

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO



TESIS

MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE A TRAVES
DE LA EXPRESION DE CITOCINAS INDUCIDAS POR LPS
CON EL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS
DE ORIGEN HUMANO Y BOVINO

COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PRESENTA

Q.F.B. JUANA MARIA REYNA REYES

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MEXICO
MARZO DEL 2000

20000
EL DEXTRACIO DIALEZABIE DIE LEUCOCITOS

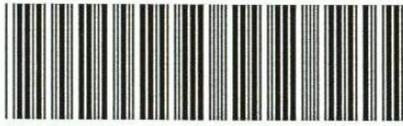
TM

Z5320

FCB

2000

R4



1020130137

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



T E S I S

**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE A TRAVÉS DE
LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS INDUCIDAS POR LPS
CON EL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS DE
ORIGEN HUMANO Y BOVINO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA**

P R E S E N T A

Q. F. B. JUANA MARÍA REYNA REYES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L., MÉXICO; MARZO DEL 2000

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



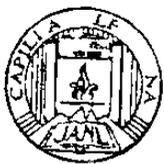
COMISIÓN DE TESIS

Presidente
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario
Dr. Reyes S. Tamez Guerra

Vocal
Dr. Ricardo Gómez Flores

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L., MÉXICO; MARZO DEL 2000



FONDO
TESIS

*En memoria de
Manuel Valadez Reyes*

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS	v
LUGAR DE TRABAJO	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
 Capítulo 1 INTRODUCCIÓN	
1.1. Respuesta Inmunológica y Modificadores de la Respuesta Biológica	1
1.2. Efectos Biológicos y Mecanismo de Acción del Extracto Dializable de Leucocitos	6
1.2.1. Estructura y Caracterización del Extracto Dializable de Leucocitos	8
1.2.2. Uso Clínico del Extracto Dializable de Leucocitos	12
1.2.2.1. Enfermedades Virales	13
1.2.2.2. Enfermedades Infecciosas por Bacterias Hongos y Parásitos Intracelulares	14
1.2.2.3. Tratamiento de Neoplasias	16
1.2.2.4. Tratamiento de Alergias	16
1.3. Propiedades Biológicas del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α)	17
1.3.1. Inhibición de la Síntesis de TNF- α	20
1.4. Hipótesis	21
1.5. Objetivo General	21
1.5.1. Objetivos Específicos	21

Capítulo 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación del Extracto Dializable de Leucocitos.....	23
2.1.1. Fuente de Leucocitos	23
2.1.1.1. Extracto Dializable de Leucocitos Humano (EDLH)	23
2.1.1.2. Origen del Extracto Dializable de Leucocitos Bovino (EDLB)	24
2.1.2. Proceso de Lisis Celular, Diálisis y Almacenamiento	24
2.1.3. Pruebas de Esterilidad	24
2.1.3.1. Determinación de Endotoxinas.....	24
2.1.3.2. Determinación de Pirógenos	25
2.1.3.3. Plaqueo para la Investigación de la presencia de Bacterias.....	25
2.2. Diseño Experimental	26
2.3. Determinación de la Inhibición de la Producción de TNF- α Inducido por LPS en Sangre Completa	27
2.4. Aislamiento de Células Mononucleares Periféricas	27
2.5. Método Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Expresión de Citocinas TH ₁ , TH ₂ , pro-Inflamatorias y anti-Inflamatorias en Células Mononucleares Periféricas estimuladas con Extracto Dializable de Leucocitos.....	28
2.5.1. Extracción de RNA apartir de Células Mononucleares Periféricas.....	28
2.5.2. Cuantificación de la Cantidad y Calidad del RNA	28
2.5.3. Producción de DNA Complementario (DNAc).....	29
2.5.4. Detección de la Expresión de Citocinas TH ₁ y TH ₂ en Células Mononucleares Periféricas estimuladas con Extracto Dializable de Leucocitos de Bovino por PCR.....	29
2.5.5. Detección de la Expresión de Citocinas pro-Inflamatorias y anti-Inflamatorias en Células Mononucleares Periféricas	

estimuladas con Extracto Dializable de Leucocitos utilizando un MultiPCR (Maxim Biotech Inc.)	30
Capítulo 3 RESULTADOS	
3.1. Inhibición de la Producción de TNF- α por el Extracto Dializable de Leucocitos de Origen Humano y Bovino en Sangre Completa Estimuladas con LPS	32
3.2. Efecto del Extracto Dializable de Leucocitos de Origen Humano y Bovino en la Expresión de RNAm que codifican para Citocinas TH ₁ y TH ₂ en Sangre Completa estimulada con LPS	33
3.3. Efecto del Extracto Dializable de Leucocitos de Origen Humano y Bovino en la Expresión de RNAm que codifican para Citocinas pro-Inflamatorias y anti-Inflamatorias por MultiPCR	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍAS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Inmunoregulación entre TH ₁ y TH ₂	2
2	Fallas en la Respuesta Inmunológica	3
3	Modificadores de la Respuesta Biológica	5
4	Modelo estructural de Burger y colaboradores para el Factor de Transferencia Humano	10
5	Modelos estructurales de Fudenberg y colaboradores para el Factor de Transferencia Humano	11
6	Modelo estructural de Wilson y colaboradores para el Factor de Transferencia Bovino	12
7	Actividades Biológicas del TNF- α	18
8	Vías de Inhibición del TNF- α	20
9	Diagrama de Flujo del diseño experimental para determinar el efecto del EDL en la inhibición de la producción del TNF- α inducido por LPS en sangre completa	26
10	Inhibición de la producción del TNF- α inducido por Lipopolisacárido (LPS) con Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB) en sangre completa	33
11	Análisis de la expresión de G3PDH (452 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB)	34
12	Análisis de la expresión de IL-2 (305 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB)	35
13	Análisis de la expresión de INF- γ (427 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB)	35

14	Análisis de la expresión de IL-4 (456 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB)	36
15	Análisis de la expresión de IL-10 (426 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB)	36
16	Análisis de la expresión por multi-PCR de G3PDH (921 pb), TNF- α (680 pb), IL-1 β (556 pb), IL-12p40 (432 pb), IL-6 (359 pb), IL-8 (300 pb) e IL-10 (223 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB)	38

ÍNDICE DE CUADROS

1	Vías de Acción de los Modificadores de la Respuesta Biológica	5
2	Casos en donde el EDL se ha utilizado como Terapia	13
3	Enfermedades Humanas relacionadas con concentraciones detectables de TNF- α plasmáticas	19
4	Agentes que inhiben al TNF- α	21
5	Secuencias de los Oligonucleótidos para amplificar los genes de las citocinas TH ₁ y TH ₂	30
6	Programa de amplificación de los genes que codifican para las citocinas TH ₁ y TH ₂	30
7	Programa de amplificación de los genes que codifican para las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por multiPCR	31
8	Pares de bases de los genes amplificados por multiPCR para las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias	31

LUGAR DE TRABAJO

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y la co-dirección del Dr. Reyes S. Tamez Guerra.

DEDICATORIA

A ti Señor, por haberme dado la vida y permitirme llegar felizmente a este día.

A mis Padres; Sr. Margarito Reyna Martínez y Sra. María de Jesús Reyes Esparza. Gracias, porque nunca escatimaron en esfuerzos. Por el apoyo y ejemplo que en cada segundo de mi vida me brindaron. Por sus cuidados, amor y comprensión. Por sus sabios consejos que me orientaron, por el camino recto de la vida.

A mis hermanos; Jesús Francisco y Gabriel Margarito Reyna Reyes. Porque de ustedes, aprendí que "Soñar" es un regalo de Dios, que nos permite sentir anticipadamente la dicha que será ver un sueño realizado, que es un gran don que nos hace enfrentar la vida con un "SÍ". Trabajar por un sueño, es siempre una alegría si se tiene la certeza de que Dios está con nosotros. Nada tiene más valor que un sueño y sólo nosotros mismos lo podemos alcanzar definiendo y limpiando el camino para llegar a él, sin olvidar que los grandes hombres son productos de sus grandes sueños y que lo mucho exige mucho.

A mis amigas y amigos; Edna Ponce, Laura Hernández, Víctor Bermúdez, Linda Vielma, Lydia Rivera, Irma Martínez y Edgar Mendoza; a todos ustedes que me enseñaron a recibir cada día con alegría. Porque no hay motivo de tristeza: "Cada día es un nuevo día", en que podemos cambiar nuestras conductas, amar con ternura, hacer el bien... Tal vez ayer lloramos... pero; "Hoy es un nuevo día".

A ti Joan Toni Garau, que a pesar de la distancia me enseñaste a disfrutar de las cosas mas bellas de este mundo de "tu amistad" ; gracias por ser como eres... T'estim molt.

A todos ustedes, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Desde pequeña tuve una ilusión muy grande; el estudiar el área de la *Inmunología*. “Hoy”, se ha hecho realidad y agradezco a la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla** y al **Dr. Reyes S. Tamez Guerra**, por abrirme las puertas de su laboratorio, de su conocimiento y de su amistad. Les agradezco su invaluable apoyo, asesoría y facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo. Sin embargo, esto no hubiese sido posible sin la colaboración de miles de personas e instituciones, que participaron para la cristalización de este sueño, como son: la **Facultad de Ciencias Biológicas** de la **UANL**, que formó parte fundamental al darme su aceptación al programa de Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunobiología, por medio de la **División de Estudios de Postgrado**, dirigido acertadamente por la **Dra. Julia Verde Star**; así como al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, que me permitió lograr la obtención de este grado al otorgarme una Beca-crédito.

Durante la realización de este trabajo de investigación, conocí mucha gente que de una u otra manera me hicieron crecer como persona y como profesionista, ellos son mis compañeros del **Laboratorio de Inmunología y Virología**, a muchos de ellos los conocí desde el inicio de mis actividades, otros en el transcurso y otros mas al final de unas de mis metas.

Un aspecto muy importante para la cristalización de este proyecto fue la asesoría, capacitación y las enseñanzas brindadas muy amablemente por el Biol. Víctor Hugo Bermúdez, la MC Irma Martínez, el Dr. Edgar Mendoza y el Dr. Ricardo Gómez Flores.

De igual manera, agradezco sinceramente el apoyo incondicional en la realización de la mayoría de los experimentos que conforman este proyecto, al QBP Leonardo Castillo; también de manera muy especial le agradezco al QBP Sigifredo Lazcano así como a Laura Hernández López, quienes muy amablemente donaron sangre en repetidas ocasiones para la realización de los experimentos que aquí se exponen.

Doy las gracias también, por su apoyo y sugerencias al trabajo de laboratorio y por su amistad al: MC Herminio Fuentes, Dr. Pablo Zapata, Dr. Juan Manuel Alcocer, MC Eugenio Román, Biol. Esther Treviño, QBP José Luis Méndez, Dra. Lydia Rivera, QBP Linda Vielma, Itza Luna, Nelly González y a todas aquellas personas que como el Dr. Alberto Morales participó de manera anónima en este proyecto.

No quiero finalizar este escrito sin antes agradecerle a la secretaria Beatriz Reyna, su apoyo para la realización de este escrito, así mismo a Esperanza, Bertha y Catarino quienes de alguna manera estuvieron involucrados en este proyecto.

Sinceramente

Juana María Reyna Reyes



SOÑAR

*Si tienes un sueño
no pierdas la fe en que se va a realizar.
No dejes de acariciarlo en tu mente
aunque lo veas muy lejano.*

*De vez en cuando sácalo de lo más hondo,
en donde esta guardado,
revívelo y vuelve a acariciarlo.*

*Plátcaselo a Dios
y espera con paciencia
el momento de verlo realizado
y un hermoso día
estarás acariciando tu sueño
hecho realidad...*

Joana

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

HCl	Acido clorhídrico	TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
DNAc	Acido desoxirribonucleico complementario	FT	Factor de Transferencia
DNA	Acido desoxirribonucleico	LIF	Factor Inhibidor de Leucocitos
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero	MIF	Factor Inhibidor de Macrófagos
RNA	Acido ribonucleico	PHA	Fitohemaglutinina
ADP	Adenosin difosfato	G3PDH	Gene gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
EMB	Agar eosina azul de metileno	°C	Grados centígrados
S110	Agar para estafilococos No. 110	g/ml	Gramos por mililitro
Ag	Antígeno	CD40	Grupo de Diferenciación para linfocitos B
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin	CD2	Grupo de Diferenciación para linfocitos T
CPA	Célula presentadora de antígeno	CD8	Grupo de Diferenciación para linfocitos T citotóxico/supresor
NK	Células asesinas naturales	CD4	Grupo de Diferenciación para linfocitos T cooperadores
CMP	Células Mononucleares Periféricas	CD28	Grupo de Diferenciación para subpoblación de linfocitos T y linfocitos B activados
Citocinas TH₂	Citocinas IL-4 e IL-10	HZS	Herpes Zoster Sistémico
Citocinas TH₁	Citocinas IL-2 e INF- γ	NaOH	Hidróxido de Sodio
CMV	Citomegalovirus	h	Hora
ADCC	Citotoxicidad Celular dependiente de Anticuerpo	TSH	Hormona estimulante de la Tiroxina
KCl	Cloruro de Potasio	INF-γ	Interferón gamma
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	RNA_{sin}	Inhibidor de la enzima ribonucleasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución	IC	Inmunidad Celular
Da	Daltons	IgE	Inmunoglobulina tipo E
dATP	Deoxinucleotido Adenintrisfotato	IMREG-1	Inmunoregulador tipo 1
dCTP	Deoxinucleotido Citosintrisfotato	IMREG-2	Inmunoregulador tipo 2
dTTP	Deoxinucleotido Timidintrisfotato	IL-1β	Interleucina 1 beta
dGTP	Deoxinucleotido Guanidintrisfotato	IL-2	Interleucina 2
PPD	Derivado de la proteína purificada del bacilo de la tuberculosis	IL-4	Interleucina 4
DEPC	Dietilpirocarbonato	IL-5	Interleucina 5
CO₂	Dióxido de carbono	IL-6	Interleucina 6
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas	IL-10	Interleucina 10
DNasa	Enzima desoxirribonucleasa	IL-12	Interleucina 12
RNasa	Enzima ribonucleasa	IL-12p40	Interleucina 12 p 40
M-MLV	Enzima Transcriptasa Reversa de la Leucemia Moloney Murina	IL-13	Interleucina 13
EDLB	Extracto Dializable de Leucocitos de origen Bovino	TH	Linfocito T cooperador
EDLH	Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano	LPS	Lipopolisacárido
EDL	Extracto Dializable de Leucocitos	LAL	Lisados de Amebocitos de Limulus
MAF	Factor Activador de Macrófagos	UV	Luz Ultravioleta
		RT-PCR	Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la Polimerasa

MGA	Métodos Generales de Análisis	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
dNTP	Mezcla de deoxinucleótidos	RI	Respuesta Inmunológica
µl	Microlitro	rpm	Revoluciones por minuto
µm	Micrómetros	seg	Segundo
mg/ml	Miligramo por mililitro	SFC	Síndrome de Fatiga Crónica
ml	Mililitro	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
ml/min	Mililitros por minuto	ACD	Solución de anticoagulante de Dextrosa-Citrato
mm	Milímetro	Tris-HCl	Tris-Acido clorhídrico
mM	Milimolar	U	Unidad
min	Minuto	U/µl	Unidades por microlitro
MRB	Moduladores de la Respuesta Biológica	U/ml	Unidades por mililitro
ng/ml	Nanogramos por mililitro	VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
nm	Nanómetro	VEB	Virus del Epstein-Barr
N	Normalidad	VHS	Virus del Herpes Simple
pb	Pares de bases	HVH6	Virus Linfotrópico Herpético
pg/ml	Picogramos por mililitro	VVZ	Virus Varicela Zoster
%	Porcentaje		
pH	Potencial Hidrógeno		

RESUMEN

El Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) es una sustancia inmunomoduladora utilizada como terapia en la inmunodeficiencia y en las infecciones crónicas. El TNF- α está relacionado con algunas enfermedades que desencadenan un proceso inflamatorio, como son: el choque séptico, SIDA, esclerosis múltiple, etc. En el presente estudio probamos el efecto *in vitro* del EDL de origen humano y bovino en la inhibición del TNF- α inducido por Lipopolisacárido (LPS) en sangre completa, así como su capacidad para modular el perfil de citocinas pro y anti-inflamatorias. Al cultivar células mononucleares con EDL humano o bovino y LPS por 5 horas, la inhibición de la producción del TNF- α fue dependiente de la concentración del EDL, es decir; a mayor concentración de EDL mayor es la inhibición del TNF- α . Además se realizó RT-PCR de cada dichos tratamientos observándose la expresión de RNAm que codifican para las citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-4 (citocinas TH₂), además de una inhibición en los mensajeros de las citocinas INF- γ y TNF- α (citocinas pro-inflamatorias). Estos resultados sugieren que el efecto del EDL en la inhibición de la producción de TNF- α inducido por LPS es debido al potencial inmunomodulador; además, los extractos de origen no humano pueden ser utilizados como alternativa terapéutica. El EDL puede ser utilizado como terapia en enfermedades relacionadas con procesos de tipo inflamatorio.

