	39
57	39	60	45	28	23
57	79	45	77	30	59
55	54	58	61	35	ND
57	31	27			
90	80	67	1/9(11)	3/6(51)	1/6(16)
41	49	17			
37	29	11			
57	ND	33			
44	87	ND			
6/17(35)	6/15(40)	3/15(20)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 Valores normales = >60%

TAELA 7

INTRADERMORREACION PPD (mm)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
20	ND	20	0	15	18
12	8	12	12	12	20
20	30	24	15	20	24
17	20	25	0	10	20
			20	26	35
10	25	ND	22	17	ND
20	34	33	15	15	20
17	25	17	30	ND	ND
0	28	15	20	25	ND
11	10	11			
20	45	40	1/8(12)	0/3(0)	0/4(0)
20	16	0			
7	6	14			
15	ND	15			
40	ND	ND			
20	20	30			
75	ND	20			
20	15	20			
16/18(88)	11/13(85)	14/15(93)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales

ND No determinado

Valores normales ≥ 10 mm

TABLA 6

INTRADERMORREACION Var (mm)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
0	ND	0	0	ND	0
5	ND	0	0	ND	5
0	ND	0	0	5	0
6	ND	0	15	ND	0
0	ND	ND	0	ND	0
0	ND	ND	0	ND	ND
0	ND	0	0	0	ND
0	ND	0	0	ND	ND
ND	0	ND	0	ND	0
0	0	0			
0	0	0	1/6(16)	0/3(0)	0/5(0)
0	0	0			
0	ND	ND			
0	ND	ND			
0	0	25			
0	ND	0			
0	0	0			
<hr/>	<hr/>	<hr/>			
0/17(0)	0/5(0)	1/12(8)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales ≥ 10 mm

TAHLA 9

INTRADERMORREACION Cocci (mm)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
0	ND	0	0	ND	0
0	ND	0	0	5	0
ND	ND	0	ND	ND	0
0	8	10	0	5	0
0	ND	ND	0	17	0
0	ND	ND	0	ND	0
7	10	17	0	12	17
0	ND	0	0	ND	ND
0	ND	16	ND	20	ND
0	35	30			
0	0	34	0/7(0)	3/5(60)	1/6(16)
0	0	12			
25	ND	0			
0	ND	ND			
0	0	0			
0	ND	0			
0	0	0			
<u>1/16(16)</u>	<u>2/7(14)</u>	<u>6/14(43)</u>			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales

ND No determinado

Valores normales ≥ 10 mm

TABLA 10

LIF PPD (%)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
45	15	54	50	16	16
ND	51	0	62	ND	68
76	59	0	59	58	5
13	15	0	69	69	56
40	2	2	11	0	0
30	25	6	32	0	27
33	18	0	14	26	0
81	10	38	43	35	0
14	38	80	25	5	22
0	0	0			
47	7	0	7/9(77)	4/8(50)	4/9(44)
19	37	0			
73	0	3			
8	21	ND			
10	20	ND			
29	29	ND			
0	0	ND			
9/15(60)	8/17(47)	2/17(12)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales

ND No determinado

Valores normales $\geq 20\%$

TABLA 12

LIF Cocci (%)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
ND	0	29	ND	22	0
ND	69	0	56	ND	6
ND	3	17	ND	ND	3
8	0	0	ND	0	21
0	17	4	0	34	0
11	0	5	0	ND	0
0	0	0	0	56	33
0	6	52	81	44	0
42	18	ND	0	ND	ND
0	56	24			
23	ND	34	2/6(33)	4/4(100)	1/7(14)
0	62	0			
0	0	77			
85	21	ND			
92	12	ND			
92	92	ND			
59	0	ND			
6/14(43)	5/16(31)	5/12(42)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales

ND No determinado

Valores normales $\geq 20\%$

TABLA 12

LIF Cocci (%)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
ND	0	29	ND	22	0
ND	69	0	56	ND	6
ND	3	17	ND	ND	3
8	0	0	ND	0	21
0	17	4	0	34	0
11	0	5	0	ND	0
0	0	0	0	56	33
0	6	52	81	44	0
42	18	ND	0	ND	ND
0	56	24			
23	ND	34	2/6(33)	4/4(100)	1/7(14)
0	62	0			
0	0	77			
85	21	ND			
92	12	ND			
92	92	ND			
59	0	ND			
6/14(43)	5/16(31)	5/12(42)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales $\geq 20\%$

TABLA 13

LINFOCITOS B (%)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
27	19	33	30	17	8
29	ND	7	29	30	ND
31	22	10	28	20	17
36	10	13	29	20	24
25	9	14	36	10	13
41	28	30	12	7	13
35	ND	50	39	30	ND
36	21	22	23	24	9
21	21	33	ND	24	53
56	33	ND			
19	33	14	4/7(57)	6/8(75)	4/7(57)
10	34	0			
16	ND	38			
ND	ND	11			
20	61	32			
41	ND	24			
11	18	ND			
7/16(44)	10/12(83)	9/15(60)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales 13 a 33%

TABLA 14

IgA (mg/dl)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
225	305	191	325	380	ND
ND	280	209	505	270	275
405	400	304	330	430	295
280	395	345	175	176	190
350	335	240	320	184	ND
245	260	255	205	122	170
356	325	ND	295	ND	ND
355	164	195	285	190	190
490	250	ND	305	350	390
ND	ND	ND			
295	ND	ND	7/9(77)	8/8(100)	6/7(86)
320	ND	ND			
ND	395	315			
560	465	485			
500	360	325			
235	255	230			
520	370	530			
10/14(71)	13/14(93)	9/11(82)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales 90 a 450 mg/dl

