

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE EL EXTRACTO DIALIZABLE DE
LEUCOCITOS BOVINO (EDLb) EN EL SHOCK
ENDOTOXICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACARIDOS

POR
MOISES ARMIDES FRANCO MOLINA

COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

Agosto, 2004

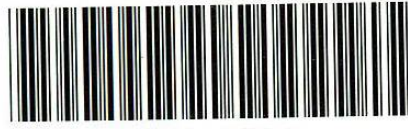
TD

Z5320

FCB

2004.

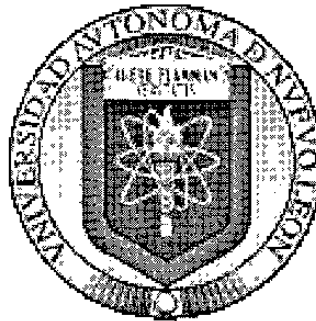
.F7



1020150218

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFEECTO DE EL EXTRACTO DIALIZABLE DE
LEUCOCITOS BOVINO (EDLb) EN EL SHOCK
ENDOTOXICO INDUCIDO POR
LIPOPOLISACARIDOS**

**POR:
MOISES ARMIDES FRANCO MOLINA**

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA**

Agosto, 2004

588 284

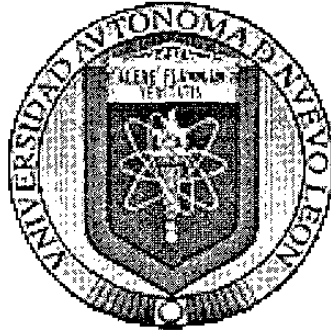
TD
Z5330
FEB
2004
F7



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE EL EXTRACTO DIALIZABLE DE
LEUCOCITOS BOVINO (EDLb) EN EL SHOCK
ENDOTOXICO INDUCIDO POR
LIPOPOLISACARIDOS

POR:
MOISES ARMIDES FRANCO MOLINA

Comité de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Secretario

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Vocal

Agosto, 2004

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L. bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

DEDICATORIA

A DIOS: Por ser parte de su voluntad

A mis padres:

Lic. Armides Franco Lastra
Lic. Martha Evangelina Molina Ramos
Con amor y agradecimiento

A mis hermanos:

Ana María de la Luz Franco Molina
Alan Guadalupe Franco Molina
Rosa Elena Franco Lastra
Por su cariño y apoyo que siempre me han brindado

A Laura Elisa Córtes Gónzales: Con todo mi amor

A mis familiares y amigos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, mi más sincero agradecimiento, por su dirección y apoyo de parte fundamental de mi formación profesional.

Al Dr. Reyes S. Támez Guerra, por su confianza y apoyo incondicional he logrado llegar al término de una etapa más de mi formación profesional.

A todos los maestros que de manera directa e indirecta, han participado en mi desarrollo como profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo brindado durante la realización de éste trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Virología, por su amistad y apoyo brindado durante el desarrollo de éste trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1.	Introducción	
1.1	El shock endotóxico.....	1
1.2	Lipopolisacáridos.....	5
1.3	Receptores de lipopolisacáridos.....	9
1.4	Vías de transmisión de señales asociadas a lipopolisacáridos.....	11
1.5	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).....	14
1.6	EL papel de las citocinas en la patogenia de el shock endotóxico.....	16
1.7	Interleucina-1 (IL-1)	17
1.8	Interleucina-6 (IL-6).....	20
1.9	Factor necrótico tumoral (TNF).....	24
1.10	Interleucina-8 (IL-8).....	29
1.11	Interleucina-12 (IL-12).....	31
1.12	Interleucina-10 (IL-10).....	34
1.13	Oxido nítrico.....	36
1.14	Definición de el factor de transferencia.....	41
1.15	Obtención de el factor de transferencia.....	42
1.16	Caracterización de el factor de transferencia.....	42
1.17	Hipótesis.....	52
1.18	Objetivos.....	52
2.	Materiales y Métodos	
2.1	Animales.....	54
2.2	Elaboración de el extracto dializable de leucocitos bovino(EDLb).....	54
2.3	Lipopolisacáridos.....	55
2.4	Tratamientos.....	55
2.4.1	Administración de diversas dosis de LPS en ratones <i>in vivo</i> para la determinación de la dosis letal.....	55

Capítulo	Página
2.4.2	Administración de el EDLb en el shock endotóxico murino inducido por LPS.....56
2.4.3	Obtención, tratamiento y cultivo de macrófagos peritoneales murinos.....57
2.4.4	Determinación de TNF- α , IL-6 e IL-10 en macrófagos peritoneales murinos mediante ELISA.....58
2.4.5	Determinación de la producción de citocinas pro-inflamatorias, TNF- α , IL-6 e IL-10 en sangre periférica humana <i>in vitro</i>59
2.4.6	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (CMNPH) para la determinación de la expresión del RNAm de citocinas pro-inflamatorias mediante RT-PCR.....59
2.4.7	Determinación de la Viabilidad Celular.....60
2.5	ELISA.....61
2.6	RT-PCR.....65
2.7	Determinación de óxido nítrico basado en la reacción de Greiss.....72
3.	Resultados
3.1	Efecto dosis-respuesta de la administración de el LPS.....73
3.2	Efecto protector de el EDLb en el shock endotóxico murino inducido por LPS.....73
3.3	Efecto de el EDLb en la expresión de IL-10 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>74
3.4	Efecto de el EDLb sobre la expresión de IL-6 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>75
3.5	Efecto de el EDLb en la expresión de TNF- α en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>75
3.6	Efecto de el EDLb en la expresión de IL-1 β en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>76
3.7	Efecto de el EDLb en la expresión de IL-12 p40 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>77
3.8	Efecto de el EDLb en la producción de IL-10, TNF- α , e IL-6 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>77

Capítulo	Página
3.9	Efecto de el LPS en la producción de nitritos en macrófagos peritoneales murinos <i>in vitro</i>79
3.10	Efecto de el EDLb en la producción de nitritos en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS <i>in vitro</i>79
3.11	EDLb modula la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS <i>in vitro</i>79
3.12	Determinación de la viabilidad de macrófagos peritoneales murinos.....80
3.13	Efecto de el EDLb en la expresión del RNAm de citocinas pro-inflamatorias en sangre total humana estimulada con LPS.....80
3.14	Efecto de el EDLb en la producción de IL-10, TNF- α e IL-6 en sangre total estimulada con LPS.....81
4.	Discusión.....103
5.	Conclusiones.....117
	Bibliografía.....118

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Desarrollo de sepsis.....	4
2.	Estructura de la superficie de una bacteria Gram-negativa.....	5
3.	Estructura de la superficie de una bacteria Gram-positiva.....	6
4.	Arquitectura general de el lipopolisacárido.....	8
5.	Vías de transmisión de señales.....	14
6.	Análisis cualitativo de el dializado de leucocitos conteniendo factores supresores y factores inductores de varias especificidades, aislamiento y purificación por diálisis diferencial e inmunoabsorción de afinidad.....	49
7.	Dilución de el buffer diluyente estándar.....	64
8.	Efecto de el LPS en la mortalidad.....	82
9.	Curva de mortalidad y morbilidad inducida por la dosis letal de LPS (17mg/kg).....	84
10.	Expresión de los genes de citocinas pro-inflamatorias en el shock endotóxico inducido por el LPS.....	84
11.	Expresión de los genes de citocinas en ratones tratados con EDLb.....	85