ABSTRACT

Dialyzable leucocytes extract (DLE) is a immunomodulator substance used on immunodeficiency and chronic's infections. Tumor Necrosis Factor (TNF) is related with inflammation process diseases, such as: shock septic, AIDS, multiple sclerosis, and others. In the present study we tested the effect of the DLE from human or bovine source in the inhibition of the production Lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α on whole blood. When the monocytic cells were simultaneously exposed with DLE from human or bovine and LPS by 5 hours, the inhibition of TNF- α production were dependent to concentration of DLE. By RT-PCR shown the expression of mRNA for anti-inflammatory cytokine IL-10 and IL-4 (TH₂ cytokine) and the inhibition of the mRNA for INF- γ and TNF- α (pro-inflammatory cytokine). These data suggest that the effect of the DLE on the inhibition of production Lipopolysaccharide-induced TNF- α is by its immunomodulator potential on pro and anti-inflammatory cytokines, the DLE from bovine source is also use as therapeutic alternative. The DLE can be use in therapy of diseases related with inflammatory process.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Respuesta Inmunológica y Modificadores de la Respuesta Biológica

La respuesta inmune (RI), permite al organismo detectar, confinar y eliminar microorganismos en general así como células malignas, incluyendo neoplásicas.¹

La respuesta inmune específica o adquirida se inicia cuando una célula de las llamadas células presentadoras de antígeno (CPA), como macrófagos o dendríticas, captan al antígeno (Ag) en su interior lo rompen en pequeños fragmentos (péptidos), y los incorporan a las moléculas llamadas presentadoras de antígeno, producto de los genes del llamado complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de los cuales hay varias clases siendo las más importantes Clase I y Clase II. Las moléculas de la clase I presentan a linfocitos T citotóxicos (CD8) y las moléculas de la clase II a linfocitos T cooperadores (CD4). Una vez que los linfocitos T entran en contacto con la CPA y reconocen el péptido, requieren de una segunda señal para activarse la cuál esta dada por las moléculas de coestimulación (CD40, CD28 y sus ligandos respectivos), presentes tanto en la célula presentadora como en los linfocitos. Si todo lo anterior se cumple los linfocitos que fueron capaces de reconocer a esos péptidos tanto clase I como en clase II se dividen y diferencian formando lo que se denomina una "clona".^{1,79}

De los linfocitos T cooperadores CD4, existen a su vez dos subpoblaciones TH₁ y TH₂ reconocidas solo por las sustancias que producen, llamadas citocinas. La población TH₁, una vez activada es la responsable de la llamada inmunidad celular, que nos permite eliminar microorganismos intracelulares. La población TH₂, coopera con los linfocitos B para una adecuada producción de anticuerpos (inmunidad humoral). Existe un fino balance entre las subpoblaciones TH₁ y TH₂, y un desequilibrio entre éstas puede conducir a infecciones, fenómenos de alergia o autoinmunidad y a una alteración en la RI en general. Las dos subpoblaciones se regulan por medio de la elaboración de citocinas en forma cruzada, así TH₁ produce interferón gamma (IFN- γ), que inhibe a TH₂ y a su vez TH₂ produce interleucina 10 (IL-10) que inhibe a TH₁ (Figura 1).⁵⁶

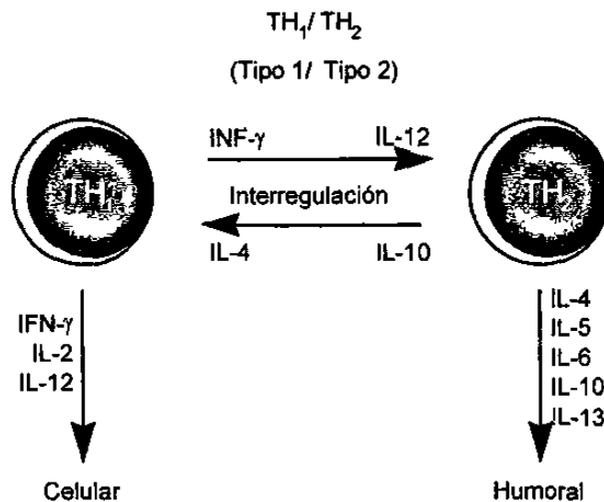


Figura 1. Inmunoregulación entre TH_1 y TH_2 . Hay dos subpoblaciones de células T, que se distinguen por la síntesis de citocinas. La subpoblación TH_1 produce $INF-\gamma$, IL-2 e IL-12 y la TH_2 , se caracteriza por sintetizar IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. El balance entre la producción de citocinas regula la respuesta inmune.⁴⁷

Los anticuerpos, producidos por los linfocitos B activados, junto con el complemento promueven el fenómeno inflamatorio. Este conduce a la salida de los leucocitos de la sangre, los cuales llegan a donde están los gérmenes por acción quimiotáctica seguida de opsonización y muerte de los microorganismos en el interior de los fagocitos, neutrófilos y macrófagos, por acción de las sustancias microbicidas oxidantes derivadas del oxígeno y nitrógeno. Algunas de estas sustancias son el agua oxigenada, el anión superóxido, el radical oxhidrilo, los halógenos activados, el hipoclorito, el clorito y el óxido nítrico. Desgraciadamente el mecanismo anterior no es suficiente para eliminar a los microorganismos intracelulares. Para eliminarlos es necesario que los linfocitos T, que reconocen al antígeno, promuevan el fenómeno inflamatorio (vía inmunidad celular), lo cual se lleva a cabo porque los linfocitos T liberan citocinas que hacen esencialmente lo mismo que en la inflamación mediada por anticuerpos y complemento pero con una diferencia importante, las citocinas producidas activan a los macrófagos y ahora estos son capaces de eliminar a los microorganismos intracelulares.^{1,79}

Hasta ahora solo hemos visto como la RI, es capaz de protegernos y esto representa una ventaja selectiva importante. Sin embargo, también es capaz de causar daño como autoinmunidad, hipersensibilidad o alergia.⁷⁹ (Figura 2)

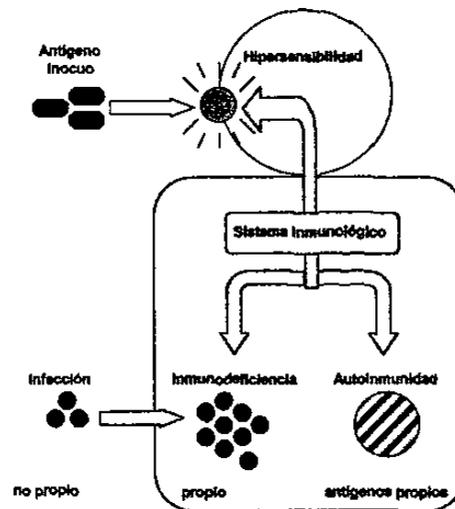


Figura 2. Fallas en la Respuesta Inmunológica. (a) Hipersensibilidad, (b) Inmunodeficiencia y (c) Autoinmunidad.⁸²

La mejor clasificación de las alergias fue la elaborada por Coombs y Gell, que consideran cuatro tipos. El Tipo I o mediada por reargininas, es la alergia clásica causada por anticuerpos de la clase IgE, por ejemplo; choque anafiláctico, asma bronquial extrínseco y rinitis alérgica.⁷⁹ El Tipo II, involucra los procesos de autoinmunidad e hipersensibilidad, distinguiéndose tres subtipos: a) Subtipo II citotóxico, ocurre cuando una célula blanco se recubre de anticuerpos fijadores de complemento lo cual la conduce a la lisis, o ser opsonizada por macrófagos o eliminada por el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), b) Subtipo II de forma estimuladora, es una patología en la cual un autoanticuerpo dirigido contra el receptor de la hormona estimulante de la tiroxina (TSH), en las células tiroideas estimula la producción exagerada de la hormona con un consecuente hipertiroidismo y el c) Subtipo II forma neutralizante puede ser ejemplificado por autoanticuerpos dirigidos

contra los islotes del páncreas que impiden una producción adecuada de insulina produciendo hiperglicemia.⁷⁹

La hipersensibilidad tipo III está mediada por complejos inmunes. Esta patología es relativamente frecuente y se da fundamentalmente en infecciones crónicas o en padecimientos autoinmunes (lupus eritematoso), solo que en este caso se forman complejos antígeno-anticuerpo (complejos inmunes) cuando hay un exceso de antígeno, lo que ocasiona que sean solubles y ante cualquier estímulo aumente la permeabilidad capilar y estos salgan de los vasos y lesionen arteriolas en órganos de gran importancia como son: los riñones, las articulaciones, la piel y el corazón.⁷⁹

La última llamada hipersensibilidad tipo IV, llamada también mediada por células, se debe a la producción exagerada y constante de mediadores (citocinas), derivados principalmente de las células mononucleares, linfocitos y monocitos que conducen a procesos inflamatorios crónicos, como por ejemplo; las lesiones en la tuberculosis pulmonar.⁷⁹

La estrategia que se ha seguido para tratar de corregir las deficiencias en el funcionamiento del sistema inmunológico ha sido el utilizar modificadores de la respuesta biológica conocidos también como inmunomoduladores. Un inmunomodulador es una sustancia que directa o indirectamente modifica uno o más componentes de la respuesta inmune del huésped con el objetivo de tener un beneficio. Estas sustancias median sus efectos activando, aumentando y/o restableciendo los mecanismos efectores inmunológicos o bien inhibiendo los mecanismos supresores.⁵⁶ En la Figura 3 y el Cuadro 1 se observan algunos inmunomoduladores y 7 vías de acción que ejercen los mismos.

El Factor de transferencia (FT), es una preparación heterogénea con efectos demostrados sobre el sistema inmune, en la última década ha sido empleado como "Terapia Inmunomoduladora inespecífica o específica". Es un material dializable, aparentemente un ribonucleopéptido de bajo peso molecular, no inmunogénico, obtenido a partir de leucocitos humanos o de otro origen que se prepara específicamente hacia un antígeno (Ag) determinado; como su nombre lo indica tiene la capacidad de transferir inmunidad de un individuo inmune a otro que no tenga respuesta.

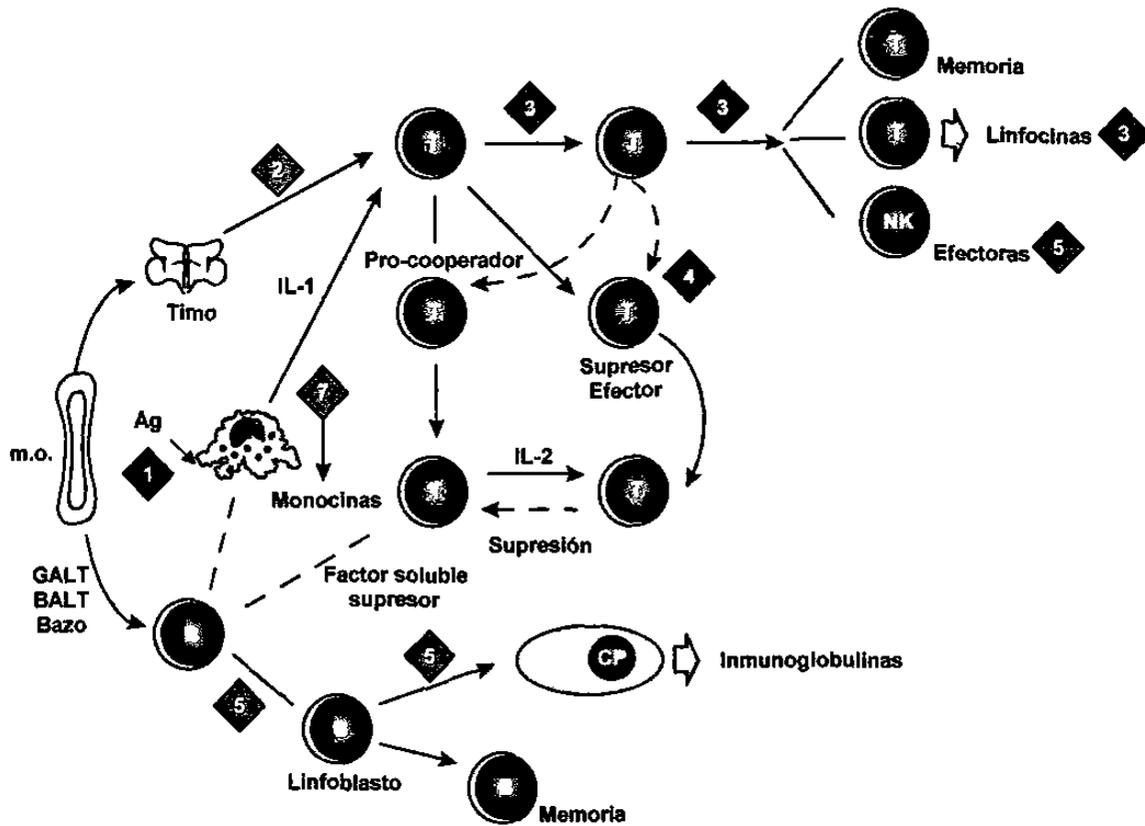


Figura 3. Modificadores de la Respuesta Biológica. Representación esquemática de las diferentes vías de acción que ejercen los Modificadores de la Respuesta Biológica en la respuesta inmune.

Cuadro 1. Vías de Acción de los Modificadores de la Respuesta Biológica

Vías	Efecto Inmunológico	Modificador de la Respuesta Biológica (MRB)
Vía 1	Activación de macrófagos	BCG, <i>C. parvum</i> , Glucan, MDP, Bestotin, Linfocinas (MAF, MIF), Anfotericina B
Vía 2	Diferenciación de células T	Timosina, Timomodulin, Timopeptina, Levamisol, Isoprinosine
Vía 3	Diferenciación o activación de células T	Levamisol, TP1 y TP2, Isoprinoside, BCG, Vitamina A, Timosin α 1
Vía 4	Supresor de células T	Timosin, Timosin α 1, Timomodulin, <i>C. parvum</i>
Vía 5	Efecto sobre células B	Cimetidina, Isoprinoside, IFN, BCG, <i>C. parvum</i> , Lentinan
Vía 6	Incremento en la respuesta de células T	Azimexon, Tilorona, BCG, Lentinan, IFN, <i>C. parvum</i>
Vía 7	Monocinas secretadas por macrófagos activados	IL-6, IL-10, IL-12

Actualmente se da el término del Factor de Transferencia a compuestos, que median la respuesta de los linfocitos T que son antígeno específico. Se usó el término de "Extracto dializable de leucocitos" del FT (EDL-FT), para describir al producto enriquecido por un procedimiento adicional que elimina moléculas mayores de 12,000 Da.³² Se sabe que los extractos obtenidos por el método de Lawrence contienen al menos 200 diferentes moléculas con pesos moleculares de 1000 a 20000 Da y solamente uno de ellos es antígeno-específico: el FT es de un peso molecular de aproximadamente 3500 Da.³³

El interés del EDL comenzó cuando se demostró el beneficio clínico que ofrecía su administración en ciertas enfermedades relacionadas con una deficiencia inmune celular, y cuando hay falta de respuesta a las terapias convencionales: 1) Enfermedades infecciosas causadas por micobacterias, hongos, virus y parásitos; 2) Neoplasias; 3) Inmunodeficiencias congénitas y adquiridas; 4) Enfermedades autoinmunes e 5) Hipersensibilidad inmediata (Alergias); considerándose su empleo clínico libre de efectos secundarios.

Pese a todo esto, existe un escepticismo respecto a su valor terapéutico por parte de los especialistas, debido a que no se conoce con exactitud su mecanismo de acción y estructura.