TABLA 15

IgG (mg/dl)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
1070	1600	1270	1300	2120	ND
ND	820	148	1840	1040	1300
1210	1300	1300	1270	1790	1750
1270	2850	1500	950	1176	1110
1710	2120	1390	2600	1470	ND
1790	2550	1650	90	470	630
1100	920	1760	1540	1600	1620
1600	986	750	860	1030	1110
1500	900	830	1090	1400	1190
ND	ND	ND			
940	1000	2040	6/9(66)	7/9(77)	6/7(86)
1300	970	1790			
ND	1590	2220			
1600	1260	1590			
2550	2230	2190			
1170	1170	1360			
2050	1200	1910			
13/15(87)	12/16(75)	9/16(56)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales

ND No determinado

Valores normales 800 a 1,800 mg/dl

TABLA 16

IgM (mg/dl)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
80	70	106	100	225	ND
ND	140	840	195	100	70
180	130	113	140	155	125
260	310	385	100	93	90
195	187	170	145	145	ND
260	170	160	100	90	70
178	155	140	285	260	325
235	297	240	180	160	150
195	130	155	125	105	140
ND	ND	ND			
85	115	115	8/9(88)	9/9(100)	6/7(86)
155	180	185			
ND	205	175			
147	125	155			
175	140	130			
95	95	115			
115	60	110			
14/14(100)	14/16(87)	14/16(87)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales

ND No determinado

Valores normales 60 a 280 mg/dl

TABLA 17

NBT (%)

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
45	42	57	35	56	ND
75	69	ND	53	71	67
37	57	38	66	52	29
58	74	74	32	93	40
84	63	43	63	32	ND
55	94	57	55	55	75
48	35	61	37	37	54
32	61	ND	67	37	81
31	ND	ND	26	51	53
75	52	63			
72	24	24	5/9 (55)	6/9 (66)	6/7 (86)
26	26	91			
68	76	56			
6	52	31			
27	27	ND			
32	32	60			
36	37	37			
9/17(53)	10/16(63)	9/13(69)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales $\geq 40\%$

TABLA 18

CH (U)
50

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
78	66	ND	44	67	ND
ND	119	ND	ND	67	ND
133	154	133	78	83	ND
84	ND	80	110	<40	83
89	ND	148	<40	ND	ND
127	74	121	<40	ND	50
ND	77	ND	55	ND	ND
50	50	91			
43	20	ND	2/7(28)	3/4(75)	1/2(50)
117	ND	ND			
47	ND	ND			
67	ND	ND			
174	ND	ND			
<u>7/11(64)</u>	<u>4/7(57)</u>	<u>2/5(20)</u>			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales 60 a 120 U.

TABLA 19

C (mg/dl)
3

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
68	116	47	95	82	ND
ND	110	73	84	94	91
130	130	68	80	91	56
102	85	74	ND	50	116
142	4	86	88	62	ND
46	160	67	93	52	88
87	32	44	79	70	ND
51	82	67	127	106	83
ND	ND	ND	ND	69	77
99	81	ND			
88	98	80	6/7(86)	8/9(88)	6/6(100)
113	64	ND			
ND	ND	83			
56	59	66			
68	ND	68			
ND	74	50			
115	160	69			
9/14(64)	9/14(64)	9/14(64)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales 55 a 120 mg/dl

TABLA 20

C (mg/dl)
4

Factor de Transferencia			Placebo		
Antes	Durante	Después	Antes	Durante	Después
24	29	17	30	28	ND
ND	43	33	22	28	41
21	29	21	15	46	16
29	38	28	28	23	33
25	19	28	23	26	ND
25	33	26	21	16	15
22	15	14	22	20	ND
27	23	24	34	20	21
ND	ND	ND	ND	20	26
22	25	ND			
33	33	ND	6/9(66)	7/9(77)	5/6(83)
25	16	19			
40	ND	19			
31	29	28			
12	ND	14			
ND	23	28			
40	33	25			
14/14(100)	11/15(5)	9/14(64)			