Figura	Página
12. Expresión de los genes de las citocinas en el shock endotóxico inducido por el LPS en ratones tratados con el EDLb.....	86
13. Efecto de el EDLb en la producción de el TNF- α en el shock endotóxico murino inducido por el LPS.....	87
14. Efecto de el EDLb en la producción de IL-6 en el shock endotóxico murino inducido por el LPS.....	88
15. Efecto de el EDLb en la producción de IL-10 en el shock endotóxico murino inducido por el LPS.....	89
16. Efecto de el EDLb en la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales murinos.....	91
17. Efecto de el LPS sobre la viabilidad celular en macrófagos peritoneales murinos.	92
18. Efecto de el EDLb en la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS.....	93
19. Efecto de el EDLb sobre la viabilidad celular en macrófagos peritoneales murinos.....	94
20. El EDLb modula la producción de el TNF- α , en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS <i>in vitro</i>	95
21. El EDLb modula la producción de IL-10 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS <i>in vitro</i>	96

Figura		Página
22.	El EDLb modula la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS.....	97
23.	El EDLb modula la expresión de el RNAm de las citocinas pro-inflamatorias en células de sangre humana estimuladas con LPS.....	98
24.	Niveles de expresión de los genes de citocinas en células de sangre humana estimulada con LPS y tratada con EDLb.....	99
25.	El EDLb modula la producción de IL-10 en células de sangre humana estimulada con LPS.....	100
26.	El EDLb modula la producción de el TNF- α en células de sangre humana estimulada con LPS.....	101
27.	El EDLb modula la producción de IL-6 en células de sangre humana estimulada con LPS.....	102

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales componentes de microorganismos identificados como agentes involucrados en la inflamación.....	9
2	Moléculas de monocitos asociadas con la unión de LPS.....	10
3	Actividades del FT independientes de antígeno.....	45
4	Actividades del FT dependientes de antígenos.....	46
5	Efecto enzimático en la actividad de el factor de transferencia.....	46
6	Propiedades inductoras-cooperadoras de el FT.....	50
7	Propiedades supresoras de el FT.....	50
8	Efecto de el EDLb en la sobrevivencia de el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS.....	90

ABREVIATURAS

LPS	Lipopolisacáridos
SRIS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SDOM	Síndrome de disfunción múltiple de órganos
FOM	Falla de múltiple de órganos
TNF- α	Factor necrótico tumoral alfa
IL-1	Interleucina-1
IL-1 α	Interleucina-1 alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Receptor de la Interleucina-1 recombinante humana
IL-6	Interleucina- 6
IL-8	Interleucina- 8
IL-12	Interleucina- 12
IL-10	Interleucina- 10
NO	Oxido nítrico
LBP	Proteína de unión al lipopolisacárido
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
CD14 m	CD-14 de membrana
CD-14 s	CD-14 soluble
TLR-4	Receptor- 4 semejante a Toll
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
NF- κ B	Factor nuclear kappa-B
ERK	Kinasas reguladas por señales extracelulares
JNK	Quinasas N-terminal c-Jun

SAPK	Proteínas quinasas activadas por estrés
MAPKAPK1	Proteínas quinasas 1 activadas por MAPK
MAPKAPK3	Proteínas quinasas 3 activadas por MAPK
MNK1/2	Quinasas 1 y 2 interactuando con MAPK
ATF-2	Factor activador de la transcripción-2
TCF	Factor del complejo ternario
PKC	Proteínas quinasas C
RNAm	Acido ribunucleico mensajero
NOS	Sintetasa del óxido nítrico
iNOS	Sintetasa del óxido nítrico inducible
eNOS	Síntetasa del óxido nítrico endotelial
cNOS	Síntetasa del óxido nítrico constitutivo
COX-2	Ciclooxigenasa-2
INF- β 2	Interferón-beta 2
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
OSM	Oncostatina M
CNTF	Factor Ciliar Neurotrópico
CT-1	Cardiotropina-1
IL-11	Interleucina- 11
IL-6Rs	Receptor de interleucina- 6 soluble
SP	Sustancia P
GM-CSF	Factor estimulante de colonia monocito-granulocito
NK	Células asesinas naturales
T-BP-1	Proteínas de unión al TNF-1
T-BP-2	Proteínas de unión al TNF-2
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
CTAP-3	Proteína-3 activadora del tejido conectivo

CLMF	Factor de maduración de linfocitos Citotóxicos
NKSF	Factor estimulante de células asesinas Naturales
TcMF	Factor de maduración de linfocitos T citotóxicos
TSF	Factor estimulante de células T
IL-12p40	Subunidad p40 de la interleucina-12
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
NADPH	Difosfonucleótido de nicotinamida
FAD	Flavio-adenina-mononucleótido
NOHA	N-hidroxi-L-Arginina
DNA	Acido desoxiribunocleico
FT	Factor de transferencia
EDL	Extracto dializable de leucocitos
PPD	Derivados de proteína purificadas de tuberculina
VIS	Virus de inmunodeficiencia del simio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Ca ²⁺⁺	Calcio
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa- Transcriptasa Reversa
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorbencia Ligado a Enzima
BDE	Buffer diluyente estandar
SFB	Suero fetal bovino
i.m.	Intramuscular
g	gramos

Da	Daltons
kg	kilogramos
mg	miligramos
ml	mililitro
μg	microgramos
μl	microlitros
M	molar
nm	nanómetro
nM	nanoMolar
O ₂	oxígeno
CO ₂	Dióxido de carbono
pmoles	picomoles
%	por ciento
rpm	revoluciones por minuto
°C	Grados centígrados
CMNPH	Células mononucleares de sangre periférica

RESUMEN

El shock endotóxico es el resultado de la presencia de toxinas (LPS) en el torrente sanguíneo que inducen la activación descontrolada del sistema inmunológico contribuyendo a procesos patológicos que culminan en fallo múltiple de órganos, shock y muerte. El extracto dializable de leucocitos bovino (EDLb), es un dializado de una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular liberadas de la ruptura de leucocitos de la sangre o de el tejido linfoide, con efectividad clínica en un amplio espectro de enfermedades. En este estudio determinamos si el EDLb mejora la sobrevivencia y modula la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias en el shock endotóxico murino inducido por LPS; en donde, ratones Balb/C se trataron con EDLb (1U) después de haber sido estimulados con LPS (17 mg/kg). El EDLb incrementó la sobrevivencia en un 90%, suprimió la expresión de el RNAm de IL-10 e IL-6, disminuyó la expresión de el RNAm de IL-1 β , TNF- α , e IL-12p40; además disminuyó la producción de citocinas de IL-10, TNF- α , e IL-6 en el shock endotóxico murino inducido por LPS. Los macrófagos de ratón y los monocitos de humano producen muchos de los mediadores encontrados en los pacientes con sepsis. Terapias enfocadas hacia esos mediadores, específicamente factor necrótico tumoral-alpha (TNF- α) y óxido nítrico (NO) se han continuado como un medio para reducir la mortalidad en

pacientes con sepsis. Para determinar si el EDLb modula la producción de óxido nítrico y citocinas, macrófagos peritoneales murinos se trataron con EDLb (0.5 y 0.05 U/ml) antes y después de estimularlos con LPS (20 μ g/ml). El EDLb disminuyó significativamente la producción del óxido nítrico y disminuyó la producción de TNF- α e IL-6 pero incrementó la producción de IL-10 en los macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Para determinar si el EDLb modula la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias en sangre total humana estimulada con LPS, la sangre total fue tratada con LPS (50 ng) + EDLb (1U). El EDLb disminuyó la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10; disminuyó la expresión de el RNAm de TNF- α , IL-1 β e IL-6; suprimió la expresión de el RNAm de la IL-10 e IL-12p40, pero sin modular la expresión de el RNAm de la IL-8 en sangre total humana estimulada con LPS. Nuestros resultados claramente indican que el EDLb incrementa la sobrevivencia en el shock endotóxico murino, modulando la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias, y disminuye la producción de el óxido nítrico *in vitro*; sugiriendo su potencial terapéutico en el shock endotóxico.