1.2. Efectos Biológicos y Mecanismo de Acción del Extracto Dializable de Leucocitos

El primer estudio *in vitro* sobre el fenómeno de transferencia específica de antígeno con Factor de Transferencia, fue realizado por Fireman y col. en 1967; a partir de esa fecha se han observado múltiples efectos debido a la gran actividad biológica del Factor de Transferencia en pacientes.³¹

El EDL no solamente puede transferir la positividad a las pruebas cutáneas de hipersensibilidad tardía, también produce o inicia otras reacciones de inmunidad celular (IC) como en el caso de inmunodeficiencias (Síndrome de Wiskott-Aldrich o Coccidiomycosis crónica); se ha visto una inmunidad celular ya que se produce el Factor Inhibidor de Macrófagos (MIF) y el Factor de Inhibición de Leucocitos (LIF).^{11,45}

Cuando se incuban células no “respondedoras” a antígeno con dializados de leucocitos después de cierto tiempo, éstas se convierten en productoras de LIF.⁹⁰ Gottlieb, demostró que existen dos componentes de 3500 Da, capaces de amplificar la producción *in vitro* de LIF y MIF en células T CD4, pero no en células T CD8.³⁶ Dentro del extracto dializable de leucocitos se encontraron sustancias inespecíficas de antígeno que actúan directamente sobre la producción de linfocinas por células T; las denominó inmunoreguladores IMREG-1 e IMREG-2, por poseer la capacidad de incrementar la estimulación inducida por fitohemaglutinina (PHA), aumentar la producción de IL-2, así como el número de sus receptores sobre células T.³⁷

Lawrence detectó dos actividades opuestas del Factor de Transferencia específico de antígeno, probando extractos de leucocitos cuyas moléculas oscilan entre 3500 a 12000 Da: a) una respuesta con función inductora/cooperadora, que denominó Factor Inductor y b) una función supresora denominada como Factor Supresor; éstas actividades se observaron cuando poblaciones de leucocitos no inmunes se cultivaban en presencia del Factor Inductor, donde los leucocitos adquirían la capacidad de responder al antígeno en forma específica; además, inhibía la migración de los mismos al cultivarlos en presencia del Factor Supresor, donde la respuesta específica al antígeno se bloqueaba y se prevenía la inhibición de la migración.⁵³

Se ha observado que el EDL contiene un factor que potencia la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (NK), sobre líneas celulares establecidas (K562, Daudi, HT29 Raji y MOLT4) induciendo que estas liberen INF- γ . A este factor se le denominó CySF-L2, cuyo peso molecular oscila en los 1000 Da es resistente al tratamiento con proteasas y exopeptidasas pero sensible al tratamiento con endoglicosidasa F.^{18,19,39}

El EDL induce otros efectos biológicos *in vitro* como: el incremento de la expresión de CD2 en linfocitos T, la activación de monocitos/macrófagos y la producción de Interleucina-1 (IL-1), inhibe la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), mejora la actividad defectuosa de la quimiotaxis de los leucocitos y mejora la función de las células asesinas naturales (NK). En estudios *in vivo*, demuestran que el EDL aumenta la reacción contra injerto en pacientes inmunodeprimidos y aumenta la ADCC y la actividad de las células NK.^{20,35,65,66,67}

La acción inmunomoduladora del EDL, también se manifiesta por un aumento en la actividad fagocítica de los neutrófilos y macrófagos, un aumento en la población de

linfocitos T, un aumento en la síntesis de receptores de células T para la formación de rosetas y un aumento en el número de células formadoras de anticuerpo.^{42,43,64}

Otra actividad importante *in vitro* es que el EDL inespecífico de antígeno, tiene la capacidad de inhibir la actividad de la transcriptasa reversa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) así como de inhibir la producción del antígeno p24.^{28,80}

El índice de proliferación celular y la síntesis de DNA, son eventos que se presentan en sujetos normales pero no en pacientes inmunodeficientes, sin embargo cuando estos pacientes son tratados con EDL son capaces de recobrar dicha capacidad *in vitro*, aunque esto no ocurre en la mayoría.^{11,45}

A pesar de las riquezas en efectos biológicos que nos ofrece el EDL, su mecanismo de acción no ha sido totalmente esclarecido. Hamblin y Dumonde, fueron los primeros en mencionar que el FT actuaba como un expansor clonal. También se ha sugerido que el FT contiene la información instruccional o genética específica para generar en células no sensibles la capacidad de responder a ciertos antígenos, el autor también menciona que el FT funciona desreprimiendo células previamente sensibilizadas las cuales son capaces de responder.^{6,13,38,54}

Lawrence y Borkowsky, postularon que la actividad específica de antígeno en el EDL arma subpoblaciones de células T directa o indirectamente vía macrófagos a través de una estructura específica que se une al antígeno.⁵² Datos recientes sugieren que la transferencia de la información inmunológica específica, dada por las moléculas del EDL requiere de la interacción con una célula que ha sido genéticamente programada para ser reactiva a un antígeno (activo), pero el tiempo de interacción no está establecido. Las moléculas del EDL interactúan de igual manera a las regiones variables del receptor de células T las cadenas alfa y/o beta, para modificar su avidéz y afinidad por el antígeno.²¹

1.2.1. Estructura y Caracterización del Extracto Dializable de Leucocitos

Los primeros intentos para purificar el FT fueron realizados por Baram y Mosko en 1965, en un principio utilizaron columnas de DEAE celulosa y observaron que había fracciones capaces de transferir sensibilidad a la tuberculina; una de ellas la denominaron C-5, y la

caracterizaron como un polinucleótido compuesto de adenina, guanina y citocina; la otra fracción activa la designaron como A-1, la cuál no era dializable, eluía con la fracción de las γ -globulinas y contenía ribosa.⁵ Arala-Chávez, mediante electroforesis de alto voltaje determinó que las fracciones activas contienen proteínas.⁴

Durante la década de los 70's, los diferentes grupos de investigación utilizaron la filtración en gel para obtener sustancias activas contenidas en los dializados de extractos celulares crudos; después esta metodología solamente se utilizó como una etapa previa para el fraccionamiento de materiales activos, para posteriormente utilizar la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) como paso final. De este modo fue posible obtener diferentes fracciones para probar la actividad en cada uno de ellas.⁶³

El EDL se ha fraccionado por cromatografía en Sephadex G-10, procedimiento por el cuál se han obtenido 7 fracciones de las cuales 3 presentan actividad de Factor de Transferencia; sin embargo cuando es separado mediante Sephadex G-15 se obtienen tres fracciones siendo solamente una fracción la que presenta capacidad de inhibir la replicación del VIH.²³ Por otra parte, cuando el EDL es fraccionado mediante Sephadex G-25, se obtienen 6 fracciones, siendo la cuarta fracción la responsable de la hipersensibilidad tardía en cobayos.^{47,63} Esta fracción contiene ácidos nucleicos y proteínas en una relación UV 254/280 de 5 y tiene un punto isoeléctrico de 1.6 y si se subfracciona por cromatografía en biogel P-2 o P-4, se obtienen las fracciones Tg1 y Tx, siendo esta última la que presenta mayor hipersensibilidad retardada. La hipoxantina es el principal componente en ambas subfracciones pero se determinó que no juega un papel directo en la inducción de respuesta específica e inespecífica.^{85,90} Posteriormente separaron la fracción Tx en dos subfracciones diferentes por medio de HPLC.⁸

Con el propósito de encontrar un modelo estructural del EDL, se empezaron a realizar estudios enzimáticos. Uno de los primeros trabajos fue el de Lawrence, quién determinó que el FT es resistente a DNasa, RNasa pancreática y Tripsina, sugiriendo que la molécula activa del FT, es un nucleótido unido a un carboxilo terminal del péptido.⁵⁰

Burger propuso un modelo con algunas características interesantes: en donde el FT esta formado por un azúcar unido a un nucleótido (ADP-Ribosa) y un péptido; determinando que una fracción polipeptídica es importante para la actividad biológica, ya que al utilizar "proteinasas específicas" (pronasa y proteinasa K) se elimina la actividad.⁷

Por otra parte, la actividad del FT se inhibe cuando se utilizó la carboxipeptidasa A, la cual elimina el grupo carboxilo terminal, mientras que la leucina-aminopeptidasa, específica del grupo aminoterminal no tiene ningún efecto. Aunque informes previos sugerían que las endonucleasas no afecta la actividad del FT, posteriormente se determinó que la fosfodiesterasa I (exonucleasa 3') inhibía la actividad, mientras que la fosfodiesterasa II (exonucleasa 5') no, lo cual sugiere que el FT está constituido probablemente por un mononucleótido unido a un componente peptídico (Figura 4). Además, Burger propuso un grupo adenosindifosfato-ribosa pues la actividad se elimina con un tratamiento con ribosol-transferasa. Esta diferencia en los resultados pudiera deberse a que la pirofosfatasa no sea capaz de romper la unión de ADP-ribosa.⁹

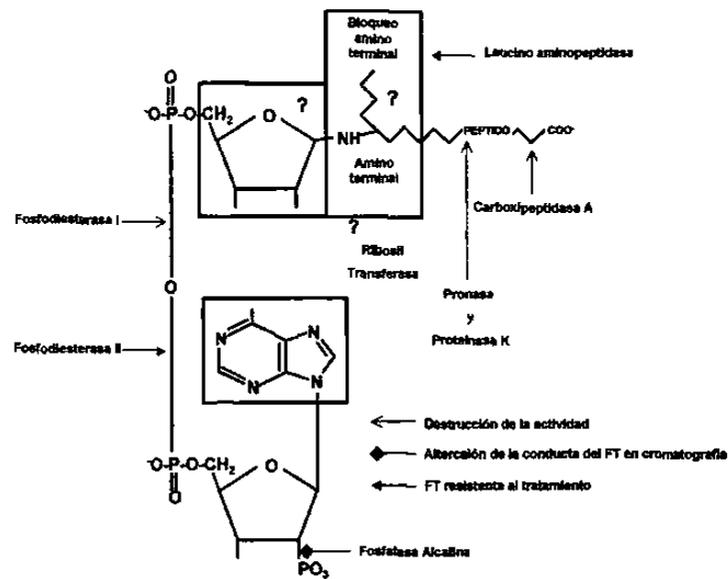


Figura 4. Modelo estructural de Burger y colaboradores para el Factor de Transferencia Humano.

Fudenberg presentó un modelo estructural para dos fracciones de FT humano, denominándolas FT-H5 y FT-H7. Cada modelo está representado por un oligoribonucleopéptido conteniendo enlaces internos 5' y 3' fosfodiéster para el ácido nucleico, mientras que el extremo 5' del nucleótido está unido al extremo aminoterminal del péptido. El número de nucleótidos y aminoácidos en cada actividad se desconoce,

aunque el total proporciona un peso molecular aproximado de 3000 a 5000 Da. El FT-H5 presenta purinas internas y un fosfato extremo 3' o 2' no esencial para su actividad, el FT-H7 posee pirimidinas internas (citocina o uracilo), sin embargo no incluye el fosfato externo 3' o 2'. El fosfato se requiere para la actividad, la cual es eliminada con fosfatasa alcalina bacteriana. También se propone que el péptido y el ribonucleótido están unidos covalentemente debido a que se bloquea la actividad exodegradativa de alguna de las enzimas (Figura 5)⁷¹.

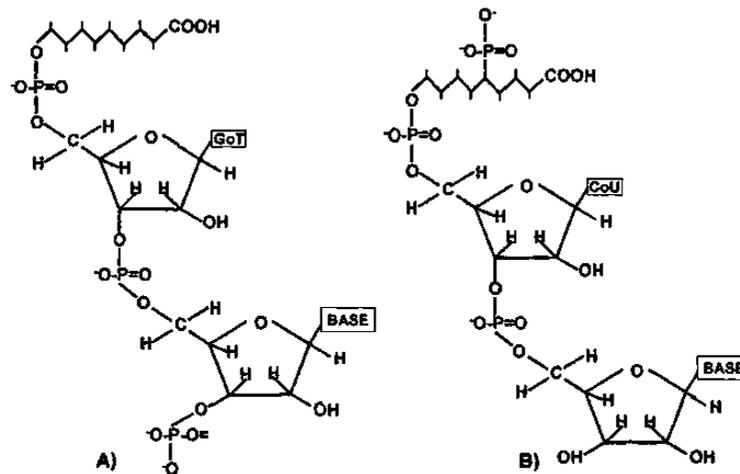


Figura 5. Modelos estructurales de Fudenberg y colaboradores para el Factor de Transferencia Humano: (A) Factor de Transferencia Humano H-5 y (B) Factor de Transferencia Humano H-7.

Por otra parte, Wilson trabajando con FT bovino, reportó algunas propiedades, un peso molecular de 1100 a 3000, sensibilidad al calor (80 °C durante 30 min) solubilidad en agua aunque precipita en etanol. Obtuvo una sola fracción a través de HPLC sensible a fosfodiesterasas, RNA U2, y nucleasa P1 mientras que con respecto a las demás enzimas ya mencionadas se comportaba igual al FT humano. Proponiendo un modelo de un oligoribonucleopéptido para el FT bovino, presentando muchas similitudes con los dos modelos anteriores, excepto que este carece del fosfato terminal 2' o 3' (Figura 6)..⁸⁹

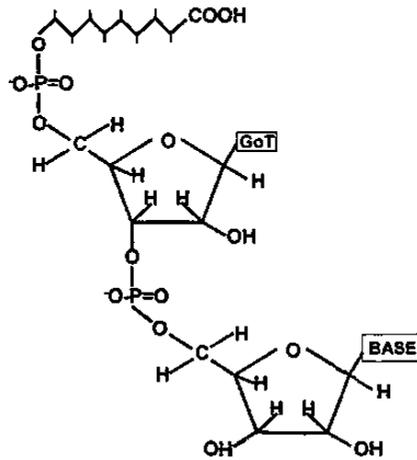


Figura 6. Modelo estructural de Wilson y colaboradores para el Factor de Transferencia Bovino.

Kirkpatrick en 1988, propuso que el FT es una proteína y sugirió la posibilidad de que esté constituido por 2 cadenas polipeptídicas unidas entre si por puentes disulfuro, aunque no descarta la presencia de nucleótidos. De cualquier forma muchas preguntas permanecen sin respuesta acerca de la naturaleza del FT, pues no se sabe si la transferencia de la inmunidad esta mediada por una o varias moléculas y no se entiende con exactitud como una sustancia con un PM menor de 5000 Da posea el rango de variabilidad necesario para transferir inmunidad a tan diversos antígenos con especificidad inmunológica para cada uno de ellos.⁴⁴

1.2.2. Uso Clínico del Extracto Dializable de Leucocitos

La utilidad que tiene el EDL como inmunomodulador en el tratamiento de enfermedades se basa en la capacidad que posee para desencadenar de una manera selectiva una respuesta inmune celular específica hacia un antígeno dado. Desde sus inicios y hasta la actualidad el Factor de Transferencia ha sido ampliamente utilizado como terapia para el tratamiento de diferentes enfermedades (Cuadro 2).

Las primeras investigaciones con EDL, se realizaron en situaciones donde el paciente se encontraba en un estado deteriorado, en enfermedades muy avanzadas con abundante cantidad de antígeno, lo que provocó escepticismo acerca de la utilidad terapéutica del EDL. En los últimos años varios equipos de investigación han llevado a cabo trabajos estandarizados con resultados más precisos aunque en ocasiones conducen a la controversia.

Cuadro 2. Casos en donde el Extracto Dializable de Leucocitos se ha utilizado como Terapia

- | Indicaciones para el uso del Extracto Dializable de Leucocitos |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Como terapia reemplazante en estados de inmunodeficiencia primaria o secundaria, caracterizadas por una disminución de la actividad de las células T. • Como terapia convencional o adjunta en: a) Infecciones diseminadas agudas debidas a virus, hongos o bacterias intracelulares regularmente en hospederos inmunocomprometidos. b) Estados de enfermedad maligna los cuales están en remisión o no han sido diseminados. c) En enfermedades autoinmunes con posibles infecciones de etiología desconocida. • Como tratamiento profiláctico para prevenir el desarrollo de infecciones oportunistas. • Como terapia convencional en enfermedades alérgicas. |

Un problema que se ha venido afrontando es la disponibilidad del FT de origen de leucocitos humanos, ya que es la fuente predominante para su obtención, para resolver esto se han utilizado otras fuentes como el bazo o los ganglios linfáticos de animales domésticos, tal producto ha sido utilizado ampliamente en humanos por varios centros e instituciones Hospitalarias teniendo como ventaja la posibilidad de seleccionar la especificidad, vacunando previamente a los animales con el antígeno deseado.⁶⁶ El EDL elaborado a partir de células de animales o de humanos es capaz de transferir actividad específica de antígeno a través de una amplia barrera de especies.²¹

1.2.2.1. Enfermedades Virales

El Factor de transferencia ha sido ampliamente utilizado como tratamiento de las enfermedades causadas por herpesvirus : el Herpes Simplex (VHS) tipos 1 y 2, Varicela Zóster (VVZ), Citomegalovirus (CMV), Virus Linfotrópico Herpético (HVH6) y Virus del

Epstein-Barr (VEB). Los Herpesvirus están ampliamente diseminados y sus infecciones son comunes. Aunque suelen causar enfermedad benigna, pueden provocar morbilidad y mortalidad significativas sobre todo en pacientes inmunocomprometidos.