() Porcentaje de pacientes que presentan valores normales
 ND No determinado

Valores normales 20 A 50 mg/dl

FIGURAS

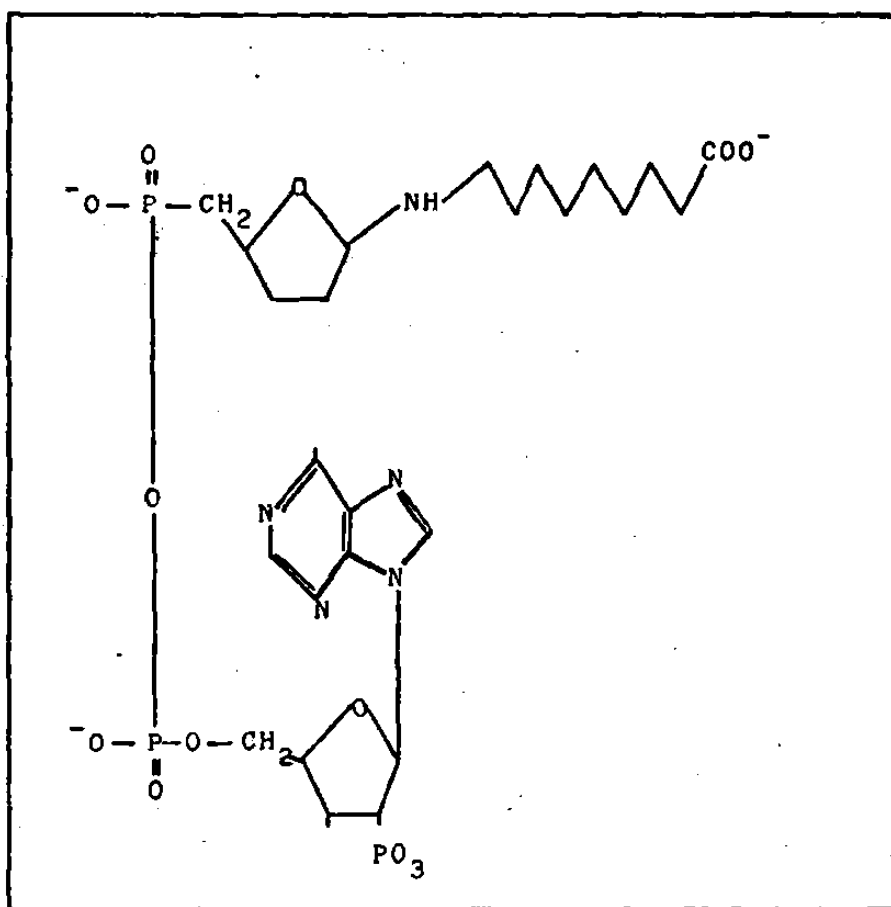


FIGURA 1. MODELO ESTRUCTURAL DE LA MOLECULA DE FT
(Propuesto por Burger)

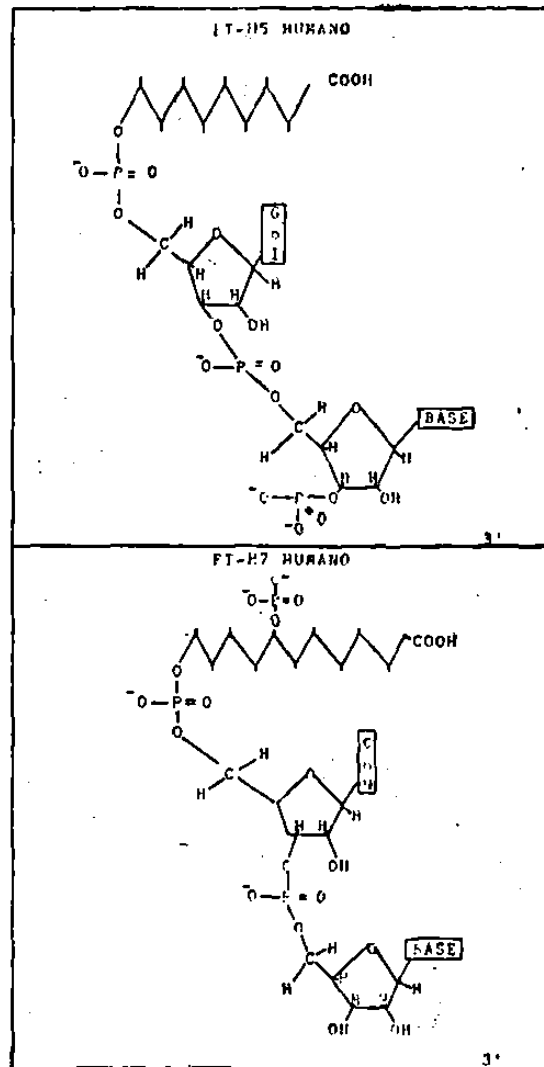


FIGURA 2. MODELOS ESTRUCTURALES DE DOS FRACCIONES DEL FT.
(Propuesto por Fundenberg).