ABSTRACT

The pathophysiology of septic shock is characterized by the induction of multiple pro-inflammatory genes and their products which initiates the inflammatory process. Septic shock is a serious condition with a high mortality. The bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE), is a dialyzate of a heterogeneous mixture of low-molecular-weight substances released from desintegrated leukocytes of the blood or tissue lymphoid obtained from homogenized spleen bovine, and provide clinical effectiveness in a broad spectrum diseases. To determine whether bDLE improves survival and modulates the expression of pro-inflammatory cytokines genes in LPS-induced endotoxic shock murine, Balb/C mice were treated with bDLE (1U) after pretreatment with LPS (17mg/kg). The bDLE improved survival (90%), suppressed IL-10 and IL-6; and decreased IL-1 β , TNF- α , and IL-12p40 mRNA expression; and also decreased the cytokine production of TNF- α , IL-10, and IL-6 in LPS-induced endotoxic shock murine. Human monocytes or mouse macrophages produce many of the mediators found in septic patients. Targeting of these mediators, specifically Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and Nitric Oxide (NO) has been pursued as a means of reducing mortality in sepsis. To determine whether bDLE modulates the NO and the cytokine pro-

inflammatory production, peritoneal macrophages murine were treated with bDLE (0.5 and 0.05 U/ml) before and after LPS (20 μ g/ml) stimulation. The bDLE significantly decreased the NO production and decreased the TNF- α and IL-6 but increased the IL-10 production in LPS-stimulated peritoneal macrophages murine. To determine whether bDLE modulates the expression of pro-inflammatory cytokines genes in LPS-stimulated human blood cells, whole blood cells were treated with LPS (50 ng) + bDLE (1U). The bDLE decreased the cytokine production of TNF- α , IL-6, and IL-10; and decreased the TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA expression, suppressed the IL-10, and IL-12p40 mRNA expression, but it did not modulate the IL-8 mRNA expression in LPS-stimulated human blood cells. Our results clearly indicate that bDLE leads to increased survival in LPS-induced endotoxic shock murine, modulating the expression of pro-inflammatory cytokine genes. This may offer a therapeutic potential in clinical septic shock.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 El Shock endotóxico

La inflamación es el resultado de la activación de los componentes celulares (neutrófilos, macrófagos, células T y células NK) y humorales (complemento, proteínas de coagulación e inmunoglobulinas). La cual conduce a la activación de un sistema de amplificación que inicia la producción de una diversidad de mediadores celulares especializados (citocinas, quimioquinas, metabolitos de el oxigeno intermediario). Estos mediadores alteran el flujo sanguíneo y permeabilidad vascular e incrementan la adherencia de fagocitos en circulación a células endoteliales, promoviendo la migración de leucocitos dentro de el tejido para eliminar la infección. En muchos casos este proceso conduce a la eliminación del microorganismo, sin producir signos de inflamación clínicos aparentes. En otras condiciones el proceso inflamatorio puede contribuir a procesos patológicos que pueden culminar en fallo múltiple de órganos, shock y muerte. Los mismos mediadores son producidos en infecciones severas y moderadas pero la cantidad de mediadores producidos y su diseminación dentro de la circulación discrimina entre estos dos tipos de infecciones (52).

A pesar de los progresos en la terapia de cuidados intensivos, y el empleo de nuevos antibióticos, el proceso de sepsis es todavía una de las mayores causas de muerte (30), caracterizada por desarreglos metabólicos en las funciones de varios órganos, resultado de la activación del sistema inflamatorio por los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram-negativas (100). En los Estados Unidos de Norte América, el shock endotóxico es la 13ª causa general de muerte y la primera en las unidades de cuidados intensivos.

Se ha estimado que cada año ocurren de 300,000 a 500,000 episodios sépticos con una tasa de mortalidad del 20-40% (100). En 1991, se sugirió cambiar el término "síndrome séptico" por el de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), esta definición parece ser más precisa y es empleada para definir el estado de los pacientes que exhiben una respuesta sistémica a episodios inflamatorios (49).

La hipotensión refractaria (shock séptico) es la principal causa de muerte dentro de los pocos días del inicio de sepsis. Posteriormente, los síndromes de disfunción y falla múltiple de órganos (SDOM/ FOM), inician el problema clínico primario y son la principal causa de mortalidad. Una vez que un paciente desarrolla shock séptico o SDOM/ FOM la tasa de mortalidad incrementa a un 60-70% (59). El SRIS (**Figura 1**) es inducido por la presencia de microorganismos en el torrente sanguíneo o por la liberación

de productos tóxicos a partir de una infección local. Pacientes sin una infección aparente, tales como pacientes con trauma severo, quemaduras, pancreatitis o sometidos a bypass cardiopulmonar pueden desarrollar signos de sepsis (49).

Existen tres factores implicados en el desarrollo del shock séptico: el estado inmunológico del paciente, alta carga bacteriana en el huésped, y una opción incorrecta de la dosis y administración de un agente antimicrobial. En la actualidad el tratamiento de infecciones bacterianas serias involucra la eliminación de dos estados letales, bacteremia y endotoxemia, pero a pesar de la alta efectividad *in vitro* de varios antibióticos bactericidas en contra de la invasión de Gram-negativos y Gram-positivos, las tasas de mortalidad y morbilidad debido a estas infecciones permanecen altas. Esto puede ser en respuesta a varios factores, incluyendo la habilidad de los antibióticos para causar la liberación de endotoxinas bioreactivas libres dentro de la circulación durante el desarrollo bacteriano normal o después de la lisis bacteriana (107).