La terapia con EDL-FT utilizada en pacientes con Herpes Zóster Sistémico (HZS) ha sido de gran éxito. Infecciones son comunes en pacientes que reciben tratamiento para linfoma, leucemia, o medicamentos inmunosupresores, así como en aquellos individuos inmunodeficientes, pero cuando son tratados con FT, la respuesta inmunitaria mejora notablemente.⁷² El Factor de Transferencia también ha sido utilizado como una alternativa para el tratamiento del Síndrome de Fatiga Crónica (SFC); enfermedad relacionada con el Virus del Epstein-Barr y el Virus Linfotrópico Herpético 6 (HVH6).^{2,16} La familia *Herpesviridae* constituye un grupo diverso de virus DNA que comparten una morfología común, el modo básico de replicación, la capacidad para establecer infecciones latentes/recurrentes y la importancia de la inmunidad celular para controlar la infección y causar síntomas. Pizza, Estrada-Parra y Meduri por separado, trataron pacientes con herpes labial, genital y ocular con Factor de Transferencia específico a VHS tipo 1 y 2 con resultados positivos para eliminar esta enfermedad y sugirieron establecer al FT como un agente terapéutico que evita la recurrencia de la enfermedad.^{31,67,81}

El factor de transferencia, en el caso del SIDA; logra prolongar la aparición de los síntomas típicos del padecimiento en individuos seropositivos. Por otra parte, varios grupos que utilizaron FT específico obtenido de líneas linfoblastoides previamente inducidas con el virus, observaron que éste es capaz inhibir *in vitro* la transcriptasa reversa. Estudios recientes indican que el FT específico es capaz no solo de mejorar clínicamente a los pacientes sino también de elevar el porcentaje de Linfocitos CD4 y de bajar la carga viral.^{28,86}

1.2.2.2. Enfermedades Infecciosas por Bacterias, Hongos y Parásitos Intracelulares

El Factor de Transferencia como un inmunoestimulador derivado de leucocitos inmunes se ha utilizado con gran éxito en el tratamiento de infecciones por hongos (*Candida*, *Coccidium*), parásitos intracelulares (*Schistosomiasis*, *Leishmaniasis*, *Cryptosporidiosis*),

infecciones bacterianas (*Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella Virchow*, *Brucella abortus*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, Sepsis Bacterial, *Staphylococcus*).⁵⁵

En la actualidad sigue siendo un grave problema de salud las sepsis agudas o generalizadas, a pesar de la aparición de nuevos y muy potentes antimicrobianos de segunda y tercera generación. Sin embargo, éstos a su vez son capaces de facilitar el crecimiento de otros agentes patógenos especialmente oportunistas que antes de la terapia se encontraban en equilibrio con los otros gérmenes. La sepsis grave o generalizada tiene entre el 70 y 75% de mortalidad, aún con buena terapia antimicrobiana y terapia intensiva. Cuando se aplicó FT a una población abierta de pacientes sépticos graves, junto con los antimicrobianos seleccionados se recuperaron el 83% y fallecieron el 13% de la población tratada, lo cual es de gran importancia. Por otra parte, se ha observado que la terapia con FT, de la sinusitis, faringitis u otitis media ocasionada por agentes piógenos resulta ser favorable.²⁵

La *Candidiasis mucocutánea*, es una enfermedad a menudo asociada con otros desórdenes, agranulocitosis, enfermedades malignas, lesiones en piel y membranas mucosas, además de alteraciones en la inmunidad humoral y un defecto selectivo en las células T. En este tipo de padecimiento el FT específico ha tenido un gran impacto, ha servido como adyuvante con la terapia ortodoxa (anfotericina B) desapareciendo la infección y evitando el fenómeno de recurrencia.²⁵

En el caso de las infecciones por Micobacterias, esta la tuberculosis y la lepra, estas dos enfermedades presentan formas polares, presentando un espectro entre los dos polos. En la tuberculosis el polo maligno, o tuberculosis no reactiva, esta representado por pacientes que no responden a la intradermorreacción al PPD, por lo tanto son anérgicos y están a pesar del mejor esquema antifímico, llenos de bacilos. En la lepra el polo maligno, lo representan los pacientes lepromatosos que también tienen una enorme carga bacilar y son negativos a la lepromina. Los pacientes de tuberculosis no reactiva y la cercana a este polo, que se han tratados con FT específico comparados con grupos placebo, ambos con antifímicos, han tenido una mejor evolución a tal grado que se sugiere que este tipo de pacientes deben ser tratados con el mejor esquema antifímico y FT específico. Los pacientes con lepra lepromatosa que reciben FT específico tienen una mejor evolución que aquellos sin el FT específico. Los casos

tratados de tuberculosis extrapulmonar, especialmente los de vías urinarias, tratados con FT específico han mostrado una recuperación muy notoria por lo que se recomienda además del tratamiento convencional agregar el FT específico.²⁶

1.2.2.3. Tratamiento de Neoplasias

En la mayoría de los casos el Factor de Transferencia se ha utilizado como terapia en enfermedades crónicas infecciosas, sin embargo; en los últimos años se ha empezado a utilizar como terapia antineoplásica, obteniéndose en algunos casos resultados favorables, como por ejemplo; en los pacientes con cáncer de próstata, estadio D3, se han observado remisiones completas, remisiones parciales y en algunos casos se evitó la progresión a metástasis y se aumentó el promedio de sobrevivencia (>126 semanas), el cuál es mucho mayor a los promedios reportados en la literatura para estos pacientes.⁷⁵ Aunque haya casos espectaculares de remisión con FT, especialmente con FT específico, el FT deberá utilizarse fundamentalmente como coadyuvante en el tratamiento del cáncer, asociado a otras citocinas o al BCG, en combinación con los tratamientos ortodoxos como cirugía, radioterapia o quimioterapia. Existen numerosos reportes en los que después de eliminar con cirugía la masa tumoral, el tratamiento con FT específico previene o retarda la aparición de las metástasis que son las que generalmente acaban con el paciente. El FT específico se puede obtener en general de convivientes de los pacientes o a partir de la inoculación de determinantes antigénicos tumorales a bovinos.^{73,76}

1.2.2.4. Tratamiento de Alergias

Una experiencia muy importante sobre la actividad inmunoreguladora del FT en México, es sobre el tratamiento de asma bronquial extrínseca, en donde se ha observado un 75% de respuestas favorables. En los pacientes que han sido tratados con FT se ha observado lo siguiente: un incremento favorable en las poblaciones de linfocitos CD2⁺CD4⁺ y en los linfocitos B, pero no de linfocitos CD8, una disminución de la población eosinofílica, por otra parte en el suero de los pacientes, los niveles séricos de

IL-6 e IL-8 incrementan, y la IL-10 permanece sin ningún cambio y no se detecta TNF- α .²³

1.3. Propiedades Biológicas del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

Actualmente se conocen dos tipos de TNF, el alfa conocido como caquectina y el beta conocido como linfotóxina, se ha comprobado que ambas sustancias juegan un papel importante como mediadores de la inflamación y el proceso de la respuesta inmunológica.⁵⁹ El TNF- α puede ser un estimulante natural de neutrófilos, el cual promueve la adherencia hacia células endoteliales,^{46,79} incrementa la fagocitosis, estallido respiratorio y degranulación.⁴⁶ También se ha encontrado que los macrófagos activados con TNF- α destruyen mas efectivamente células cancerosas⁸⁴ ya que se ha demostrado que es una sustancia única antitumoral con potente actividad necrotizante contra tumores sólidos en ratones,⁵⁸ esta necrosis hemorrágica es el resultado de la destrucción de la mayor parte de la vascularización del mismo tumor.⁶⁸

El TNF- α fue identificado como un mediador de la necrosis tumoral presente en el suero de animales tratados con lipopolisacárido (LPS) y, funciona como el principal regulador de la respuesta del huésped a bacterias gram negativas, jugando un papel en la respuesta hacia otros organismos infecciosos ya que el componente activo de las bacterias gram negativas es el LPS, llamado también endotoxina la cual se deriva de la pared celular bacteriana.^{1,70}

A bajas concentraciones, el LPS estimula las funciones de los fagocitos mononucleares y actúa como un activador policlonal de células B, que contribuyen a la eliminación de la invasión bacteriana.¹ Sin embargo, a altas concentraciones el LPS causa daño a tejido, coagulación intravascular diseminada, y choque séptico que frecuentemente resulta en la muerte.^{1,10}

Los macrófagos activados por LPS son la mayor fuente celular de TNF- α , aunque las células T estimuladas por antígeno, las células NK activadas y las células cebadas también pueden secretar esta proteína. El INF- γ , producido por las células T, estimula la producción del TNF- α por macrófagos activados con LPS. Así, el TNF- α es un mediador de la respuesta inmune natural y adquirida y un importante enlace entre la

respuesta inmune específica y la inflamación aguda.¹ Las acciones biológicas del TNF- α (Figura 7), así como la de los LPS, son mejor comprendidas como una función de cantidad.

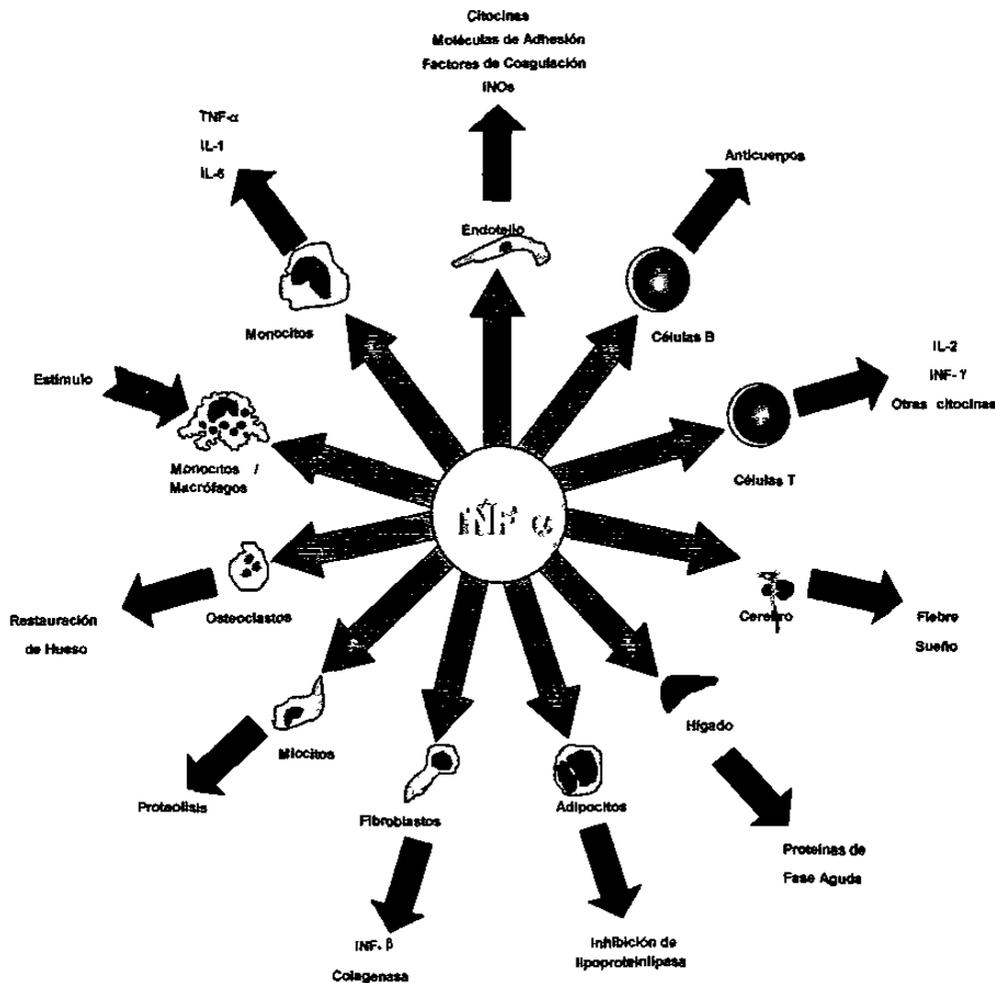


Figura 7. Actividades Biológicas del Factor de Necrosis de Tumor alfa (TNF- α). Aunque varios tipos de células producen TNF- α , la principal fuente de citocinas son los monocitos/macrófagos. El TNF- α induce un número de cambios pro-inflamatorios en células endoteliales, producción citocinas, expresión de moléculas de adhesión, liberación de sustancias pro-coagulantes e inducción de iNOS. Estas alteraciones pueden llevar a un choque séptico. Además, el TNF- α estimula células T y B, induce fiebre en cerebro, supresión de lipoproteín lipasa en adipocitos (contribuyendo a la caquexia) y estimula a los hepatocitos para producir las proteínas de fase aguda. En la artritis reumatoide, los fibroblastos y los osteoclastos son células blanco para TNF- α . Abreviaturas: INF, interferón; IL, interleucina; iNOS, Oxido Nítrico inducible sintetasa; TNF- α , Factor de Necrosis de Tumor alfa.²²

El TNF- α se produce en grandes cantidades por estímulos fuertes, de esta forma entra a circulación sanguínea, donde puede actuar como una hormona endocrina. El TNF- α es un pirógeno endógeno, el cuál actúa sobre células en regiones reguladoras hipotalámicas del cerebro para inducir fiebre. En macrófagos y quizás sobre células endoteliales vasculares estimula la secreción de IL-1 e IL-6 a circulación. Por otra parte, en los hepatocitos incrementa la síntesis de ciertas proteínas séricas. La administración sistémica por largo tiempo de TNF- α en animales provoca caquexia, estado caracterizado por el gasto de músculo y células adiposas. La caquexia es producida parcialmente por la supresión mediada por el TNF- α de la síntesis de la lipoproteinlipasa, una enzima necesaria para la liberación de los ácidos grasos a partir de las lipoproteínas circulantes para ser utilizadas por los tejidos. Aunque el TNF- α por si mismo puede producir caquexia en animales de experimentación, otras citocinas como la IL-1, puede además contribuir al estado caquético en ciertas enfermedades tales como el cáncer.^{1,12,22}

Cuando existe sepsis por bacterias gram negativas, se producen cantidades masivas de TNF- α , y las concentraciones séricas pueden exceder a 10^{-7} M. Los animales que producen mucho TNF- α mueren de colapso respiratorio y coagulación diseminada, mientras que los anticuerpos contra el TNF- α pueden prevenir la mortalidad, implicando que esta citocina puede ser un mediador crítico para el choque séptico. Lo mismo se ha observado al administrar altos niveles de TNF- α , originando un síndrome que se asemeja al choque.¹ Altas concentraciones de TNF- α plasmáticas han sido demostradas en una variedad de enfermedades inflamatorias e infecciones; tales como: Síndrome séptico, Meningitis bacteriana, Síndrome distress respiratorio del adulto, SIDA y Artritis reumatoide.²² Cuadro 3.

Cuadro 3. Enfermedades Humanas relacionadas con concentraciones detectables de TNF- α plasmáticas²²

Enfermedad	TNF- α
Infección	Síndrome séptico, Meningitis bacteriana, Malaria cerebral, SIDA
Autoinmunidad	Artritis reumatoide, Enfermedad de Crohn's, Sarcoidosis, Esclerosis múltiple
Fallo Orgánico	Síndrome distress respiratorio del Adulto, Fallo congestivo del corazón, Infarto al miocardio, Fallo agudo del hígado

1.3.1. Inhibición de la síntesis de TNF- α

Los agentes inhibidores de la producción de TNF- α se han clasificado en tres grupos. (Figura 8 y Cuadro 4)²²

- Grupo I: La síntesis del TNF- α puede ser inhibida por citocinas como la IL-4 y la IL-10, que son citocinas del tipo TH₂, así como por prostanoïdes, adenosina y corticosteroides.
- Grupo II: El procesamiento de la pro-proteína del TNF- α puede ser inhibido por compuestos inhibidores específicos de la TNF-metaloproteasa.
- Grupo III: Inhibiendo los efectos del TNF- α en la célula blanco utilizando receptores solubles TNF- α o anticuerpos anti-TNF- α .