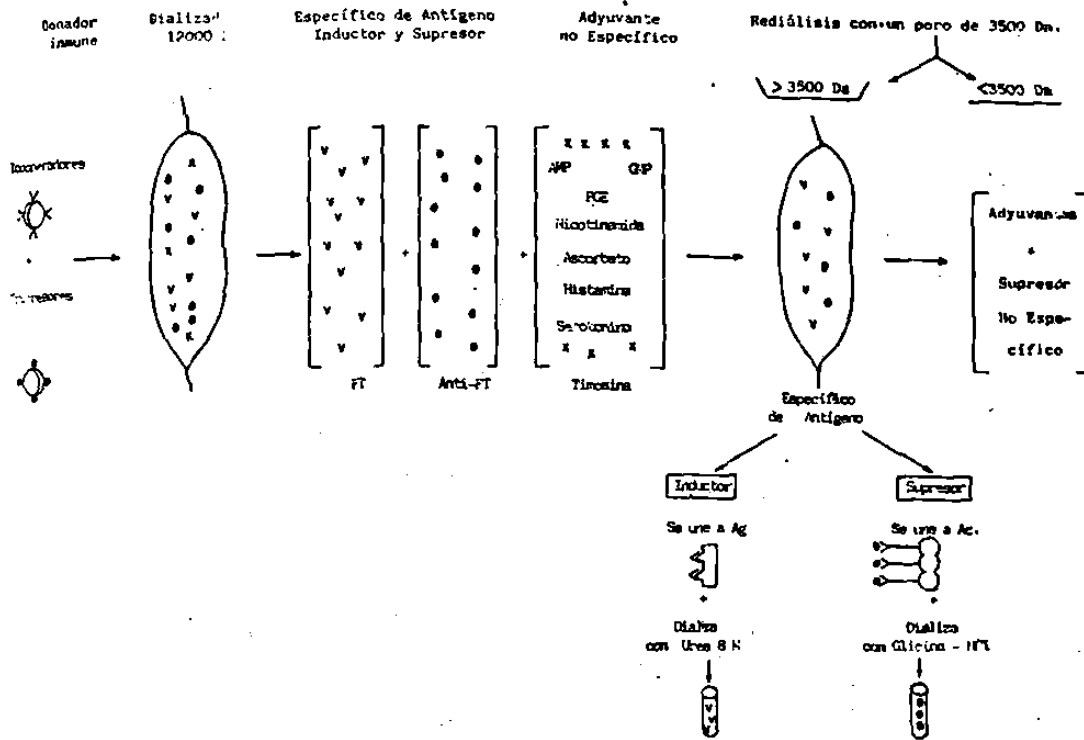


FIGURA 3. ANALISIS CUALITATIVO DEL DIALIZADO DE LEUCOCITOS

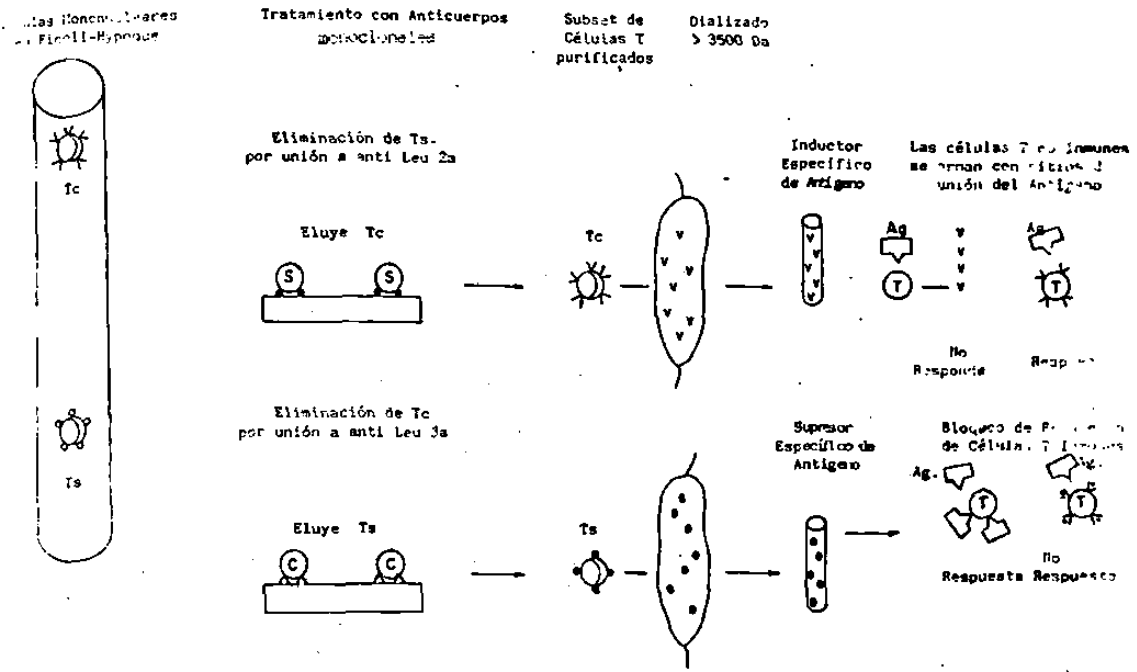


FIGURA 4. OBTENCION DE LOS FACTORES INDUCTOR Y SUPRESOR

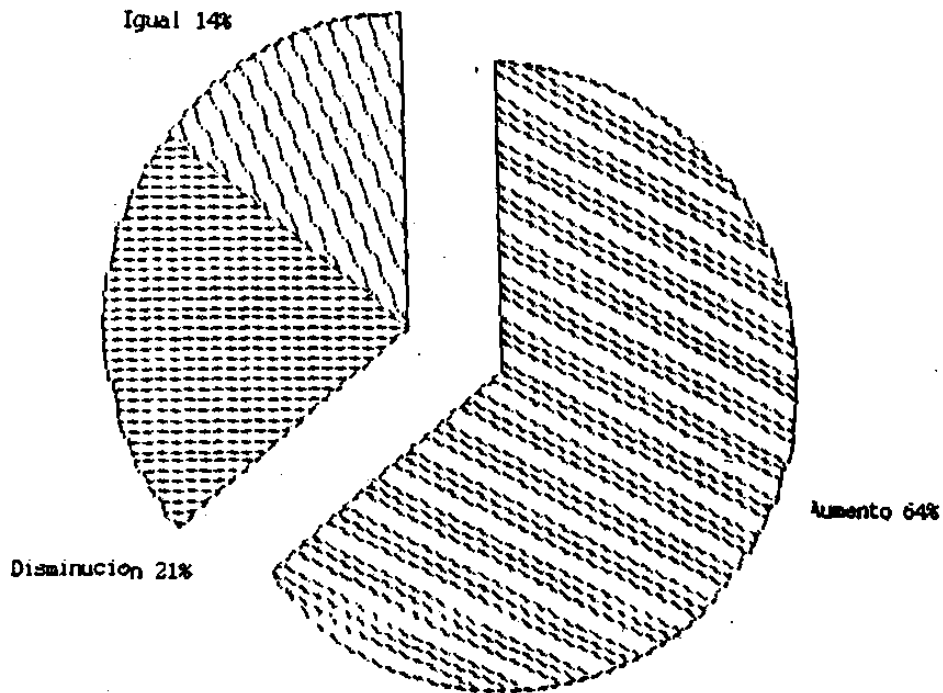


FIGURA 5. INTERLEUCINA - 2
FACTOR DE TRANSFERENCIA