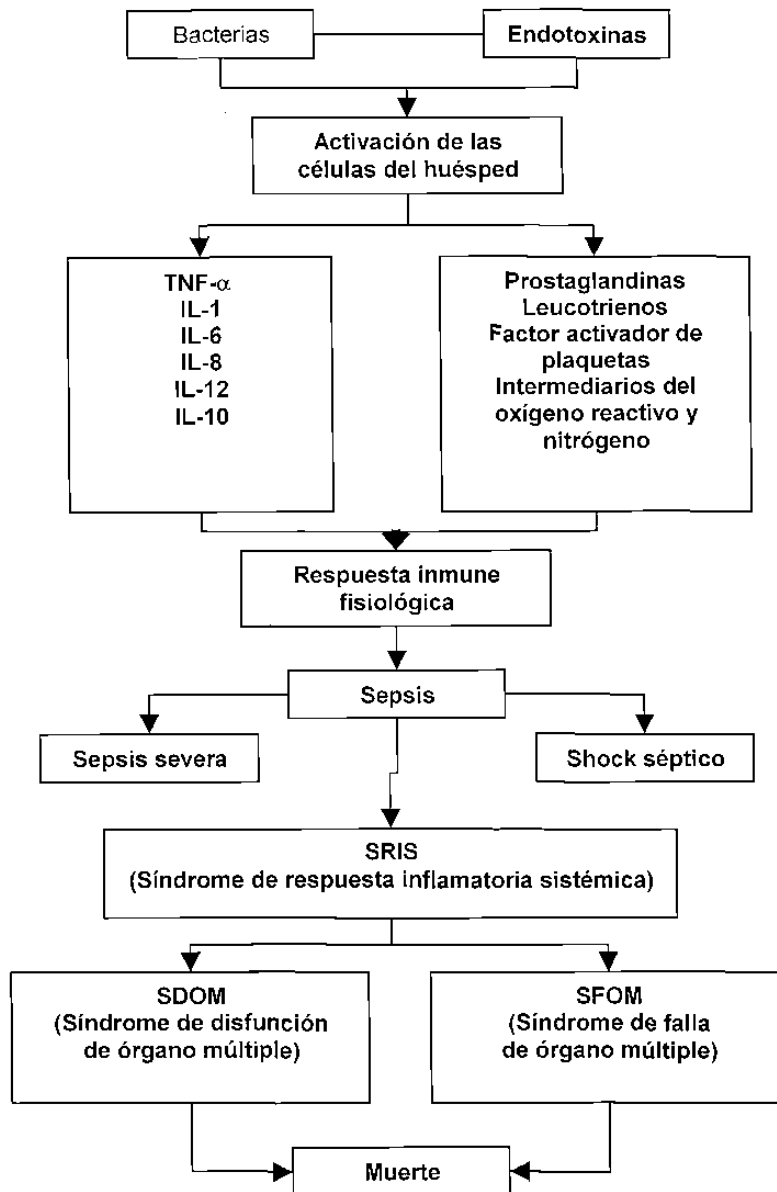


Figura 1.- Desarrollo de Sepsis (6, 107).

1.2 Lipopolisacáridos

En animales como en humanos, muchos síntomas característicos del desarrollo de sepsis por Gram-negativos son debidas a endotoxemias causadas por endotoxinas (125). El LPS es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Una sola bacteria de *Escherichia coli* contiene cerca de 2 millones de moléculas de LPS por célula, la bacteria libera la endotoxina dentro de su medio ambiente en pequeñas cantidades cuando se encuentran activamente en crecimiento y en grandes cantidades cuando mueren (Figura 2).

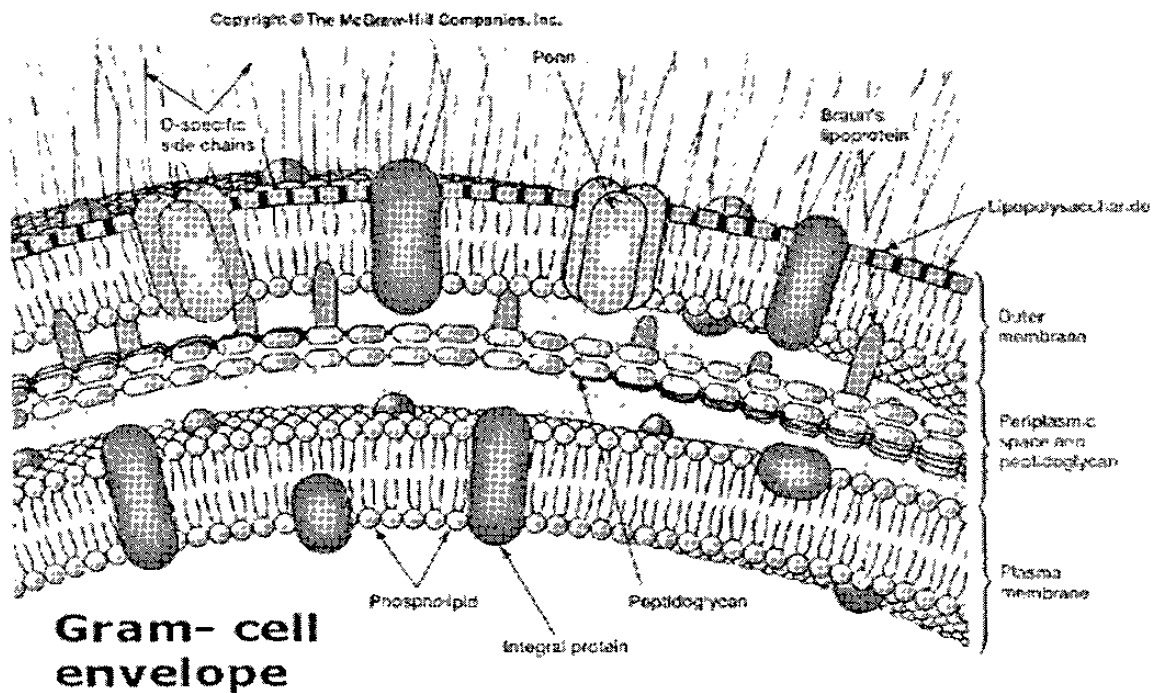


Figura 2.- Estructura de la superficie de una bacteria Gram-negativa.

La patología de sepsis no se limita a endotoxinas derivadas de bacterias Gram-negativas, también participan productos microbianos como lipo-oligosacáridos (bacterias Gram-negativas), ácido lipoteicoico y ácido teicoico (bacterias Gram-positivas). Los cuales son los constituyentes pro-inflamatorios más potentes de las membranas y paredes celulares de las bacterias (52) (Figura 3).

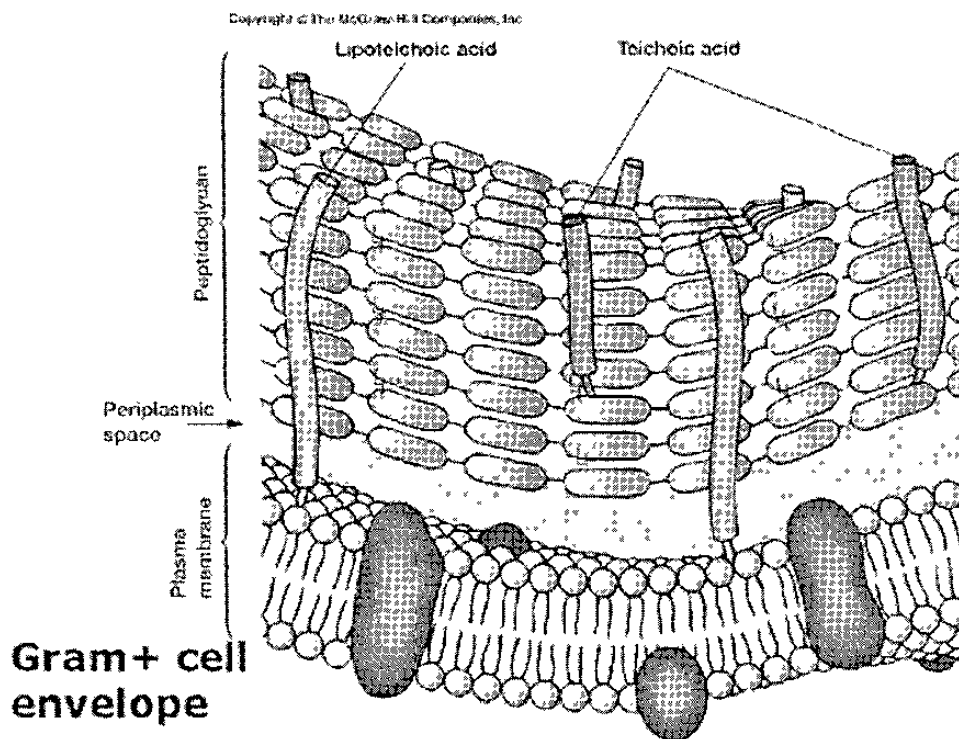
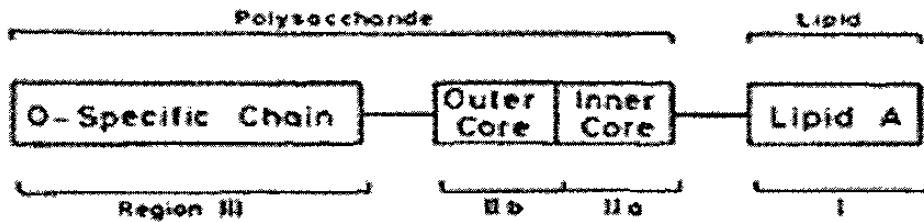


Figura 3.- Estructura de la superficie de la célula de una bacteria Gram-positiva.