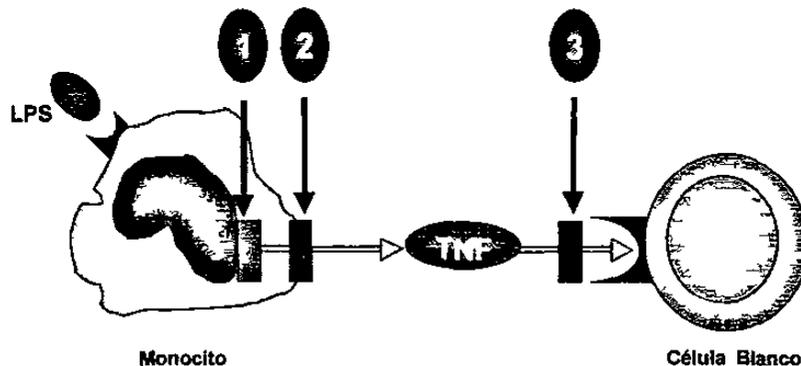


Figura 8. El factor de Necrosis de Tumor alfa (TNF- α) es producido por monocitos seguidos de una estimulación por lipopolisacárido (LPS). El TNF- α puede ser inhibido por tres vías: (1) síntesis, (2) procesamiento y (3) efectos sobre las células blanco.²²

La inhibición de la síntesis de TNF- α puede ocurrir de varias maneras: ya sea inhibiendo la transcripción, disminuyendo el tiempo de vida media del RNAm, o inhibiendo la traslación. Aunque algunas sustancias actúan en mas de un nivel, siempre hay uno que predomina como por ejemplo; el inhibidor de la fosfodiesterasa, la

pentoxifilina actúa principalmente sobre la transcripción, mientras que la dexametasona inhibe la traslación y la talidomida específicamente disminuye el tiempo de vida media del RNAm para TNF- α .²²

Cuadro 4. Agentes que inhiben la producción del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)²²

Inhibición de la síntesis de TNF- α	Citocinas	IL-4, IL-10, TGF- β
	Otros mediadores endógenos	Corticosteroides, prostanooides, adenosina, Histamina
	Drogas sintéticas	Pentoxifilina, rolipram, ciclosporin A, talidomida
Inhibición del procesamiento de TNF- α	Inhibición de la TNF metaloproteasa	Componente 2 y GI 129471
Inhibición de los efectos del TNF- α	Anticuerpos anti-TNF- α y receptores solubles para TNF- α	

1.4. Hipótesis

El Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) de origen Humano y Bovino inhibe la producción de TNF- α inducido por LPS, modulando el perfil de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

1.5. Objetivo general

Caracterizar el efecto biológico del Extracto Dializable de Leucocitos Humano y Bovino en un sistema *ex vivo*, estimulado con Lipopolisacárido (LPS).

1.5.1. Objetivos específicos

- Preparar el Extracto Dializable de Leucocitos de Bovino (EDLB), a partir de bazo de bovinos.

- Preparar el Extracto Dializable de Leucocitos de Humano (EDLH), a partir de una linfocitoféresis.
- Determinar si el EDLH y el EDLB son capaces de inhibir la producción TNF- α inducido por LPS en un sistema *ex vivo*.
- Comparar el efecto de los EDL Humano y Bovino en la inhibición de TNF- α inducido por LPS.
- Determinar el efecto que ejercen el EDLH y EDLB en la expresión de RNA mensajeros para citocinas TH₁ (IL-4 e IL-10) y TH₂ (IL-2 e INF- γ).
- Determinar el efecto que ejercen el EDLH y EDLB en la expresión de RNA mensajeros para citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-12p40) y anti-inflamatorias (IL-10).

Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación del Extracto Dializable de Leucocitos

La producción de los Extractos Dializables de Leucocitos de origen humano (EDLH) y de origen bovino (EDLB), se realizó con una modificación del método originalmente descrito por S. Lawrence.⁵¹

2.1.1. Fuente de Leucocitos

2.1.1.1. Extracto Dializable de Leucocitos Humano (EDLH).

El EDLH se obtuvo a partir de donadores sanos, los cuales fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra Hepatitis B y C, Brucella, VDRL y VIH. Los donadores se sometieron a un procedimiento de linfocitoféresis, utilizando un separador celular continuo "Plot Cell Separator Fenwal CS3000 Plus" de la marca Baxter. La linfocitoféresis duró de 3 a 4 horas, procesándose de 10 a 14 litros de sangre a un tiempo de flujo de 40 a 60 ml/min utilizando ACD (Citrato de Dextrosa) como anticoagulante, una velocidad de centrifugación de 840 a 920 rpm y un tiempo de colección celular de 1.2 a 1.8 ml/min. El volumen final colectado fue de 200 a 250 ml, con un 90 a 95% de linfocitos. Finalmente se contó el número de linfocitos totales, utilizando un Contador de células automatizado (Coulter Z1, Beckman) para determinar el número de unidades de EDLH (Una unidad de EDL equivale a 1×10^9 linfocitos), inmediatamente se eliminó el plasma mediante centrifugación a 6000 rpm durante 30 min a 10°C (Beckman Avanti J 25).

2.1.1.2. Origen del Extracto Dializable de Leucocitos Bovino (EDLB).

El EDLB se obtuvo a partir de bazo de bovino recién sacrificado, se colocaron en solución salina isotónica estéril libre de pirógenos y suplementada con penicilina-estreptomicina (PES). En condiciones de esterilidad se lavó el bazo con solución salina y se eliminaron las porciones dañadas; posteriormente se cortó en pequeños trozos para homogenizarlos mecánicamente y se realizó una cuenta leucocitaria para determinar el número de unidades de EDLB (Una unidad de EDL equivale a 1×10^9 leucocitos). El homogenizado de las células de bazo, se centrifugó a 6000 rpm durante 30 min a 10 °C (Beckman Avanti J-25) en frascos de boca ancha para eliminar el sobrenadante

2.1.2. Proceso de lisis celular, diálisis y almacenamiento.

Los paquetes celulares provenientes de la linfocitoferesis y de los bazos bovinos, se sometieron a un proceso de 12 ciclos de congelación-descongelación continuos, utilizando un sistema acetona/hielo seco para congelar y para descongelar un baño de agua a 37 °C. (PRECISION Mod. 25, U.S.A.). Posteriormente, el lisado se dializó en agua bidestilada estéril libre de pirógenos utilizando una membrana para diálisis (Spectra/Por[®]4, U.S.A) con un poro de 12000 a 14000 Da, por un periodo de 48 h con agitación constante a 4 °C. La fracción dializable se esterilizó por filtración usando membranas de polisulfona (GELMAN) con un poro de 0.2 μm y se alicuotó a un volumen apropiado para obtener una unidad por vial en frascos estériles libres de pirógenos. Las unidades se liofilizaron en un equipo Lyph-Lock Freeze Dry System (LABCONCO) y se almacenaron a -70 °C, registrándose la producción con un número de lote.

2.1.3. Pruebas de Esterilidad

2.1.3.1. Determinación de Endotoxinas

Esta prueba se realizó utilizando las Normas Oficiales de los Métodos Generales de Análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para la determinación de

endotoxinas MGA 0320,⁶¹ consiste en la gelificación de *Lisados de Amebocitos de Limulus* (LAL) a diversos tiempos. Se utilizó una cantidad representativa de las unidades de EDL liofilizadas dependiendo del tamaño del lote (10%). El contenido de los viales se mezcló con agua libre de endotoxinas y se verificó el pH, el cuál debe estar entre 6.0 - 7.5 para la realización de esta prueba, en caso necesario se ajustó el pH utilizando HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N.

Un tubo de dilución de 12 x 75 mm con 1 ml de agua bidestilada y dos viales de prueba simple LAL, se incubaron en hielo antes de su uso. Inmediatamente se añadieron 0.5 ml de la unidad de EDL a probar (previamente diluida en 1 ml de agua bidestilada) al tubo de dilución y se colocaron los tubos de dilución en baño de agua hirviendo por 5 min. Después se redujo la temperatura de los tubos que contenían la muestra a probar a 30 °C. De esta solución se tomaron 0.2 ml y se añadieron a un vial que contenían LAL y se agitó suavemente para disolver el LAL completamente. Posteriormente, se incubaron los viales a una temperatura superior a los 37 °C en un baño de agua y se observó si había gelificación del LAL en un tiempo de 2 horas. El producto cumplió los requerimientos de la prueba, si la muestra probada no gelificó el LAL.

2.1.3.2. Determinación de Pirógenos

Esta prueba se realizó utilizando las Normas Oficiales de los Métodos Generales de Análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para la determinación de endotoxinas MGA 0711.⁶¹ Se basa en el registro del aumento de la temperatura en el conejo, como respuesta a la presencia de pirógenos principalmente endotoxinas, puesto que la reacción fisiológica del conejo a estos últimos agentes, es similar a la del hombre.

2.1.3.3. Plaqueo para la Investigación de la presencia de bacterias

Se utilizó una cantidad representativa de las unidades de EDL liofilizadas dependiendo del tamaño del lote (10%). La unidad de EDL liofilizada se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril y con 0.1 ml se inocularon cajas petri con medio selectivo para

Estafilococos (Agar S110) y Agar Eosina Azul de Metileno (Agar EMB), así como de tubos que contienen Caldo soya tripticasa y Caldo tioglicolato. Se dejó incubar a 37 °C por un período de 24 a 48 h, y se observó la presencia de colonias en los medio sembrados. Los lotes, cuyas pruebas hayan presentado crecimiento en cualquiera de éstos medios se descartaron.

2.2. Diseño experimental

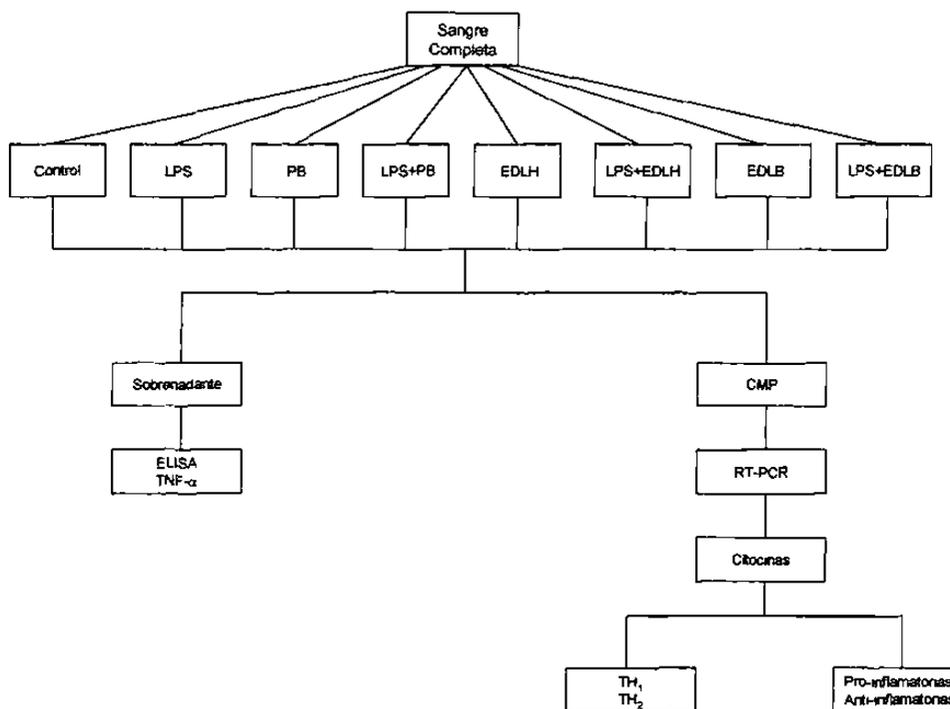


Figura 9. Diagrama de Flujo del diseño experimental realizado para determinar el efecto del EDL en la inhibición de la producción del TNF- α inducido por LPS en sangre completa. Se trabajó con sangre completa diluida en Medio RPMI-1640 en una proporción 1:5. Para la inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS se probaron los siguientes tratamientos: (1) Control, únicamente se cultivaron células de sangre completa, (2) LPS, se cultivaron las células de la sangre con 2 ng/ml de LPS, (3) PB, se cultivaron las células con Polimixina B a una concentración final de 400 U/ml, (4) LPS+PB, se cultivó simultáneamente con 2 ng/ml de LPS y 400 U/ml de Polimixina B, (5) EDLH, se cultivaron las células en presencia de 1 U/ml de EDL de origen humano, (6) LPS+EDLH, se cultivó simultáneamente con 2 ng/ml de LPS y 1 U/ml de EDL de origen humano, (7) EDLB, se cultivó con 1 U/ml de EDL de origen bovino y (8) LPS+EDLB, se cultivó simultáneamente con 2 ng/ml de LPS y 1 U/ml de EDL de origen bovino. Se cultivó por 5 horas a 37 °C con un 5% de CO₂. De cada tratamiento se aspiraron los sobrenadante y realizó un ELISA para la determinación de la concentración de TNF- α ; además, se realizó RT-PCR para la determinación de la expresión de RNA mensajeros para las citocinas TH₁ y TH₂, y de las citocinas pro- y anti-inflamatorias en los tratamientos con EDL en donde se observó mayor inhibición de la producción de TNF- α .

2.3. Determinación de la Inhibición de la Producción de TNF- α inducido por LPS en sangre completa

Esta determinación se utilizó con una modificación basada en el método de Ojeda-Ojeda y col.⁶⁹ Se añadieron 500 μ l de sangre total (previamente diluida 1:5 en RPMI-1640 libre de pirógenos) en una placa de 24 pozos. Como control de la producción de TNF, se utilizó sangre cultivada con LPS a una concentración final de 2 ng/ml y un control para la inhibición de la producción de TNF, sangre cultivada con LPS (2 ng/ml) y sulfato de Polimixina B (400 U/ml). Se utilizaron 1, 0.5, 0.25 y 0.125 U/ml EDL de origen humano o bovino, con y sin LPS (2 ng/ml). Transcurridas 5 horas de incubación de las muestras a 37 °C y 5% de CO₂ se procedió a colectar el plasma, mediante centrifugación a 3000 rpm por 4 min. Las muestras se conservaron a -20 °C, hasta su evaluación por el método ELISA anti-TNF- α específico ultrasensitivo (ELISA Cytoscreen™, ultrasensitivo, BioSource International, Inc.) y se aislaron las Células Mononucleares Periféricas (CMP) utilizando Lymphoprep (Gibco) para aislar los RNA mensajeros y realizar RT-PCR para citocinas TH₁, TH₂, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

2.4. Aislamiento de Células Mononucleares Periféricas.

La sangre diluida 1:5 se depositó suavemente sobre un gradiente de densidad de 1.077 g/ml (Lymphoprep, Gibco, USA). Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm por 30 min a temperatura ambiente (Centrifuga Beckman GPR), al final de este procedimiento se formó un anillo de células mononucleares periféricas (CMP) en la interfase, el cuál se extrajo con la ayuda de una pipeta estéril desechable. Las CMP se lavaron a 1200 rpm por 10 min a 4°C y tres lavados más pero a 800 rpm, para eliminar plaquetas; utilizando como solución de lavado, NaCl al 0.85%. Finalmente las CMP se suspendieron en un volumen apropiado y se calculó el número de células totales, utilizando un Contador automatizado (Coulter-Beckman).

2.5. Método Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Expresión de Citocinas TH₁, TH₂, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en Células Mononucleares Periféricas estimuladas con Extracto Dializable de Leucocitos

2.5.1. Extracción de RNA a partir de Células Mononucleares Periféricas

La extracción del RNA se realizó de acuerdo al método de TRIzol (Gibco, BRL, Gaithersburg, MD) basado en la técnica de Chomczynski.¹⁵ Se utilizaron 10 X 10⁶ CMP estimuladas con EDLB (1 U/ml), EDLH (1 U/ml), LPS (2 ng/ml), Sulfato de Polimixina (400 U/ml), LPS (2 ng/ml) con Sulfato de Polimixina (400 U/ml), LPS (2 ng/ml) con EDLB (1 U/ml), LPS (2 ng/ml) con EDLH (1 U/ml) y sin estimular. Se les añadió 1 ml de TRIzol y se homogenizó en un vortex cuidadosamente, incubándose por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitó suavemente por inversión; enseguida se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4 °C para extraer el RNA en una fase acuosa (fase superior). El RNA se precipitó con 500 µl de isopropanol a -70 °C por 30 min y se lavó con etanol al 75%. Finalmente el RNA se resuspendió en 20 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

2.5.2. Cuantificación de la Cantidad y Calidad del RNA.

Para la cuantificación del RNA se utilizó un espectrofotómetro marca Beckman con Luz UV modelo DU-650 y se leyeron absorbancias a longitudes de onda de 260 y 280 nm, para calcularse la concentración de RNA, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} \times 0.040 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times B)$$

Donde :

A₂₆₀: Absorbancia dada por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm

B . Factor de Dilución

Como parámetro de la calidad de RNA se comparó la relación entre las absorbancias de 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}), la cuál debe estar entre 1.8 y 2.0 para ser considerado de buena calidad, así como; la definición de bandas en un gel de Urea-Poliacrilamida.

2.5.3. Producción de DNA complementario (DNAc)

La primera hebra de DNAc se sintetizó a 37 °C por una hora; mezclando 5 µg de RNA total, 5 µl de Buffer 5X para sintetizar la primera hebra [250 mM tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 50 mM Dithiothreitol y 15 mM MgCl₂], 0.25 µl de inhibidor de RNasa (RNasin 10 U/µl), 0.5 µl de Mix dNTP's (25 mM c/u), 1 µl de oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ (0.5 µg/µl) y 1µl de la Transcriptasa Reversa de la Leucemia Moloney murina (M-MLV 200 U/µl) de la marca Gibco, BRL, Gaithersburg, MD.