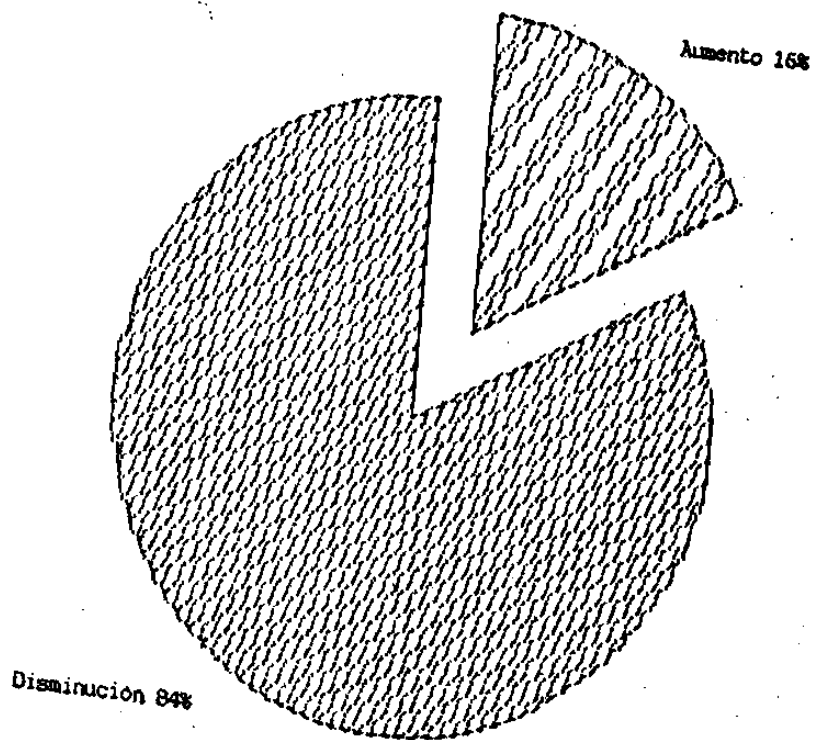


FIGURA 6. INTERLEUCINA - 2
PLACEBO

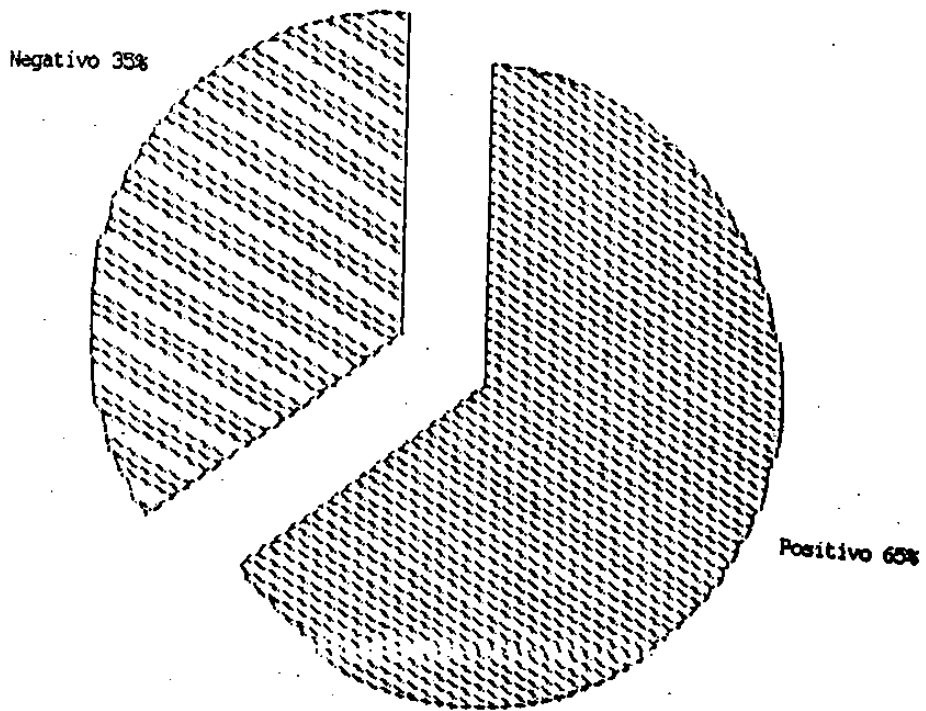
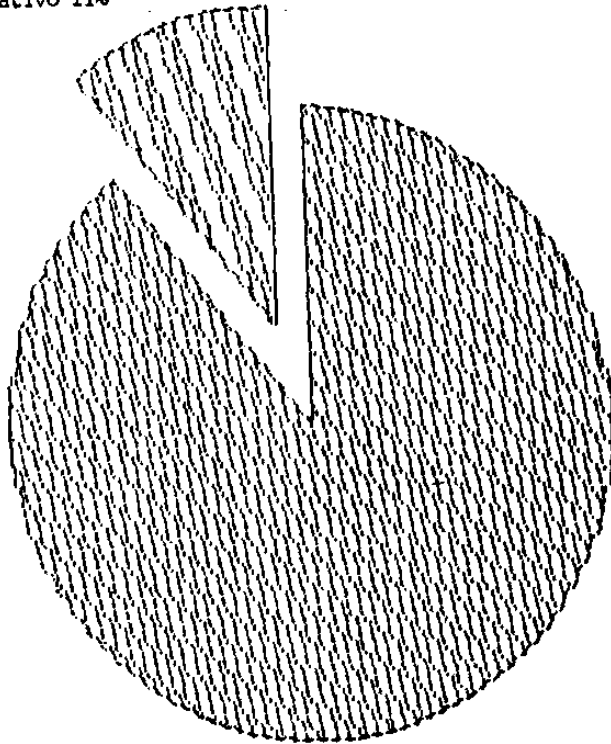


FIGURA 7. ESTUDIO BACTERIOLOGICO

FACTOR DE TRANSFERENCIA

Negativo 11%



Positivo 89%

FIGURA 8. ESTUDIO BACTERIOLOGICO .