El LPS consiste de un grupo lípidico hidrofóbico (lípidio A) covalentemente unido a un gran complejo del tallo de polisacáridos (**Figura 2**). El lípidio A usualmente consta de dos azúcares fosforilados (glucosaminas) cada una esta acoplada con varios ácidos grasos. El lípidio A, ancla el LPS a la membrana bacteriana y es responsable de muchos de sus efectos biológicos. El largo del tallo del polisacárido es hidrofílico y consiste de dos dominios: Una parte central conservada la cual consiste de un pequeño grupo de azúcares, y una región mucho más grande y más variable llamada región de el polisacárido específica-O (antígeno-O). La parte central contiene heptosas (azúcares de siete carbonos) más dos unidades de un azúcar de ocho carbonos (3-deoxy-D-manno-ácido octulosónico), único de las bacterias gram-negativas que unen el lípidio A al antígeno O. Esta región varía dentro de especies y entre especies, consistiendo de 20-40 unidades de repetición de tres a ocho azúcares cada una. El antígeno-O, es responsable de la respuesta antigénica específica en humanos y provee inmunidad a infecciones ocasionadas por bacterias Gram-negativas (Figura 4).



(115)

Figura 4.- Arquitectura general del lipopolisacárido.

El LPS muestra una variedad de actividades que están asociadas con la porción de el lípido A, el cual es reconocido por el sistema inmune y está relacionado a la patogénesis de sepsis por bacterias Gram-negativas y shock séptico. Muchos de los fenómenos patofisiológicos sistémicos y locales producidos por el LPS en el huésped expuesto es el resultado de la habilidad de el LPS para activar las células inflamatorias de el huésped (células de la línea mieloide: monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares) (52).

Tabla 1.- Principales componentes de microorganismos identificados como agentes involucrados en la inflamación .

Microorganismos	Componentes inflamatorios
Bacteria gram-negativa	Lipopolisacárido Peptidoglicanos Porinas Lipoproteínas, Lipopéptidos Proteínas asociadas a Lípido-A- Pili
Bacteria Gram-positiva	Exotoxinas Peptidoglicanos Ácido lipoteicoico y ácido teicoico
Micobacterias	Lipoarabinomannan, lipomannan Micolymarabinogalactan-peptidoglicano
Hongo	Manoproteínas β -glucano

(52)

1.3 Receptores de Lipopolisacáridos

Se ha enfocado mucha atención en los receptores de el LPS (55). Las células del sistema inmune responden al LPS a través de una vía que involucra una proteína de el plasma, llamada proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) y el receptor de CD14, que puede ser glicosilfosfatidilinositol (GPI) de membrana (CD14 m) o soluble (CD14 s) (126). La unión de el LPS al CD14m en células mieloides conduce a la activación celular y a la producción de varias moléculas pro-inflamatorias (34), mientras que las células que no expresan CD14 (células del músculo liso, endoteliales y epiteliales) pueden ser activadas por el LPS vía

interacción de el LPS con la forma soluble de el CD14 presente en el plasma (29). Un gran número de productos de origen bacteriano también estimulan la activación de la inflamación en el huésped (Tabla 1). El LPS ejerce su efecto en el huésped al activar a células sensibles al LPS, tales como monocitos y células endoteliales, para que estas liberen varias citocinas y radicales libres. Se han identificado varias moléculas de señalización y reconocimiento de el LPS, incluyendo CD11b/CD18, receptor de la lipoproteína de baja densidad, además de las mencionadas (Tabla 2).

Tabla 2.- Moléculas de monocitos asociadas con la unión al LPS.

Moléculas	Unión al LPS	Consumo del LPS	Activación inducida por el LPS
CD-14	Si	Si	Si (bajas dosis de LPS)
CD-18	Si	Si	Si (altas dosis de LPS)
Proteína de 216 kDa	Si	?	?
Receptor Scavenger	Si	Si	No
Proteínas de 18, 25, 38, 40 y 80 kDa	Si	?	?
Proteína de 80 kDa	Si	?	?

(52)

El complejo LPS-CD14s puede unirse a receptores de células que no expresan CD14, para activarlas. No todas las células epiteliales emplean una vía mediada por CD14s y muchas células epiteliales no responden al LPS, aún en presencia de CD14s (52, 82).

Además, altas concentraciones de el LPS pueden estimular a las células de una manera independiente de el CD14, sugiriendo la existencia de una segunda molécula que reconoce al LPS, incluyendo al CD11/CD18 y un receptor TLR-4 (Receptor-4 semejante a Toll) (59).

1.4 Vías de transmisión de señales asociadas a lipopolisacáridos

Un número de cascadas de fosforilación incluyendo la vía de el MAPK (Proteínas quinasas activadas por mitógenos) y la vía de activación de el NF- κ B (Factor nuclear kappa-B) son iniciadas por exposición de las células al LPS (**Figura 5**). Estas cascadas actúan a nivel de transcripción y traducción para regular la producción de citocinas. Las MAPK son una familia de proteínas involucradas en la señalización intracelular. Las MAPK de mamíferos pueden ser divididas en cuatro grupos basados en su estructura y función: ERK (Kinasas reguladas por señales extracelulares), la JNK o SAPK (Quinasas N-terminal c-Jun o Proteínas quinasas activadas por estrés), ERK 5 o BMK y el grupo p38. Una variedad de estímulos producen respuesta celular vía activación de las cascadas de las MAPK, se

ha encontrado que tres de las vías MAPK (ERK, JNK y p38) son activadas por el LPS en macrófagos. Varias proteínas han sido identificadas como sustrato de el ERK, incluyendo los factores de transcripción; ELK-1 y c-Myc y varias proteínas quinasas; como MAPKAPK1, MAPKAPK3 (Proteínas quinasas 1 y 3 activadas por MAPK) así como MNK1/2 (Quinasas 1 y 2 interactuando con MAPK), la fosforilación de ELK-1 y c-Myc pueden regular la actividad de transcripción de estos factores de transcripción. Existen datos que indican que el ERKs participa en la vía de señalización, la cual conduce a la síntesis de citocinas después del tratamiento con LPS. La estimulación con el LPS conduce a la activación de múltiples vías de señalización, incluyendo JNK y las quinasas MAP p38.

Las JNK1 y JNK2 son activadas en macrófagos tratados con LPS, como su nombre lo indica, las proteínas JNK están asociadas con la fosforilación de c-Jun. Otros factores de transcripción, incluyendo ATF-2 (Factor activador de la transcripción-2) y TCF (Factor del complejo ternario) son blancos río abajo para JNK.

La vía de p38 juega un papel crucial en la expresión de citocinas, sin embargo, el mecanismo preciso por el cual p38 regula la expresión de el gene de las citocinas no ha sido aclarado.

Las PKC se refieren a una familia de quinasas dependientes de fosfolípidos y calcio que catalizan la fosforilación de residuos de serina y

treonina en proteínas. En ratas el empleo de inhibidores de PKC, disminuyen los niveles de IL-6 y atenúan la fiebre inducida por el LPS.