2.5.4. Detección de la Expresión de Citocinas TH₁ y TH₂ en Células Mononucleares Periféricas estimuladas con Extracto Dializable de Leucocitos de Bovino por PCR

Para amplificar los genes que codifican para las citocina TH₁ y TH₂, se mezclaron 3.0 µl del DNAc en presencia de Buffer 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 0.75 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.25 µl de Mix dNTP's [dATP, dCTP, dTTP y dGTP (25 mM c/u)], 30.0 pM de cada oligonucleótido [G3PDH, IL-2, IL-4, IL-10 o INF-γ, (Cuadro 5)], y 0.5 µl de Taq DNA polimerasa (Bioselec, 6 U/µl). Posteriormente colocaron en un termociclador MJ Research PTC-200, el cuál se programó con las temperaturas de desnaturalización, alineación y extensión respectiva, dependiendo del gene a amplificar (Cuadro 6). El análisis de los productos de amplificación de PCR se realizó por un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 %. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo por una tinción del gel con bromuro de etidio (1mg/ml).

Cuadro 5. Secuencias de los Oligonucleótidos para amplificar los genes de las Citocinas TH₁ y TH₂

Gen	Sentido (5' a 3')	Antisentido (3' a 5')	Tamaño del producto (pb)
G3PDH	5'-ACC-ACA-GTC-CAT-GCC-ATC-AC-3'	5'-TCC-ACC-ACC-CTG-TTG-CTG-TA-3'	452
IL-2	5'-CAT-TGC-ACT-AAG-TCT-TGC-ACT-TGT-CA-3'	5'-CGT-TGA-TAT-TGC-TGA-TTA-AGT-CCC-TG-3'	305
INF- γ	5'-GCA-TCG-TTT-TGG-GTT-CTC-TTG-GCT-GTT-ACT-GC-3'	5'-CTC-CTC-TTT-CGC-TTC-CCT-GTT-TTA-GCT-GCT-GG-3'	427
IL-4	5'-ATG-GGT-CTC-ACC-TCC-CAA-CTG-CT-3'	5'-CGA-ACA-CTT-TGA-ATA-TTT-CTC-TCT-CAT-3'	456
IL-10	5'-ATG-CCC-CAA-GCT-GAG-AAC-CAA-GAC-CCA-3'	5'-TCT-CAA-GGG-GCT-GGG-TCA-GCT-ATC-CCA-3'	426

*pb : Tamaño del producto en pares de bases

Cuadro 6. Programa de amplificación de los Genes que codifican para las Citocinas TH₁ y TH₂

Parámetros	G3PDH	IL-2	INF- γ	IL-10	IL-4
"Hot Start"	95 / 5 min	95 / 5 min	95 / 5 min	95 / 5 min	95 / 5 min
Ciclos	30	35	40	40	40
Desnaturalización	95 / 1 min	95 / 1 min	95 / 1 min	95 / 30 seg	95 / 40 seg
Alineación	55 / 1 min	65 / 1 min	60 / 1 min	55 / 30 seg	58 / 40 seg
Extensión	72 / 1 min	72 / 1 min	72 / 1 min	72 / 1 min	72 / 1 min
Extensión Final	72 / 5 min	72 / 5 min	72 / 5 min	72 / 5 min	72 / 5 min

2.5.5. Detección de la Expresión de Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en Células Mononucleares Periféricas estimuladas con Extracto Dializable de Leucocitos utilizando un MultiPCR (Maxim Biotech Inc.)

Para amplificar los genes que codifican para las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (G3PDH, TNF- α , IL-1 β , IL-12p40, IL-8, IL-6 y IL-10) (Cuadro 7), se utilizó un kit multiPCR. Se tomaron 2.5 μ l del DNAC de cada una de las muestras y del control positivo en presencia de 2.5 μ l de Buffer MPCR 10XhSEP2G, 2.5 μ l de oligonucleótidos MPCR 10 XhSEP2G, 0.5 μ l de Taq polimerasa (Bioselec, 6 U/ μ l) y se aforo a un

volumen de 25 μ l. Inmediatamente se colocaron en un termociclador MJ Research PTC-200, el cuál se programó con las temperaturas de desnaturalización, alineación y extensión (Cuadro 8). El análisis de los productos de amplificación de PCR se realizó por un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5 %. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo por una tinción del gel con bromuro de etidio (1mg/ml).

Cuadro 7. Programa de amplificación de los Genes que codifican para las Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias

	Temperatura ($^{\circ}$ C) / tiempo (min)
"Hot Start"	94 / 4
Ciclos	30
Desnaturalización	94 / 1
Alineación	60 / 2
Extensión	72 / 2
Extensión Final	72 / 7

Cuadro 8. Pares de bases de los genes amplificados por el multiPCR para las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

G3PDH	921
TNF- α	680
IL-1 β	556
IL-12p40	432
IL-6	359
IL-8	300
IL-10	223

*pb : Tamaño del producto en pares de bases

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1. Inhibición de la producción de TNF- α por el Extracto Dializable de Leucocitos de origen humano y bovino en sangre completa estimuladas con LPS.

El EDL, de origen humano y bovino, inhibió la producción de TNF- α en un sistema endotóxico *ex vivo*, dicha inhibición es dependiente de la dosis del EDL sin importar de donde provengan los extractos de leucocitos, es decir; a mayor concentración de EDL (humano o bovino) mayor es la inhibición de esta citocina como se muestra en la Figura 10. Las células estimuladas en presencia de LPS (2 ng/ml) produjeron una mayor cantidad de TNF- α (785.7 \pm 1.73 pg/ml), pero al cultivarlas en presencia de LPS y Sulfato de Polimixina B disminuyó considerablemente la producción de TNF- α a 19.5 \pm 1.73 pg/ml. En el tratamiento con LPS (2 ng/ml) y diferentes concentraciones de EDLH (1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 U/ml) se observó una disminución en la producción de TNF- α de 17.3 \pm 0.45, 58.4 \pm 0.62, 194.5 \pm 0.36, y 326.2 \pm 0.36 pg/ml respectivamente. El tratamiento con LPS (2 ng/ml) y EDLB (1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 U/ml) también inhibió los niveles de TNF- α a 32.7 \pm 0.4, 65.4 \pm 0.17, 146.8 \pm 0.65 y 204.4 \pm 0.55 pg/ml respectivamente, determinándose que la inhibición de la producción de TNF- α fue dependiente de la concentración del EDL, a concentraciones altas de EDL se observó una mayor inhibición de TNF- α . Así de esta manera observamos, que el EDL de origen humano reduce la secreción de TNF- α inducido por LPS de 45.4-2.4 y el de origen bovino de 24.0-3.8 veces, de acuerdo a la concentración utilizada del extracto, mientras que el control con Sulfato de Polimixina B lo reduce a 40.3 veces.

Al comparar el efecto entre los dos tipos de EDL, el humano y bovino, se observó que tienen la misma capacidad de inhibición de la producción de TNF- α inducido por LPS. Sin embargo, cuando se utilizó 1 U/ml de EDLH se produjeron 17.3 \pm 0.45 pg/ml de TNF- α , menor a la obtenida con el EDLB (32.7 \pm 0.4 pg/ml); pero cuando se utilizó con concentraciones de 0.125 U/ml el EDLB presentó una producción de 204.4 \pm 0.55 pg/ml de TNF- α , menor a la producida por el EDLH (326.2 \pm 0.36 pg/ml).

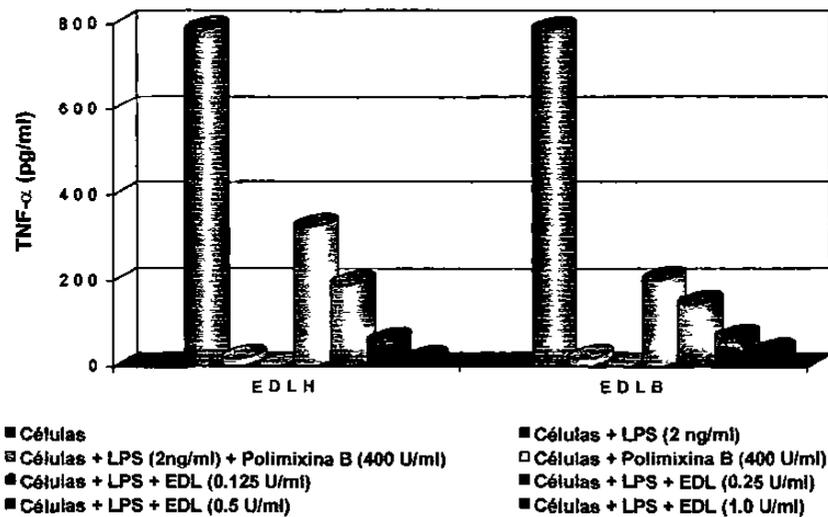


Figura 10. Inhibición de la producción de TNF- α inducido por LPS con Extracto dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB) en sangre completa. Se cultivaron células de sangre completa en una dilución final de 1:6 de donadores sanos con 2 ng/ml de LPS, para inducir la producción de TNF- α . Como control positivo de la inhibición del TNF- α , se utilizaron 400 U/ml de Sulfato de Polimixina B y se probaron cuatro dosis de EDL (humano y bovino) 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 U/ml.

3.2. Efecto del Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino en la expresión de RNAm que codifican para Citocinas TH₁ y TH₂ en sangre completa estimulada con LPS

Las Células Mononucleares Periféricas (CMP) se extrajeron de los siguientes tratamiento: células estimuladas con LPS (2 ng/ml), Sulfato de Polimixina B (400 U/ml), EDLB (1 /ml), EDLB (1 U/ml), LPS+Sulfato de Polimixina B, LPS+EDLB, LPS+EDLB y células sin estimular, por centrifugación en gradiente. El RNA total extraído de las CMP se utilizó para sintetizar el DNA complementario (DNAc) por medio de la enzima transcriptasa reversa M-MLV, posteriormente se amplificó por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) un gen constitutivo, que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), obteniéndose un producto de aproximadamente

452 pb para cada tratamiento, esto con el fin de determinar la integridad del DNAC (Figura 11).

Inmediatamente se amplificó el DNAC para las citocinas TH₁ (Figura 12 y 13). La IL-2 (305 pb) no amplificó en ninguno de los tratamientos efectuados. Sin embargo, en las células tratadas con LPS se observó la amplificación para INF- γ (427 pb), mientras que en las células que fueron estimuladas en forma simultanea con LPS y EDL humano o bovino, no se observó la amplificación para INF- γ . Además se amplificaron los DNAC para citocinas TH₂, IL-4 e IL-10, dando productos de 456 y 426 pb respectivamente, en las CMP estimuladas simultáneamente con LPS y EDL humano o bovino, se observó la amplificación de IL-4 y de IL-10; sin embargo, en las células estimuladas con LPS no se amplificó el gen para IL-4 pero si para IL-10, este último gen se amplificó con mayor intensidad en las muestras estimuladas simultáneamente con LPS y EDL. (Figura 14 y 15).

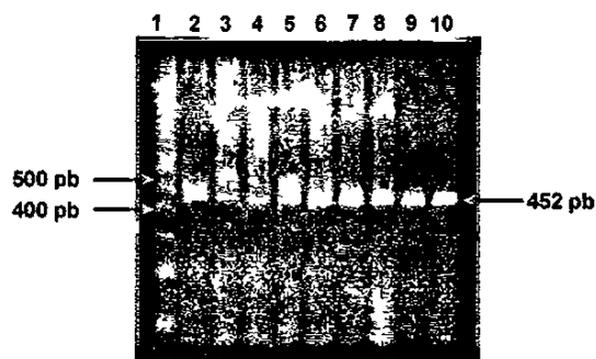


Figura 11. Análisis de la expresión de G3PDH (452 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB). Se amplificaron por RT-PCR muestras de CMP cultivadas simultáneamente por 5h con LPS y EDL Humano y Bovino (EDLH y EDLB), tal como se describe en materiales y métodos. 1) PM Lader 100, 2) Células, 3) Células + LPS (2 ng/ml), 4) Células + LPS (2 ng/ml) + Polimixina B (400 U/ml), 5) Células + Polimixina B (400 U/ml), 6) Células + EDLB (1 U/ml), 7) Células + LPS (2ng/ml) + EDLB (1 U/ml), 8) Células + EDLH (1 U/ml), 9) Células + LPS (2 ng/ml) + EDLH (1 U/ml) , y 10) Control positivo

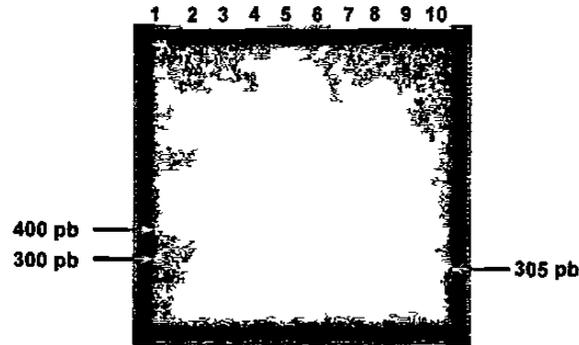


Figura 12. Análisis de la expresión de IL-2 (305 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB). Se amplificaron por RT-PCR muestras de CMP cultivadas simultáneamente por 5h con LPS y EDL, Humano y Bovino (EDLH y EDLB), tal como se describe en materiales y métodos. 1) PM Lader 100, 2) Células, 3) Células + LPS (2 ng/ml), 4) Células + LPS (2 ng/ml) + Polimixina B (400 U/ml), 5) Células + Polimixina B (400 U/ml), 6) Células + EDLB (1 U/ml), 7) Células + LPS (2ng/ml) + EDLB (1 U/ml), 8) Células + EDLH (1 U/ml), 9) Células + LPS (2 ng/ml) + EDLH (1 U/ml) y 10) Control positivo

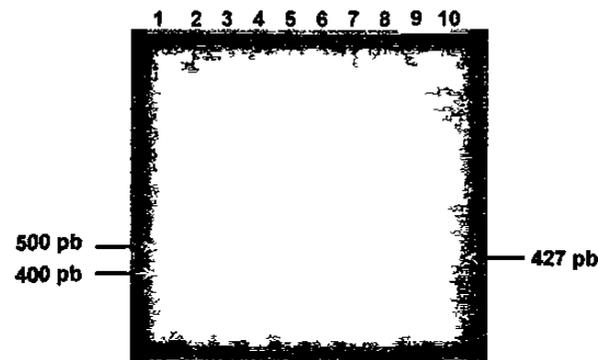


Figura 13. Análisis de la expresión de INF- γ (427 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB). Se amplificaron por RT-PCR muestras de CMP cultivadas simultáneamente por 5h con LPS y EDL, Humano y Bovino (EDLH y EDLB), tal como se describe en materiales y métodos. 1) PM Lader 100, 2) Células, 3) Células + LPS (2 ng/ml), 4) Células + LPS (2 ng/ml) + Polimixina B (400 U/ml), 5) Células + Polimixina B (400 U/ml), 6) Células + LPS (2ng/ml) + EDLB (1 U/ml), 7) Células + EDLB (1 U/ml), 8) Células + LPS (2 ng/ml) + EDLH (1 U/ml), 9) Células + EDLH (1 U/ml) y 10) Control positivo

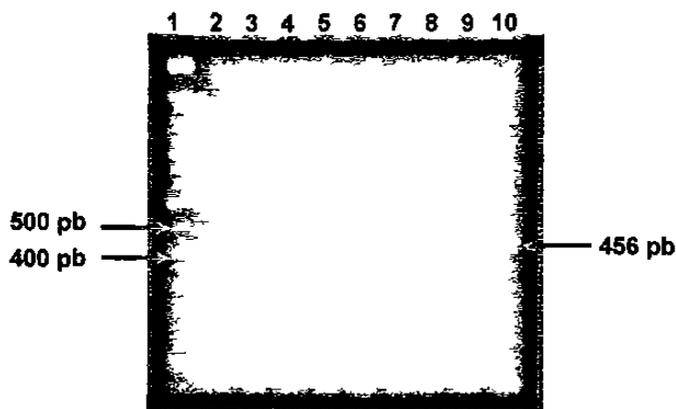


Figura 14. Análisis de la expresión de IL-4 (456 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB). Se amplificaron por RT-PCR muestras de CMP cultivadas simultáneamente por 5h con LPS y EDL, Humano y Bovino (EDLH y EDLB), tal como se describe en materiales y métodos. 1) PM Lader 100, 2) Células, 3) Células + LPS (2 ng/ml), 4) Células + LPS (2 ng/ml) + Polimixina B (400 U/ml), 5) Células + Polimixina B (400 U/ml), 6) Células + LPS (2ng/ml) + EDLB (1 U/ml), 7) Células + EDLB (1 U/ml), 8) Células + LPS (2 ng/ml) + EDLH (1 U/ml), 9) Células + EDLH (1 U/ml) y 10) Control positivo

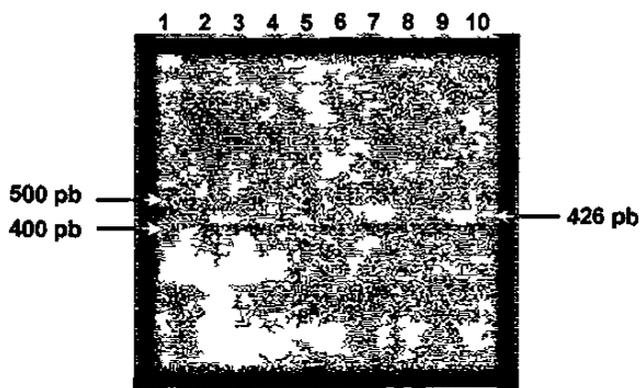


Figura 15. Análisis de la expresión de IL-10 (426 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos (EDL). Se amplificaron por RT-PCR muestras de CMP cultivadas simultáneamente por 5h con LPS y EDL, Humano y Bovino (EDLH y EDLB), tal como se describe en materiales y métodos. 1) PM Lader 100, 2) Células, 3) Células + LPS (2 ng/ml), 4) Células + LPS (2 ng/ml) + Polimixina B (400 U/ml), 5) Células + Polimixina B (400 U/ml), 6) Células + EDLB (1 U/ml), 7) Células + LPS (2ng/ml) + EDLB (1 U/ml), 8) Células + EDLH (1 U/ml), 9) Células + LPS (2 ng/ml) + EDLH (1 U/ml) y 10) Control positivo

3.3. Efecto del Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino en la expresión de RNAm que codifican para Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por multiPCR

Con el fin de determinar si el EDL aparte de inhibir la producción de TNF- α inducido por LPS; puede inducir o inhibir alguna otra citocina involucrada en el proceso de inflamación, se determinó la expresión de RNAm que codifican para las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y IL-12p40 en Células mononucleares periféricas (CMP) estimuladas simultáneamente con LPS (2 ng/ml) y 1 U/ml de EDL humano o bovino.