PLACEBO

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Dentro de la respuesta inmunológica encargada del control de la TbP tiene un papel muy importante la inmunidad celular, donde las principales células efectoras son los linfocitos T que sintetizan y producen IL-2. Es aquí donde adquiere gran importancia la inmunoterapia de apoyo con FTe con el cual se transfiere la capacidad de respuesta inmune celular contra un antígeno con el no se había reaccionado en forma adecuada.

Con nuestros resultados mostramos que en la evaluación de la respuesta inmune humoral, de los mecanismos de defensa no específico y de algunas pruebas de la respuesta celular tales como linfocitos T, pruebas dérmicas y factor inhibitorio de la migración de linfocitos, no hubo diferencia muy marcada entre los pacientes tratados con FT y los pacientes del grupo placebo.

Se ha reportado que los pacientes con tuberculosis pulmonar presentan un defecto en la producción de IL-2 específica de Ag (T-4). En nuestros datos observamos un aumento en la producción de IL-2 en sobrenadantes de linfocitos estimulados con Con A, en los pacientes tratados con FT, mostrando con esto que ésta puede ser la falla inmunológica que presentan los pacientes con tuberculosis.

En relación al estudio clínico el FT no eliminó todos los síntomas. Sin embargo uno de los problemas principales de los pacientes con tuberculosis es que son portadores del bacilo, por consiguiente el riesgo de transmitirlo es muy grande. En pacientes que por varios años permanecieron con su baciloscopia positiva, además en algunos se les cambió el tratamiento antifímico varias ocasiones, sólo después de la

inmunoterapia de apoyo pudieron cambiar su baciloscopia a negativo.

En la producción de interleucina - 2 (IL-2) en sobrenadantes de linfocitos estimulados con concanavalina A se observó que el FT aumentó la cantidad de IL-2 producida.

En el estudio clínico tanto el grupo tratado con FT como el placebo tuvieron ligeras modificaciones.

La evolución bacteriológica fué uno de los datos más relevantes en los pacientes tratados con FT, ya que un 66% logró cambiar su baciloscopia a negativo, mientras que en ningún paciente del grupo placebo sucedió lo mismo.

En base a lo anterior podríamos esperar que un aumento en el número de dosis y en la frecuencia de administración del Factor de Transferencia hubiera conducido a una marcada evolución clínica favorable.

Por otro lado, es importante considerar la capacidad de estimulación de IL-2 como modelo in vitro para la evaluación de la potencia de cada unidad de FT, por lo que consideramos que sería el paso a seguir.

APENDICE

APENDICE A

SOLUCION DE ALSEVER'S

Glucosa	20.5 g
Citrato de sodio	8.0 g
Acido cítrico	0.55 g
Cloruro de sodio	4.4 g
Agua destilada	1,000 ml

Disolver y esterilizar a 110°C durante 20 min.

APENDICE B

SOLUCION DE HANK'S

Glucosa	1.0 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂	0.14 g
MgSO ₄	0.1 g
MgCl ₂	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
Na ₂ HPO ₄	0.06 g
NaHCO ₃	0.35 g
Rojo fenol	0.02 g
Agua destilada	1,000 ml

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μ m y almacenar a 4°C

APENDICE C

REGULADOR DE SALINA TRIETANOLAMINA (TBS)

Solucion Stock 10 X

NaCl	75.0 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	1.0 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.22 g
Trietanolamina	28 ml
Agua destilada	800 ml

Disolver las sales en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con HCl 0.1 N.

Llevar a 1.000 ml con agua destilada.

Solucion de trabajo:

Diluir 1:10 con agua destilada y adicionar gelatina a una concentracion final de 0.05%.

APENDICE D

NITRO-AZUL DE TETRAZOLIO (NBT)

NBT	0.28 mg
Agua destilada	100 ml

Disolver y guardar en alícuotas a -20°C en frasco color ambar

APÉNDICE E

AMORTIGUADOR DE LAVADO (PBS/Tween)

PBS (Amortiguador de fosfatos pH 7.2 "Genzyme Corporation; Boston, Ma. U.S.A.")

Tween 20 (Genzyme Corporation; Boston, Ma. U.S.A.)

Diluir el frasco de PBS en 2 l de agua bidestilada y agregar 4 ml de Tween 20.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Secretaria de Salubridad y Asistencia. (1987). Folletos de divulgación sobre temas de la patología respiratoria. "Control y tratamiento de la Tuberculosis Pulmonar". Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. México, D.F.
- 2.- Secretaria de Salubridad y Asistencia. (1988). Informe semanal de la dirección general de epidemiología. Semana 28: 6. México, D.F.
- 3.- Landstainer, K. and Chase M.N., (1940). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. J. Exp. Med. 71: 237
- 4.- Lawrence, H.S. (1949). The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71: 516.
- 5.- Lawrence, H.S. (1954). The transfer in humans of delayed of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes. J. Clin. Invest. 34: 219-232.
- 6.- Lawrence, H.S. (1956). Transfer of delayed hypersensitivity to diphtheria toxin in man. Am. J. Med. 20: 248.

- 7.- Barani, P. and Mosko, M. (1962). Chromatography of the human tuberculin delayed-type hypersensitivity transfer factor. *J. Allergy*. 33: 6.
- 8.- Asher, M.S., Schneider, W.J., Valentine, F.T. and Lawrence, H.S. (1974). In vitro properties of leukocyte dialyzates containing transfer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 4: 1178.
- 9.- Eichberg, J.W., Steele, R.W., Kalter, S.S., Kniker, W.T., Heberling, R.L. and Eller, J.J. (1976). Cellular immunity in gnotobiotic primates induced by transfer factor. *Cell. Immunol.* 26: 114-119.
- 10.- Burger, D.R., Vandenbark, A.A., Finke, P. and Vetto, P.M. (1977). De novo appearance of KLH transfer factor following immunization. *Cell. Immunol.* 29: 410-413.
- 11.- Kirkpatrick, C.K. and Smith, T.K. (1976). Serial Transfer of delayed hypersensitivity with dialyzable transfer factor. *Cell. Immunol.* 27: 323-327.
- 12.- Giambrone, J.J., Lesius, P.H. and Yu, M. (1983). Adoptive transfer of delayed wattle reactivity in chickens with a dialyzable leukocyte extract containing transfer factor. *Poultry Sci.* 62: 767-771.