Experimentos *in vitro* han demostrado que la secreción de TNF- α e IL-1 β y la acumulación de el RNAm (RNA mensajero) de estas citocinas en monocitos después de el tratamiento con LPS es dependiente de la actividad de PKC. La activación de PKC inducida por LPS es independiente de calcio o diacilglicerol (34, 80).

El NF- κ B es activado en respuesta a varios estímulos incluyendo LPS y TNF- α . Después de el estímulo con LPS el NF- κ B es activado en todos los tejidos de el organismo. La inhibición selectiva de el NF- κ B *in vivo*, ha mostrado reducir la síntesis de óxido nítrico inducible logrando prevenir la hipotensión sistémica asociada con shock séptico. Sin embargo, todos los genes centrales involucrados en la patogénesis de el shock séptico contienen elementos promotores para NF- κ B tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Interleucina-6), IL-8 (Interleucina-8), sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), que regulan la síntesis de prostaglandinas de el ácido araquídico. Los macrófagos de ratones C3H/HeJ, no producen TNF- α , pero activan los niveles normales de NF- κ B en respuesta a LPS, indicando que los efectos celulares mediados por LPS no pueden ser solamente atribuidos al NF- κ B (59).

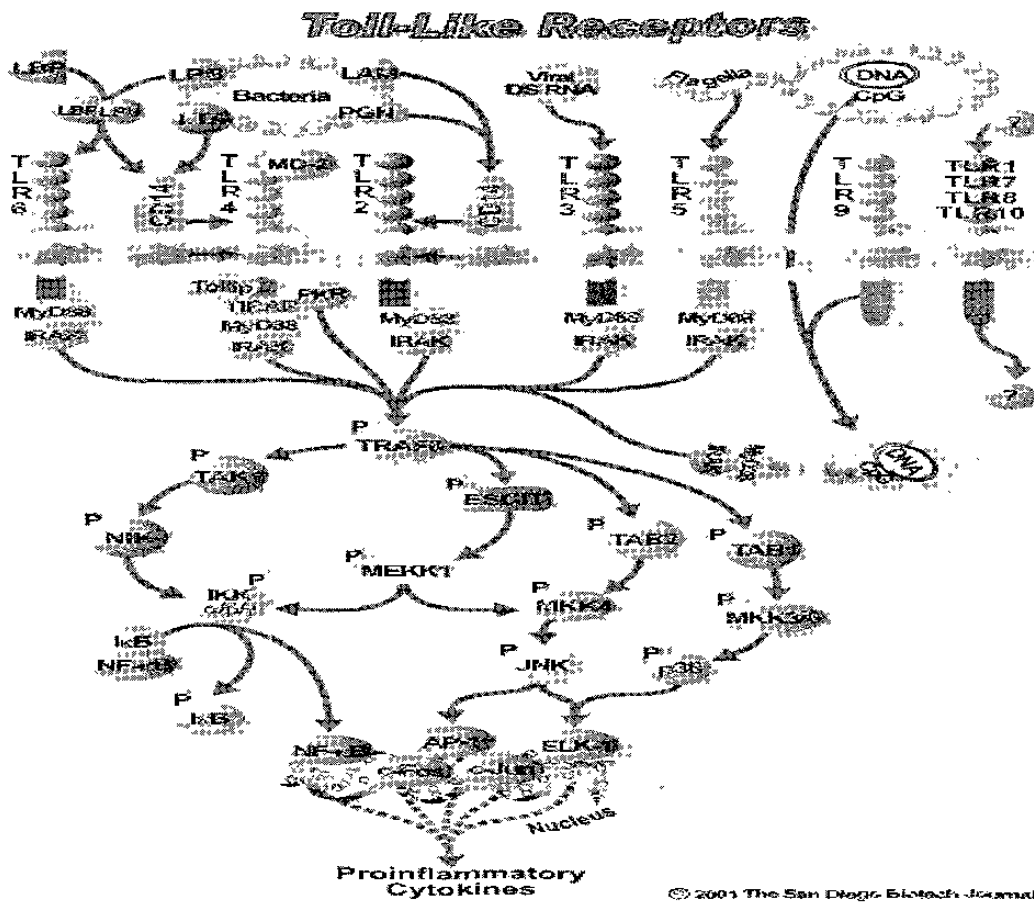


Figura 5.- Vías de transmisión de señales

1.5 Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

El SRIS, secundario a sepsis se caracteriza por la activación de el sistema inmunológico y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y quimiotácticas, factor tisular, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, enzimas inflamatorias y receptores celulares que tienen como finalidad el control de el proceso inflamatorio y la reparación tisular, de no

autorregularse este proceso causa un desequilibrio entre los factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios y la muerte del enfermo por disfunción de órgano múltiple. La inducción de genes por diferentes factores de transcripción juega un papel fundamental en la expresión, intensidad y amplificación de la SRIS, debido a que estos factores incrementan la síntesis y expresión de el RNAm de los diferentes mediadores. De los factores de transcripción, el NF- κ B es el que más se ha estudiado como mediador de la respuesta inmune e inflamación en la sepsis, SRIS y shock. Este se identificó por primera vez como regulador de el gen de la cadena ligera kappa en linfocitos B y posteriormente en células endoteliales, macrófagos, hepatocitos, leucocitos y células epiteliales que son fundamentales como activadores de el SRIS ante el estímulo infeccioso. El NF- κ B es un heterodímero citosólico, que consta de dos subunidades proteicas denominadas p65 y p50, también se han descrito otras como son Rel, RelB, vRel y p52. Habitualmente se encuentra inactivado por su inhibidor específico que incluye al complejo proteico I κ B que esta constituido por las proteínas I κ B alfa, I κ B beta, I κ B gamma, p105 y bcl3.

La activación de el NF- κ B en la sepsis es mediado por la acción de citocinas pro-inflamatorias, radicales libres, virus, proteínas bacterianas, lipopolisacáridos, lo que conduce a la activación de diferentes PKC que fosforilan y degradan al inhibidor. Una vez libre el heterodímero se transloca

al núcleo, en donde se une a la región promotora de los genes que median la síntesis de las diferentes citocinas y moléculas involucradas en la SRIS. En esta fase la síntesis *de novo* de las citocinas pro-inflamatorias condiciona una regulación positiva que mantiene la activación de PKC y de esta manera la actividad de el NF- κ B. Otros factores transcripcionales como son la proteína activadora 1, la proteína sérica 1 y el factor nuclear de IL-6 potencian la acción del NF- κ B y amplifican la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α e iNOS. El NF- κ B activado, es a su vez un factor de transcripción para la síntesis de su inhibidor el I κ B- α , evento importante de autorregulación negativa para bloquear la cascada molecular que mantiene la síntesis de mediadores en el SRIS (38).

1.6 El papel de las citocinas en la patogenia de el shock endotóxico

La generación y mantenimiento de las respuestas inmunológicas es controlada por una red de pequeñas, no estructurales, proteínas regulatorias intercelulares que median una multiplicidad de funciones biológicas no inmunológicas e inmunológicas, son llamadas citocinas, que son inducidas por estímulos específicos y son responsables de la generación, estimulación y diferenciación de múltiples tipos celulares así como de el control de la producción de otras citocinas que pueden aumentar o inhibir la síntesis de productos de proteínas. Resultando en una compleja

red regulatoria que participa exitosamente en la erradicación de microorganismos invasores. La capacidad o incapacidad para generar ciertos patrones de citocinas en respuesta a una infección a menudo determina el curso clínico de una infección y puede afectar el resultado. En ciertas circunstancias el desbalance o una masiva producción de citocinas puede conducir al shock, fallo de órgano múltiple y muerte (49, 59, 107).