El RNA total extraído de las CMP de los diferentes tratamientos, se utilizó para sintetizar el DNA complementario (DNAc), por medio de la enzima transcriptasa reversa; a partir del cuál se amplificó por PCR el DNAc, que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Se obtuvo un producto de aproximadamente 452 pb, utilizado para determinar la integridad del DNAc. (Figura 11).

Posteriormente se amplificó el DNAc para las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 e IL-10 en un sistema multiPCR (Maxim Biotech Inc.) dando productos de amplificación de 680, 556, 432,, 359, 300 y 223 pb respectivamente.

Las células estimuladas con LPS amplificaron para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 e IL-10, sin embargo; en las muestras que fueron cultivadas simultáneamente con LPS y EDL humano o bovino amplificaron para IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 e IL-10. La IL-10 se sigue observando con una mayor intensidad en las muestras que fueron cultivadas simultáneamente con EDL (humano o bovino) y LPS, además de que se observó una disminución en la amplificación para IL-12p40 mientras que las demás citocinas no se muestra alterada su amplificación, como se muestra en la Figura 16.

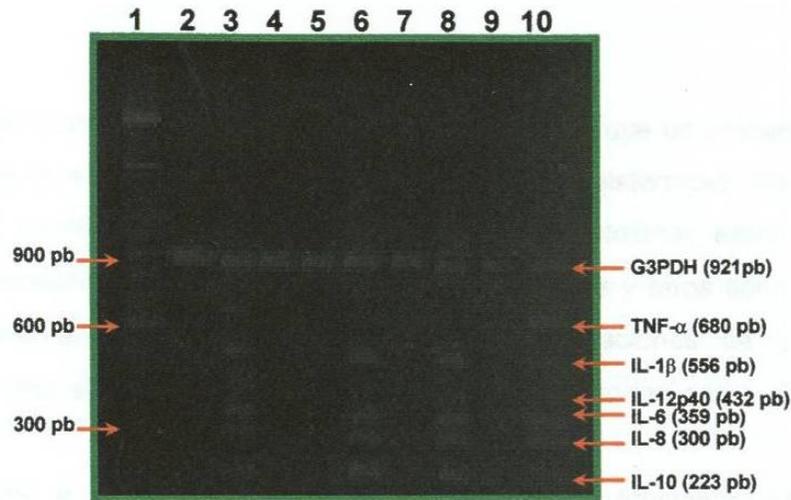


Figura 16. Análisis de la expresión por multiPCR de G3PDH (921 pb), TNF- α (680 pb), IL-1 β (556 pb), IL-12p40 (432 pb), IL-6 (359 pb), IL-8 (300 pb) e IL-10 (223 pb) en Células Mononucleares Periféricas (CMP) cultivadas simultáneamente con Lipopolisacárido (LPS) y Extracto Dializable de Leucocitos de origen Humano y Bovino (EDLH y EDLB). Se amplificaron por multiPCR muestras de CMP cultivadas simultáneamente por 5h con LPS y EDL, Humano y Bovino (EDLH y EDLB), tal como se describe en materiales y métodos. 1) PM Lader 100, 2) Células, 3) Células + LPS (2 ng/ml), 4) Células + LPS (2 ng/ml) + Polimixina B (400 U/ml), 5) Células + Polimixina B (400 U/ml), 6) Células + LPS (2ng/ml) + EDLB (1 U/ml), 7) Células + EDLB (1 U/ml), 8) Células + LPS (2 ng/ml) + EDLH (1 U/ml), 9) Células + EDLH (1 U/ml) y 10) Control positivo

DISCUSIÓN

La producción incontrolada y excesiva de citocinas constituye un mecanismo patológico importante en la activación de respuestas inflamatorias sistémicas inducidas por LPS. Los eventos asociados con respuestas dañinas a endotoxinas están atribuidos a la producción excesiva de TNF- α por monocitos/macrófagos y otros tipos de células. Los monocitos son altamente sensibles a bajas concentraciones de LPS (10 pg/ml) produciendo una síntesis rápida de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β .⁹¹

El LPS a bajas concentraciones estimula las funciones de los fagocitos mononucleares y actúa como un activador policlonal de las células B, que contribuyen a la eliminación de la invasión bacteriana, sin embargo; a altas concentraciones causan daño a tejido, coagulación intravascular diseminada y provocan choque séptico, que frecuentemente resulta en la muerte.² Cuando existe sepsis por bacterias gram negativas, se producen cantidades masivas de TNF- α , y las concentraciones séricas pueden exceder a 10^{-7} M. Los animales que producen mucho TNF- α mueren de colapso respiratorio y coagulación diseminada, pero esta mortalidad puede ser evitada administrando anticuerpos monoclonales anti-TNF- α .¹

En este estudio se utilizó el Factor de Transferencia del Extracto Dializable de Leucocitos (EDL-FT), el cuál es considerado un Modulador de la Respuesta Biológica (MRB) debido a su potencial para restablecer un desequilibrio inmunológico entre la respuesta celular o humoral, la cuál puede estar manifestada por estados de hipersensibilidad o inmunodeficiencia transfiriendo inmunidad celular. Además, se conoce que tiene la capacidad de inducir otros efectos biológicos *in vitro* como: la liberación de citocinas (LIF, MIF, etc.), la activación de monocitos/macrófagos, la inhibición de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), el incremento de la quimiotaxis, la actividad de células NK, incrementa la expresión de CD2 en linfocitos T, etc. Sin embargo, en la actualidad existe un escepticismo en su valor terapéutico por parte de los especialistas debido a que no se conoce con exactitud su mecanismo de acción.

Nosotros hemos demostrado en este estudio que el EDL de origen humano y bovino es capaz de reducir enormemente la producción de TNF- α inducido por LPS en sangre completa. Lo anterior coincide con lo reportado previamente por Ojeda-Ojeda y col., ellos determinaron que el EDL de origen humano cultivado simultáneamente con LPS en sangre completa reduce de 4-1.6 veces la producción del TNF- α ,⁶⁹ sin embargo; nosotros encontramos que nuestro EDL de origen humano reduce la secreción de TNF- α inducido por LPS de 45.4-2.4 y el de origen bovino de 24.0-3.8 veces, probablemente estas diferencias en el grado de reducción de la producción de TNF- α sea debida en parte a la forma de obtención del EDL, ya que ellos utilizan leucocitos estimulados con virus sendai por un período de 18 horas.²⁸ Por otra parte, la composición variable del EDL y la obtención de un principio activo no estandarizado puede explicar diferencias de los resultados entre los dos estudios, lo cuál sigue siendo un problema aun no resuelto. Así mismo, determinamos que el EDL bovino presenta el mismo efecto que el extracto obtenido de leucocitos humanos al inhibir la producción de TNF- α en un sistema endotóxico *ex vivo*, ya que al aumentar la concentración del extracto humano o bovino hay una mayor disminución de la producción de TNF- α en sangre completa (Figura 6). El haber utilizado sangre completa activada policlonalmente (PHA) para este estudio según De Groote y col., nos provee mayor exactitud y la reproductibilidad de la producción de citocinas comparada con la estimulación de Células Mononucleares Periféricas (CMP), debido a que además los métodos para aislar CMP modifican la relación de monocitos/linfocitos pudiendo influir en la producción cualitativa y cuantitativa de las citocinas. Sin embargo, en sangre completa no solamente se preservan las interacciones naturales células-células, sino que también se mantienen los inhibidores y estimuladores circulantes tales como los receptores solubles.¹⁷

Por otra parte, determinamos que el EDL humano o bovino, inhibe la expresión del RNAm que codifica para las citocinas TNF- α e INF- γ , pero no inhibe los mensajeros de la IL-1 β , IL-12p40, IL-6 e IL-8 que también son consideradas citocinas pro-inflamatorias, por otra parte; induce los mensajeros para las citocinas inmunoregulatoras con capacidad anti-inflamatoria la IL-10 y la IL-4, esto nos indica que el TNF- α es inhibido por el EDL debido a su potencial inmunomodulador sin importar su origen de obtención, es decir; el EDL provee un fino balance entre las subpoblaciones TH₁ y TH₂. Las dos subpoblaciones se regulan por medio de la elaboración de citocinas

en forma cruzada, así TH₁ produce interferón gamma, IFN- γ , que inhibe a TH₂ y a su vez TH₂ produce interleucina 10, IL-10, que inhibe a TH₁.⁵⁶ (Figura 1)

El LPS induce una rápida sobre regulación de genes transcripcionales que codifican para las citocinas inflamatorias, e incrementa la estabilidad de los mensajeros y aumenta la expresión de las proteínas a nivel translacional.^{40,92} La mayor expresión de RNAm que codifican para TNF- α se observa después de 0.5 a 2 horas de añadido el LPS y después disminuye,⁹³ con una máxima expresión proteica de 4 a 8 horas. Estudios previos sugieren que los monocitos comienzan a expresar TNF- α después de 5 a 15 minutos de ser expuestos al LPS.³⁴ Estudios realizados por Fiorentino y col., indican que la IL-10, es una citocina TH₂ con capacidad anti-inflamatoria que inhibe la producción de otras citocinas principalmente el INF- γ , citocina TH₁,³⁰ y que además inhibe la producción de otras citocinas pro-inflamatorias como son la: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α , por monocitos activados por LPS, INF- γ , o LPS+INF- γ .⁶⁷ Igualmente Poll y col., reportó que la IL-10 inhibe la producción de TNF- α inducido por LPS, y que además existe una autorregulación entre las secreciones de TNF- α e IL-10.⁷⁸ La IL-4, se distingue por ser un factor de crecimiento y diferenciación para células B, necesario para la proliferación y la secreción de anticuerpos por células B en respuesta a un antígeno proteico. Es también un factor de crecimiento de células T y puede actuar como un factor activador de macrófagos pero puede antagonizar algunos de los efectos del INF- γ sobre los macrófagos, así mismo, el INF- γ por su parte es un potente activador de los fagocitos mononucleares e induce la síntesis de otras citocinas pro-inflamatorias tales como el TNF- α .¹⁴ La IL-1 aumenta la proliferación de células T CD4 y células B, induce la síntesis de la misma IL-1 y de IL-6 por otros tipos celulares, incluyendo fagocitos mononucleares, fibroblastos y células endoteliales. La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que es sintetizada también por fagocitos mononucleares, células endoteliales y fibroblastos, al igual que la IL-1 y el TNF- α es secretada en la circulación en respuesta a una infección bacteriana pero también lo es por la misma IL-1 y por el TNF- α .¹⁴

La producción del TNF- α en cantidades exorbitantes, juega un importante papel en el choque séptico. Las observaciones hechas en este estudio indican que el EDL puede ser utilizado como una alternativa terapéutica modulando el perfil de citocinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias en la inhibición de la producción de TNF- α inducido

por LPS, es importante seguir explorando nuevas alternativas terapéuticas de uso para el EDL en donde se vea afectado la regulación de las citocinas. Previamente se había reportado que en pacientes con choque séptico las concentraciones de Proteína C reactiva se ven disminuidas por la utilización de EDL, sin embargo; es importante seguir tratando de identificar el mecanismo de acción por el cuál el EDL puede modular estas acciones terapéuticas.

Los resultados expuestos en esta estudio son de importancia relevante para el tratamiento de varias enfermedades, donde la secreción de TNF- α juega un papel patogénico, incluyendo asma, artritis reumatoide, SIDA y esclerosis múltiple.^{7,78,82,83}

CONCLUSIONES

- El Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) es capaz de inhibir la producción de TNF- α inducida por LPS.
- El origen del Extracto Dializable de Leucocitos no importa en la inhibición de la producción de TNF- α inducido por LPS.
- La inhibición de la producción de TNF- α es dependiente de la concentración del EDL.
- El EDL inhibe la producción de TNF- α inducido por LPS debido a su capacidad inmunoregulatoria entre las subpoblaciones TH₁ y TH₂.
- El EDL inhibe la producción de TNF- α inducido por LPS mediante la inducción de una citocina inmunoregulatoria como la IL-10, considerada una citocina TH₂ anti-inflamatoria.
- El EDL puede inducir la expresión de IL-4, citocina inmunoregulatoria del tipo TH₂ con capacidad anti-inflamatoria.
- El EDL es capaz de inhibir la expresión de INF- γ (citocina pro-inflamatoria).

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, AK; Lichtman, AH and JS Pober. (1997) Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Co.
2. Ablashi, DV; Levine, PH; DeVinci, C; Whitman, JE Jr; Pizza, G; and D Viza. (1996) Use of anti HHV-6 transfer factor for the treatment of two patients with chronic fatigue syndrome (CFS). Two case reports. *Biotherapy* 9:81-86.
3. Alvarez-Trull, L; and CH Kirkpatrick. (1996). Profiles of cytokines production in recipients of transfer factors. *Biotherapy* 9:55-59.
4. Arala-Chávez, MP; Lebacqz, EG and JF Heremans. (1967). Fractionation of human leukocyte extracts transferring delayed hypersensitivity to tuberculin. *Int Arch Allergy* 31:353-357.
5. Baram, P; Yuan, L; and MM Mosko. (1966). Studies on the transfer of human delayed type hypersensitivity. *J. Immunol* 97:407-411.
6. Barsten, A; Croft, S; and I Edward. (1976). *Transfer Factor : Basic properties and clinical applications* (Asher, MS; Gottlieb, AA; Kirkpatrick, CH) Academic Press N.Y. 75p
7. Broide, DH; Lotz, M; Cuomo, AJ et al. 1992. *J. Allerg Clin.* 89:958-967.
8. Burger, DR; Vanderbark, AA; Dunnick, W; Kraybill, W; Dayes, GP and RM Vetto. (1979). Human Transfer Factor : Structural properties suggested by HPRP chromatography and enzymatic sensitivities. *J. Immunol* 122:1091-1095.