- 13.- Neidhart, J.A., Schwartz, R.S., Hurtubise, P.E., Murphy, S.G., Metz, E.N., Balcerzak, S.P. and LoBuglio A.F. (1973). Transfer Factor: Isolation of a Biologically active component. *Cell. Immunol.* 9: 319-323.
- 14.- Welch, T.M., Triglia, R., Spitler, L.E. and Fundenberg, H.H. (1976). Preliminary studies on human "transfer factor" activity in guinea pigs. *Clin. Immunol. Immunophatol.* 5: 407-415.
- 15.- Wilson, G.B., Welch, T.M., Knapp, D.R., Horsmanheimo, A. and Fundenberg, H.H. (1977). Characterization of Tx, an active subfraction of human dialyzable transfer factor. *Clin. Immunol. Immunophatol.* 551-568.
- 16.- Zuckerman, K.S., Neidhart, J.A., Balcerzak, S.D. and Lo Buglio, A.F. (1974). *J. Clin. Invest.* 54: 997-1000.
- 17.- Sandler, J.A., Smith, T.K., Manganiello, V.C. and Kirkpatrick, C.H. (1975). *J. Clin. Invest.* 50: 1271-1279.
- 18.- Kirkpatrick, C.H. and Smith, T.K. (1976). The identification and significance of hypoxantine in dialyzable transfer factor. In "Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation" D.O. Lucas, ed. by Acad. Press N. Y. p.174.

- 19.- Gottlieb. A.A., Foster. L.G., Saito. K., Sutcliff. S., Wrigley, P., Oliver. T., Cullen. M. and Fairley. G.H. (1976). Use of fluorescamine to identify a nonspecific component of human "Transfer Factor". In "Transfer Factor. Basic Properties and Clinical Applications". Acad. Press N.Y. 263-289.
- 20.- Miyagawa. Y., Kawasaki. A., Komiyawa. A. and Akabane. T. (1978). In vitro assay for responsiveness of lymphocytes to transfer factor by a new leukocyte migration inhibitory test. Microbiol. Immunol. 22: 11: 701-710.
- 21.- Petersen. E.A. and Kirkpatrick. C.H. (1979). Nature and activities of transfer factor. In Subcellular Factors in Immunity. H. Friedman. eds. Ann. N. Y. Acad. Sci. 332: 216-217.
- 22.- Burger. D.R., Vandebark. A.A., Dunnick. W., Kraybill. W., Daves. D.G. and Vetto M.P. (1979). Human transfer factor: structural properties suggested by HPRP chromatography and enzymatic sensitivities. J. Immunol. 122: 3.
- 23.- Wilson. G.B., Funderberg. H.H. and Paddock. G.V. (1979). Detection of dialyzable transfer factor in vitro: structural and chemical characterization of the activity specific for tuberculin. Ann. N. Y. Acad. Sci.

- 24.- Burger, D.R., Wampler, P.A., Vandenberg, A.A. and Regan, D.H. (1979). A structural models for human Transfer Factor. Ann. N. Y. Acad. Sci. 236-237.
- 25.- Burger, D., Vetto, R.M. and Klesius, P. (1983). Human Transfer Factor: Specificity and structural models. In "Immunobiology Transfer Factor". Kirkpatrick, C.H., Burger, D.R. and Lawrence, H.S. eds. Acad. Press N. Y. p. 33-50.
- 26.- Wilson G.B. and Funderberg, H.H. (1981). Leukocyte migration inhibition as method for assaying transfer factor activities. J. Lab. Clin. Med. 98: 819.
- 27.- Lawrence, H.S. and Borkowsky, W. (1981). Transfer factor: recent developments in the pursuit of an idea. Cell. Immunol. 62: 302-308.
- 28.- Lawrence, H.S. and Borkowsky, W. (1983). A new basis for immunoregulatory activities of transfer factor - an arcane dialect in the language of cells. Cell. Immunol. 82: 102-110.
- 29.- Borkowsky, W. and Lawrence, H.S. (1979). Effects of human leukocyte dialyzates containing transfer factor in the direct leukocyte migration inhibition (LMI) assay. J. Immunol. 123: 4: 1741-1748.

- 30.- Lawrence. H.S. (1968). In vitro correlates of delayed hypersensitivity. Fed. Proc. 27: 1.
- 31.- Borkowsky, W. and Lawrence. H.S. (1981). Deletion of antigen-specific activity from leucocyte dialyzates containing transfer factor by antigen-coated polystyrene. J. Immunol. 126: 2: 486-489.
- 33.- Wilson, G.B. and Funderberg, H.H. (1983). Is controversy about "transfer factor therapy" nearing to end?. Immunol. Today. 4: 6: 157-161.
- 34.- Levin, A.S., Spitler, L.E., Stites, D.P. and Funderberg, H.H. (1970). Wiskott-Aldrich syndrome. a genetically determined cellular immunologic deficiency: clinical and laboratory response to therapy with transfer factor. Proc. Natl. Acad. Sci. 67: 821.
- 35.- Griscelli, C., Revillard, J.P., Betuel, H., Herzag, C. and Touraine, J.L. (1973). Transfer Factor therapy in immuno-deficiencies. Biomedicine. 18: 220-227.
- 36.- Roda, E., Viza, R., Pizza, G., Mastroberto, L., Phillips, J., Vinci, C. and Barbara, L. (1985). Transfer factor for the treatment of HBsAg positive chronic active hepatitis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 178: 468-475.