1.7 Interleucina-1 (IL-1)

La IL-1 tiene una amplia variedad de efectos biológicos a muy bajas concentraciones, algunas veces aún en concentraciones fentomolares. Es una molécula potente que es capaz de inducir su efecto a través de uno o dos receptores por célula. Los primeros efectos adjudicados a la IL-1 fueron la inducción de fiebre, aumento de la respuesta de linfocitos y estimulación de la respuesta de fase aguda. Anteriormente la IL-1 era conocida como factor activador de linfocitos, pirógeno endógeno, entre otros. En humanos y ratones la IL-1 presenta dos formas funcionalmente activas: IL-1 α , e IL-1 β . La IL-1 α , se encuentra predominantemente unida a membrana y la IL-1 β es secretada. La IL-1 parece funcionar como un mensajero con acción local y sistémica en los tejidos. La IL-1 es una citocina con efectos pleiotrópicos incluyendo actividad citostática y citotóxica en algunas líneas de células tumorales, activación de la función de células efectoras inmunológicas, aumento de resistencia a la infección, supresión de el rechazo de aloinjertos

de piel, protección de la radiación, aceleración de la recuperación de médula ósea después de altas dosis de quimioterapias. La IL-1 α estimula la producción de los macrófagos, granulocitos y factores estimulantes de colonias macrófago-granulocitos así como TNF- α , interferón- γ , IL-2, IL-6 e IL-8. Las propiedades inhibitorias de el crecimiento de IL-1 α han sido documentadas en melanoma, osteosarcoma y líneas celulares de carcinoma, así como estudios de xenoinjertos *in vivo* usando transplantes de líneas celulares de cáncer en ratones desnudos. Esta citocina se ha estudiado durante años debido a que juega un papel en la inflamación y patogénesis de enfermedades inflamatorias (98). En el sistema inmune la producción de IL-1 es inducida como resultado de la inflamación. La IL-1 β y el TNF- α , son prototipos de citocinas pro-inflamatorias. La IL-1 β es inducida por productos y subproductos bacterianos (LPS) y actúa directa e indirectamente (vía inducción de otras citocinas) en las células presentadoras de antígeno y linfocitos T y B (98). Los efectos de la IL-1 no son limitados a la inflamación, esta citocina ha sido asociada con formación y remodelación del hueso, secreción de insulina, regulación del apetito e inducción de fiebre. La IL-1 es expresada en muchas células, como astrocitos, fibroblastos, hepatocitos, keratinocitos, células alveolares grandes tipo II, adipocitos, células tímicas, células T y eosinófilos, células dendríticas, macrófagos, monocitos, y oligodendrocitos. El TNF- α e IL-1 son

los componentes críticos de una cascada compleja a través de los cuales los efectos letales de las endotoxinas y septicemia son mediados, la IL-1 modula muchos de los cambios asociados con la infección y sepsis incluyendo fiebre, neutrofilia, síntesis de proteína de fase aguda aumentada y daño endotelial vascular pulmonar. La IL-1 recombinante ha demostrado inducir un estado semejante al shock en conejos y un estado letal agudo con cambios patológicos similares al shock séptico en ratones. Se han diseñado estrategias para bloquear los efectos deletorios de la IL-1 empleando un antagonista del receptor de la IL-1 humana (IL-1ra) reduciendo la letalidad de el shock inducido por endotoxinas en conejos, mejorando la sobrevivencia después de la endotoxemia letal en ratones. La IL-1 y el TNF actúan sinérgicamente causando daños en tejidos y aumentando la letalidad cuando ambos son administrados *in vivo* (87).

1.8 Interleucina-6 (IL-6)

Las propiedades funcionales de la IL-6 son extremadamente variables y esto es reflejado por la terminología originalmente empleada para describir las actividades de esta citocina: Interferón- β 2 (INF- β 2), Factor estimulante de hepatocitos, Factor de diferenciación de células T citotóxicas, Factor de diferenciación de células B y Factor-2 estimulador de células B. La IL-6 es producida por una variedad de células durante la infección, trauma y desafío inmunológico, elevadas concentraciones de la IL-6 se han asociado con estados de enfermedad. La IL-6 promueve los eventos inflamatorios mediante la expansión y activación de células T, diferenciación de células B y la inducción de reactantes de fase aguda por hepatocitos. En contraste, la IL-6 también posee un papel protector durante la enfermedad impidiendo la manifestación de ciertas respuestas inflamatorias. En el shock séptico, la IL-6 suprime la acumulación aguda de neutrófilos causada por la administración intratecal de endotoxinas (57). La IL-6, IL-11, Factor Inhibitorio de Leucemia (LIF), Oncostatina M (OSM), Factor Ciliar Neurotrópico (CNTF) y Cardiotropina-1 (CT-1) están estructural y funcionalmente relacionadas. El complejo receptor para la familia de citocinas de la IL-6, comparten a gp-130 como un componente crítico para la transducción de señales. Los eventos posteriores a la estimulación de citocinas de el gp-130, dan lugar a una variedad de eventos bioquímicos, incluyendo la activación de la tirosina quinasa citoplasmática que esta

asociada con la gp-130 y la modificación de los factores de transcripción (128).

El complejo receptor que media las actividades biológicas de la IL-6 consiste de dos distintas glicoproteínas unidas a membrana, una subunidad análoga de el receptor de 80 kDa (IL-6R, CD126) y un elemento transductor de señales de 130 kDa (gp 130, CD130). La expresión de la gp-130 transmembrana se encuentra en casi todos los órganos, incluyendo corazón, riñón, bazo, hígado, pulmón, placenta y cerebro. En contraste la distribución celular de el análogo de IL-6 es limitado y su expresión es confinado a hepatocitos y subpoblaciones de leucocitos (monocitos, neutrofilos, células T, y células B). Aunque gp-130 fue inicialmente identificado como el componente transductor de señales de el receptor de IL-6, los receptores análogos para interleucina-11 (IL-11), oncostatina-M (OSM), Factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofin-1 (CT-1), Factor inhibitorio de leucemia (LIF), factor-3 estimulante de célula B/neurotrofina-1, transmiten activación de señales vía gp130.

En adición al receptor de unión a membrana, una forma soluble de IL6R (IL-6Rs) ha sido purificada de suero humano y orina. Este receptor soluble une a la IL-6 con una afinidad similar a la de su receptor semejante y prolonga su vida media en plasma. Concentraciones de IL-6 se han encontrado en el suero y líquidos sinoviales de pacientes con artritis

reumatoide. La administración de anticuerpos monoclonales anti-IL-6 a pacientes artríticos han demostrado ser clínicamente benéficos.