9. Burger, DR; Walper, DA; Vanderbark, AA and DH Regan. (1979). A structural model foy Human Transfer Factor. Ann New York Acad Sci. 236p
10. Carswell, EA. Old, LJ; Kassel, RL and B Williamson. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. Proc Natl Acad Sci USA 72:3666-3670.
11. Catanzaro, A., Spitler, LE and KM Moser. (1974). Immunotherapy of coccidiomycosis. J Clin Invest 54:690-694.
12. Cerami, A and B Beutler. The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. (1988). Inmunology Today 9(1):28-31.
13. Cohen, L; Holzam, RS; Valentine, FT and HS Lawrence. (1976). Requeriment of precommitted cells as targets for the augmentation of lymphocyte proliferation by leococyte dialisates. J Exp Med 143:171-174.
14. Curfs, JHAJ; Meis, JFGM; and JAA Hoogkamp-Korstabje. (1997). A primer on Cytokines : Sources, Receptors, Effects and Inducers. Clinc Microbiol Rev Oct:742-780.
15. Chomczynski, A. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques 51:532-536.
16. DeVinci, C; Levine, PH; Pizza, G; Fudenberg, HH; Orens, P; Pearson, G; and D. Viza. (1996) Lessons from pilot study of transfer factor in chronic fatigue syndrome. Biotherapy 9:87-90.
17. DeGroote, D; Gevert. Y; López, M; Gathy, R; Marchal, F; Detroz, B; Jacquet, N; and V. Geenen. (1996). Ex Vivo Cytokine Production by Whole Blood Cells From Cancer Patients. Cancer Detec Prev 20(3):207-213.

18. Doelker, I; and FA Anderer. (1992) The CySF-L2 factor from dialysable human leucocyte extract activates natural killer cytotoxicity by induction of interferon gamma. *Cancer Immunol Immunother* 34(5):299-305 .
19. Doelker, I; Voetsch, W and Anderer FA. (1989) Activation of antitumor cytotoxicity of human blood mononuclear cells by a basic factor from dialysable human-leukocyte extract. *Anticancer Res Nov-Dec*;9(6):1915-20
20. Dupont, B; Bellow, M; and J Hansen. (1974) Effect of Transfer Factor therapy on mixed lymphocyte culture reactivity. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 71:867-871
21. Dwyer, JM. (1996) Transfer Factor in the age of molecular biology : a review. *Biotherapy* 9:7-11
22. Eigler, A; Sinha, B; Hartmann, G and S Endres. (1997) *Immunology Today* 18(10):487-492
23. Encino, JA; Serrano-Miranda, E; Gómez-Martínez, JC; Portugués-Díaz, A; Badillo, A; Orea-S, M; Gómez-Vera, J; Flores-Sandoval, G and S. Estrada-Parra. Cytokine and Lymphocyte levels in extrinsic Asthma patients treated with transfer Factor. XIth International Congress on Transfer Factor. March 1999
24. Estrada-Parra, S; Chávez-Sánchez, R; Ondarza-Aguilera, R; Corea-Meza, B; Serrano-Miranda, E; Monges-Nicolau, A; and C Calva-Pellicer. (1995) Immunotherapy with transfer factor of recurrent herpes simplex type I. *Arch Med Res* 26 Sep:587-592
25. Estrada-Parra, S; Cabezas-Q, R; Velasco-C, O; Ondarza-A, R; Chávez-S, R; Berrón-P, R; Pedroza, A; Serrano-M, E; Calva-P, C; Pérez de la M, C; Correa-M, B; Ramírez-R, R; Estrada-G, I; Rojas-E, O; Sánchez-G; Badillo-F, A; García-C, M; Santos-A, L; Flores-S, G; Orea-S; Guido-B, R; Reyes-C, S; Taméz-G, R; Rodríguez-P, C; Salinas-CM; Welch, J; Montes-P, JL; y G Jiménez-B. Actividad Terapéutica e

- Inmunoreguladora del Factor de Transferencia. 2^{do} Simposium de inmunoestimulantes e Inmunomodulación. Noviembre 5-6 de 1998. México, D.F.
26. Estrada-Parra, S; Velasco-Castrejón, O; Reborá, F; Díaz, ML y J Padierna (1983) Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con Factor de Transferencia específico. *Salud Pública de México*. 25:580-600.
 27. Fauci, SA; Rosenberg, SA; Sherwin, AS; Longo, LDL and H Clifford (1987) Immunomodulators in Clinical Medicine. *Ann Inter Med* 106:421-433.
 28. Fernández-Ortega, C; Dubed, M ; Ruibal, O; Vilarrubia, OL; Menéndez de San Pedro, JC; Navea, L; Ojeda, M y MJ Araña (1996) Inhibition of *in vitro* HIV infection by dialysable leucocyte extracts. *Biotherapy* 9(1-3):33-40
 29. Fiorentino, DF; Zlotnik, A; Mosmann, TR; Howard, M and A. O'Garra (1991) IL-10 Inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal Immunol* 147(11):3815-3822.
 30. Fiorentino, DF; Bond, MW and TR Mossmann (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2086.
 31. Fireman, P; Boesman, M; Haddad, ZH and D Gitlin (1967) Passive Transfer of tuberculin activity *in vitro*. *Science* 155:337-340.
 32. Fudenberg, HH and Fudenberg, HH (1989) Transfer Factor: Past, present and future. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:475-516.
 33. Fudenberg, HH and C Smith (1981) Immunomodulation and immunotherapy. An overview of biologic and synthetic agents and their effects human immune system. *Rev Immunol Immunopharmacol* 1:3-11

34. Gallay, P; Jongeneel, CV; Barras, C; Burnier, M; Baumgartner, JD; Glauser, MP and D Heumann (1993) Short time exposure tu lipopolysaccharide is sufficient to activated human monocytes. *J Immunol* 150:5086-5093.
35. Gallin, J and CH Kirpatrick (1974) Chemotactic activity in dializable Transfer Factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 71:498-502
36. Gottlieb, AA; farmer, JL; Matzura, CT; Hester, RB and JL Rosenberg (1984) Modulation of human T cell production of migration inhibitory lymphocytes by cytokines derived from human leucocyte dialyzates. *J. Immunol* 132(1):256
37. Gottlieb, AA; Gotlieb, MS and VE Scholes (1987) Clinical and immunological effects of an immunodulator derived from leucocyte dialisates. In *leucocyte dialysates and Transfer Factor*. (de. by : Mayer, v., Borvak, J.) Bratislava 359p.
38. Hamblin, A and DC Dumonde (1976) *Transfer Factor: Basic properties and clinical applications* (Asher, MS; Gottlieb, AA; and CH Kirkpatrick) Academic Press N.Y. 49p
39. Hamprecht, KH; Votsch, W and FA Anderer (1989) A dialysable acid factor from human leukocyte extracts activates tumor cell lysis mediated by human monocytes and natural killer cells. *Onkologie* Jun 12(3):120-7
40. Hans, J; Brown, T and B Beutler (1990). Endotoxin-responsive sequences control cachetin/tumor necrosis factor biosynthesis at the tranlational level. *J Exp Med* 171:465-475.
41. Hansen, MB; Nielsen, SE and K Berg (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth /cell kill. *J Immunol Methods* 119:203-210.
42. Holzman, RS and HS Lawrence (1977) In vitro augmentation of lymphocyte sheep cell rosette formation by leukocyte dialysates. *J Immunol* May 118(5):1672-1676.

43. Iushkova, TA and VV Iushkov (1988) The immunomodulating activity of a transfer-factor preparation transflavin, specific to tick-borne encephalitis virus Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol Mar-Apr (2):83-85.
44. Kirpatrick, CH (1988) Transfer Factor. J Allergy Clin Immunol 81:803-807.
45. Kirpatrick, CH; Rich, RR; and TK Smit (1972) Effects of Transfer Factor on lymphocyte function in anergic patients. J Clin Invest 51:2948-2953.
46. Klebanoff, SJ; Vadas, MA and M Waltersdorff (1986) Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J Immunol 136:4420-4425.
47. Korhn, K., Grohn, P., Horsmanheimo, M. and Virolainen, M. 1976. Fractionation studies of human leukocyte dialysates. Demonstration of three components with transfer activity. Medical. Biol. 54 :334
48. Lang, I; Nekam, K and P Gergely (1982) Effect of in vivo and in vitro treatment with dialyzable leucocyte extracts containing Transfer Factor activity on human natural killer cell activity. Clin Immunol Immunopathol 25:139-144
49. Lawrence, HS (1974) Transfer Factor. The Harvey Lectures. Series 68. Acad. Press. New York.
50. Lawrence, HS; Rapaport, FT; Converse, JM and WS Tillet (1959) Transfer of delayed hypersensitivity to skin homografts with leukocyte extracts in man. J Clin Invest 99:373.
51. Lawrence, HS and S al-Askari (1971) The preparation and purification of transfer factor. In vitro methods in cell mediated immunity. (ed. by Bloom, BR; Galde BR) Academic Press. New York. 531 p

-
52. Lawrence, HS and W Borkowsky (1981) Transfer Factor : recent developments in the pursuit of on idea. *Cell Immunol* 27:323.
 53. Lawrence, HS and W Borkowsky (1996) Transfer Factor-current status and future prospects. *Biotherapy* 9:1-5.
 54. Littman, BH; Hirsman, EM JR David (1976) Academic Press. NY. 158p. (Hamblin, A; and DC Dumonde Transfer Factor : Basic properties and clinical applications (Asher, MS; Gottlieb, AA and CH Kirkpatrick) Academic Press N.Y. 49p
 55. Liubchenko, TA; Holeva, OH; Kholodna, LS; Smirnov, VV and A Vershyhora (1997) The biological activity of the transfer factor induced by bacterial antigens. *Mikrobiol Z* 59:83-100.
 56. López-Pérez, G. (1996) Modificadores de la Respuesta Biológica. Un uso racional. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica* 5(5):146-147.
 57. Malefyt, RW; Abrams, J; Bennett, B; Figdor, CG and JE Vries (1991) Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Cytokine synthesis by Human Monocytes: An autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.
 58. Manda, T; Shimomura, K; Mukumoto, S. and K Hiroyuki (1987) Recombinant human tumor necrosis-alfa: evidence of an indirect mode of antitumor activity. *Cancer Res* 47:3703-3711.
 59. Martins E. Silva J. (1991). Biochemical characterization and effects of the TNF. *Acta Med-Port* 4 Suppl 1:20-27.
 60. Meduri, R; Campos, E ; Scorolli, L; DeVinci, C; Pizza, G and D Viza (1996) Efficacy of transfer factor in treating patients with recurrent ocular herpes infections. *Biotherapy* 9:61-66.

61. Métodos Generales de Análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1994) sexta edición SSA. México.
62. Mulchany, G and PJ Quinn (1986) A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Therap* 9:119-139.
63. Neidhart, JA; Swarts, RS; Hurtibise, PE; Murphy, SG; Metz, EN; Balcerzak, SP and AF Lobuglio (1973) Transfer factor : islotions of a biological active component. *Cell Immunol* 9:319
64. Nekam, K; Varro, R; Torok. K; Lang, I; Kalmar, L; Gergely, P and G Petranyi G (1980) The effect of transfer factor on spontaneous shedding of sheep red blood cell binding receptors of T lymphocytes in vitro. *Acta Med Acad Sci Hung* 37(1):83-8
65. Nekam, K; Fudenberg, H and B Mandi (1981) Resynthesis of trypsinised sheed reedblood cell receptores on human lymphocytes comparison of the effects of biological and synthetic origin in vitro. *Immunopharmacology* 3:31-39
66. Nekam, K; Lang, I; Gergely, P and J Fehr (1987) The first last thirty years of transfer factor a short overview. In *leucocyte dialysates and transfer factor* 8(ed. by Mayer, V; Borvak, J.) Bratislava. 196p.
67. Nekman K and I Lang (1979) Effect of therapy with dialyzable leucocyte extracts containing Transfer Factor activity on antibody depent cytokines activity in humans. *Clin Immunol Immunopathol* 13 :402-412.
68. North, RJ and Havell. (1988). The antitumor function of the tumor necrosis factor (TNF). *J Exp Med* 167:1086-1099.
69. Ojeda-Ojeda, M; Fernández-Ortega, C; and Araña-Rosainz, MJ (1996) Dialysable leucocyte extract (DEL) reduces lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor secretion in human leucocytes. *Biotherapy* 9:163-170.

70. Old, Lloyd J. (1985) Tumor Necrosis Factor (TNF) *Science* 230:630-632.
71. Paddock, JV; Wilson, GB; Williams, AM and HH Fudenberg (1983) Human Transfer Factor : exogenous labelling purification and role of ribonucleic acid segment. In *Immunobiology of transfer Factor* (de. by : Kirpatrick, CH; Burger, DR; Lawrence, HS) Academic Press New York. 51 p
72. Padierna-Olivos, L; Godinez-Coyt, S; Díaz-Maqueo, J; García, E; Agaez, MA; Velasco-Castrejón, O; Padierna-Olivos, J y S Estrada-Parra (1985) Factor de Transferencia en pacientes con herpes zóster. *Infectología* 11:293-298.
73. Pilotti, V; Mastrorilli, M; Pizza, G, DeVinci, C; Bussutti, L; Palareti, A; Gozetti, G and A Cavallari (1996) Transfer Factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer(NSCLC) therapy. *Biotherapy* 9:117-121.
74. Pizza, G; Viza, D; DeVinci, C; Palareti, A; Cuzzocrea, D; Fornarola, V and R Baricordi (1996) Orally administered HSV-specific transfer factor (TF) prevents genital or labial herpes relapses. *Biotherapy* 9:67-72.
75. Pizza, G; DeVinci, C; Curzzocrea, D; Menniti, D; Aiello, E; Maver, P; Corrado, G; Romagnoli, P; Dragon, E; LoConte G; Riolo, U; Palareti, A; Zucchelli, P; Fornarola, V and D Viza (1996) A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastasic prostate cancer. *Biotherapy* 9:123-132.
76. Pizza, G; DeVinci, C and HH Fudenberg (1994) Transfer Factor in Malignancy. *Progress In Drug Research* 9:117-121.
77. Poli, G; Kinter, A; Justement, JS; Bressler, P; Stanley, S and AS Fauci (1990) Tumor necrosis factor α functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci* 87:782-785.

-
78. Poll, T; Jansen, J; Levi, M; Ten Cate, H; and SJH vanDenventer (1994) Regulation of Interleukin 10 Release by Tumor Necrosis Factor in Human and Chimpanzees. *J Exp Med* 180:1985-1988.
 79. Roitt, I; Brostoff, J and D Male (1993) *Immunology*. Third edition. Ed Mosby.
 80. Schimidtmayerova, H; Chermann, JC; Rey, F; Barre-Sinoussi, F and V Mayer (1987) The effect of lysates of leucocyte ultrafiltrate on the human immunodeficiency virus "HIV": *in vitro* study. In *leucocyte dializate and Transfer Factor*. (ed. by : Mayer, V; Borvak, J.) Bratislava. 366p
 81. Spitler, LE; Levin, AS; Stites, DP; Fudenberg, HH; Pirotsky, B; August, CS; Stiehn, ER; Hitzing, WH and RA Gatti (1972) The Wiskott-Aldrich syndrome results of transfer factor therapy. *J Clin Invest*. 51:3216
 82. Strieter, RM; Kunkel, SL and G Bone (1993) Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. *Crit Care M* 21:4447-4463.
 83. Tracey, KJ and A Cerami (1993) Tumor Necrosis factor, other Cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 9:317-343.
 84. Urban, JY; Shepard, HM and Hans (1986) Tumor Necrosis Factor: a Potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Pro Natl Acad. Sci USA* 83: 5233-5237.
 85. Vanderback, AA; Burger, DR; Dreyer, DL; Daves, G and RM Vetto (1977) Human Transfer factor: fractionation by electrofocusing and high pressure reverse phase chromatography. *J Immunol* 118:636
 86. Viza, L; Patrasco, P; Hebbrecht, L and A Vich Preliminary Report on Three AIDS Patients Treated with Anti-HIV Specific Transfer Factor. *J. Exp Pathology* 3:Number4:653

87. Vogels, MAE and JWM Van der Meer (1992) Use of Immune Modulators in Nonspecific therapy of Bacterial Infections. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* Jan :1-5.
88. Wilson, GB; Fudenberg, HH and M Horsmanheimo (1972) Effects of dialysable leucocyte extracts with transfer factor activity on leucocyte migration in vitro. I. Antigen depend inhibition and enhancement of migration. *J Lab Clin Med* 93(5):800
89. Wilson, GB; Paddock, GV and HH Fudenberg (1981) Bovine "Transfer Factor" an oligoribonucleopeptide which initiates antigen specific lymphocytes responsives. *Thymus* 2:257
90. Wilson, GB; Welch, TM; Knapp, DR; Horsmanheimo, A and HH Fudenberg (1976) Characterization of Tx an active subfraction of human dialisable transfer factor. *Clin Immunol Immunopathol* 8:551
91. Zhong, WW; Burke, PA; Hand, AT; Walsh, MJ; Hughes, LA and RA Force (1993) Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *Arch Surg* 128:158-164.
92. Zuckerman, SH; Evans, GF; Snyder, YM and Roeder, WR (1989) Endotoxin-macrophage interactions:post-translational regulation of tumor necrosis factor expression. *J Immunol* 143:1223-1227.