- 37.- Levin. Byers. Fundenberg. Wybran. Hackett. Johnston and Spitler. (1975). Immunologic parameters before and during immunotherapy with tumor-specific transfer factor. J. Clin. Invest. 55: 487-499.
- 38.- Viza. D., Vich. J.M., Phillips. J., Rosenfeld, F. and Davis, D. (1986). Specific transfer factor protects mice against lethal challenge with herpes simplex virus. Cell. Immunol. 555-562.
- 39.- Fundenberg. H.H. (1985). Ophthalmologic Herpes Zoster: Complete Remission in six hours with dialyzable transfer factor. J. Clin. Invest. 18: 49-51.
- 40.- Corbeel. I., Ceuppens. J.L., Van denBerghe. G., Claeys. H. and Castels-Van Daele. M. (1984). Immunological observations before and after successful treatment of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole and transfer factor. Eur. J. Pedi. 143: 45-48.
- 41.- Cantanzaro. A. and Spitler. L. (1976). Clinical and immunologic results of transfer factor in coccidioidomycosis. In Transfer Factor Basic Properties and Clinical Applications. Kirkpatrick. C.H. eds. Academic Press New York. 477-493.
- 42.- Velazco. O., Estrada. S., Garcia. E. y Castro. E. (1974). El Factor de Transferencia como único recurso terapéutico en el

curso de la coccidioidomicosis crónica anérgica. Rev. Lat. Microbiol. 16: 137-141.

- 43.- Dundas, S.A. and Clark, A. (1986) The effect of Transfer Factor on lymph node morphology in murine toxoplasmosis. J. Exp. Path. 67: 181-190.
- 44.- Faber, W.R., Leiker, D.L., Nengermann, I. and Shellekens, T.A. (1979). A placebo controlled clinical trial of transfer factor in lepromatous leprosy. Infect. Immun. 33: 103.
- 45.- Reich, M., Affronti, L. and Wright, G. (1982). Isolation and partial characterization of the most immunologically reactive antigen from Mycobacterium tuberculosis H37Ra culture filtrate. Tubercle. 63: 99-106.
- 46.- Grange, J., Gilson, J. and Batty, A. (1980). The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in Tuberculosis. Tubercle. 61: 153-156.
- 47.- Estrada, S. (1983). La respuesta inmunológica y la tuberculosis. Salud Pública de México. 25: 403-409.
- 48.- Withcomb, M. and Rocklin, R.E. (1973). Transfer Factor therapy in patients with progressive primary tuberculosis. Ann. Inter. Med. 79: 161-166.

- 49.- Wybran, J., Levin, A., Spitler, L. and Funderberg, H.H. (1973). Rosette-forming cells, immunologic deficiency diseases and transfer factor. *New Engl. J. Med.* 288: 14: 710-713.
- 50.- Zielinski, C., Savoini, E., Ciotti, M., Orani, R. and Eibl, M. (1984). Dialyzate leucocyte (transfer factor) in the treatment of superinfected fistulating Tuberculosis of the bone. *Allergy.* 36:99
- 51.- Dwyer, J., Gerstenhaber, B. and Dobuler, K. (1983). Clinical and Immunologic response to transfer factor in drug-resistant infection with Mycobacterium xenopi. *Am. J. Med.* 74:180.
- 52.- Estrada, S., Velazco, O., Rebora, F. y Padierna, J. (1983). Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia especifico. *Salud pública de México.* 25: 6: 579-589.
- 53.- Mena, J., Solis, M., Rebora, G. y Estrada, S. (1978). Estudios inmunológicos en pacientes con Tuberculosis Pulmonar activa. Resúmenes II congreso Nacional de Inmunología. p. 24.
- 54.- Toossi, Z., Kleinherz, M.E. and Jerold, E. (1986). Defective Interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J. Exp. Med.* 163: 1162-1172.

- 55.- Bloom, B. and Glade, P. (1971). In "in vitro methods in cell mediated immunity". Acad. Press N.Y.p.55
- 56.- Littman, B.H., Hirschman, E.M. and David, J. (1977). Augmentation of H3-Thymidine incorporation by human lymphocytes in the presence of antigen and fractions of dialyzable transfer factor: a nonspecific phenomenon. Cell. Immunol. 28: 158-166.
- 57.- Stjernsward, J., Von A.V.E. and Wigzell, H. (1972). Lymphopenia in distribution of human band lymphocytes in peripheral blood-induced by irradiation for mammary carcinoma. Lancet. 1: 1352.
- 58.- Kent, J. and Fife, F. (1963). Precise standardization of reagents for complement fixation. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 103-116.
- 59.- Wilkinson, P.C. (1977). Neutrophil leucocyte function tests. In "Techniques in Clinical Immunology". R.A. Thompson ed., Blackwell Scientific Publications. Oxford. p. 201.
- 60.- Bulletin of the World Health Organization. (1982). Immunity in Tuberculosis. 50: 4: 447-462.
- 61.- Gino, S., Garcia, R., Felix, B., Aquino, S., Escamilla, A. y Vega, L. (1979). Manual de Laboratorio de Laboratorio. Departamento de Bacteriología. Instituto Politecnico Nacional. México, D.F. 2a. Ed.: 86-110.

- 62.- Runyon, E., Karlsen, A. and Kubica, E. (1982). En "Mycobacterium". Manual de Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 3a. Ed.