Estos estudios parecen contradecir las propiedades anti-inflamatorias asignadas a la IL-6 y acentúan la necesidad para comprender la regulación de eventos mediados por la IL-6 y el efecto del IL-6Rs en lesiones artríticas. La IL-6 actúa como citocina pro y anti-inflamatoria, en ratones que no producen la IL-6 la ausencia de esta citocina se ha correlacionado con un incremento en la expresión de el TNF- α , INF- γ , GM-CSF, y MIP-2 (homóloga a IL-8 murina) y por una elevada neutrofilia. La IL-6 tiene la capacidad de limitar el reclutamiento de neutrófilos y suprimir la actividad de mediadores pro-inflamatorios (57). La IL-6 posee un papel anti-inflamatorio tanto en respuestas sistémicas y locales, interviniendo en el control de el nivel de citocinas pro-inflamatorias pero no anti-inflamatorias, además las actividades anti-inflamatorias de la IL-6 no pueden ser compensadas por la IL-10 u otra familia de la IL-6 (141). El efecto patológico de esta citocina ha sido probado en varios modelos de artritis *in vivo* e inflamación intestinal crónica, esto puede parecer que la asignación de propiedades inflamatorias a la IL-6 depende de las condiciones clínicas en la cual esta participe (57). Las células que expresan IL-6 incluyen células T CD8⁺, fibroblastos, sinoviocitos, adipocitos, osteoblastos, megacariocitos, células endoteliales (bajo la influencia de endotelinas), neuronas de la corteza cerebral, células cromafinas de la médula adrenal, células del pigmento de la retina, células

cebadas, keratinocitos, células Langerhans, astrocitos fetales y adultos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, células epiteliales colónicas, células beta de el islote pancreático. La IL-6 puede ser encontrada en sangre de individuos normales en el rango de 1 pg/ml y grandes elevaciones de esta citocina después de la cirugía (30-430 pg/ml). El papel de la IL-6 circulante en tolerancia a endotoxina ha sido muy controversial y su liberación de órganos en la exposición de el LPS no ha sido estudiada en detalle. Se ha reportado una reducida expresión de la IL-6 después de la inyección intravenosa de el LPS en el hígado y pulmón de ratas tolerantes *in vivo*, sugiriendo un patrón de respuesta inmune específica de órgano y puede en parte explicar los datos controversiales observados en circulación. El papel de la IL-6 en la endotoxemia es todavía incierto. En sepsis clínica, así como en el shock endotóxico experimental, altos niveles circulantes se correlacionan con letalidad o un pobre pronóstico. Sin embargo, la IL-6 no es tóxica y puede ser aplicada a altas dosis sin los efectos observados durante la endotoxemia, además posee un alto potencial anti-inflamatorio.

La IL-6 es capaz de inducir el receptor antagonista de IL-1, y receptores de TNF solubles p55. Experimentos con ratones deficientes de IL-6 demuestran una alta respuesta a la inflamación sistémica y local después de el desafío con endotoxinas, sugiriendo a la IL-6 como un mediador anti-inflamatorio (42). Se ha demostrado que la IL-6 más que jugar un papel letal protege a los ratones en contra de la muerte inducida por el

LPS en un modelo de el shock séptico. Los anticuerpos a IL-6 no protegen de la muerte inducida por el LPS, más sin embargo, el pre-tratamiento con anticuerpos anti-TNF protegen al ratón en contra de la muerte en una manera dependiente de dosis. La mortalidad aumento cuando se administro un pre-tratamiento con anticuerpos a la IL-6 y la mortalidad se disminuyó por el pretratamiento de la IL-6 recombinante y bajas dosis de anticuerpos anti-TNF; en ausencia de bajas dosis de anticuerpos a TNF, la IL-6 sola no confiere protección. Estos datos demuestran actividades antagonísticas *in vivo* de TNF- α e IL-6 y demuestran que la IL-6 puede jugar un papel de protección en contra de la muerte inducida por el shock séptico (13,128).

1.9 Factor Necrótico Tumoral (TNF)

El TNF esta presente en dos formas α y β , con un 50% de homología.

El TNF- β , (linfotoxina) es producido por linfocitos activados.

El TNF- α (caquectina) se expresa en una variedad de células como una molécula de 26 kDa que puede ser procesada para dar una forma soluble de 17 kDa, que modula un rango de respuestas inmunes celulares e inflamatorias (2). El TNF es secretado por macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T, células NK, después de la estimulación por lipopolisacáridos. Las células CD4 expresan TNF- α , mientras las células CD8 secretan poco o nada de TNF- α . Las células sin estimular y un número

de líneas celulares transformadas, células de la musculatura lisa, microglia, astrocitos y fibroblastos también secretan TNF- α . La síntesis de el TNF- α , es inducida por diversos estímulos incluyendo interferones, IL-2, GM-CSF, SP (sustancia P), bradiquininas, complejos inmunes, inhibidores de ciclooxigenasas y factor activador de plaquetas (15). La producción de el TNF- α es inhibida por la IL-6, TGF-beta, vitamina D3, prostaglandina E2, dexametasona, ciclosporina A y antagonistas de el factor activador de plaquetas (6). El TNF- α humano es una proteína no-glicosilada de 17 kDa con 157 aminoácidos. El TNF- α murino es N-glicosilado. La homología con TNF- β es de aproximadamente 50 %. El TNF- α forma dímeros y trímeros. La forma de 17 kDa de el TNF- α es producida por procesamiento de una proteína precursora de 233 aminoácidos, se ha demostrado que una enzima convertidora de TNF- α participa en esta conversión. También una forma transmembranal de 26 kDa ha sido descrita (27). La estructura de el gen de el TNF tiene un tamaño de aproximadamente de 3.6 kb y contiene 4 exones. El transcrito primario es de 2762 nucleótidos y codifica para una proteína precursora de 233 aminoácidos. Aproximadamente hay 500-10000 receptores de alta afinidad ($K_a = 2.5 \times 10^{-9}$ M) para el TNF- α , expresados en todos los tipos de células somáticas con excepción de los eritrocitos. Se han descrito dos receptores; uno de 55 kDa (TNF-R1, nueva designación: CD120a, también llamado superfamilia de el receptor de TNF miembro 1A;

TNF-RSF1A) y otro de 75 kDa (TNF-R2; nueva designación: CD120b, también referido como miembro de la superfamilia de el receptor de TNF- β 1B; TNF-RSF1B). El análisis de delección en la región intracelular C-terminal de el receptor de 55 kDa, TNF-R1 ha revelado la existencia de el llamado dominio de muerte celular que esta involucrado en el proceso de señalización conduciendo a muerte celular programada (11). El dominio de muerte de TNF-R1 interactúa con una variedad de otras moléculas adaptadoras de señales, incluyendo TRADD y RIP. Los dos receptores conocidos unen a TNF- α y TNF- β . El receptor p55 es expresado particularmente en células susceptibles a la acción citotóxica de el TNF. El receptor p75 esta presente en muchos tipos de células, especialmente en aquellas de origen mielóide. Este es expresado fuertemente en linfocitos B y células T. Las actividades de el TNF: inhibición del crecimiento y promoción de el crecimiento son probablemente mediados por la expresión diferencial y/o regulación de los receptores múltiples en combinación con otras proteínas distintas asociadas al receptor p55 parece jugar un papel crítico en las defensas del huésped en contra de microorganismos y sus factores patogénicos. (51, 84). Aparte de los receptores de membrana, varias proteínas solubles que unen al TNF han sido descritas, estas proteínas de aproximadamente 30kDa llamadas T-BP-1 y T-BP-2 (proteínas de unión al TNF), son derivadas de el receptor de membrana de el dominio de unión al TNF, pueden ser aisladas de orina y suero, y probablemente funcionan

como reguladores fisiológicos de actividades de el TNF al inhibir la unión de el TNF a su receptor. Las densidades de el receptor de TNF- α , son reducidas por IL-1 y promotores de tumor (esteres de forbol). La expresión de la densidad de el receptor de el TNF- α es inducida por INF- α , INF- β e INF- γ (20). La expresión de el TNF- α es dependiente de la activación de el factor de transcripción NF- κ B. Las regiones de unión al NF- κ B han sido identificadas en la región promotora de el gen de el TNF- α . El NF- κ B se une fisiológicamente a su proteína inhibitoria específica I κ B, en el citosol, cuando es activado, este complejo se disocia y el NF- κ B entra al núcleo. La activación de el NF- κ B puede ser inhibida por antioxidantes y la inhibición de interacción con su motivo es llevada a cabo por pentoxifilina. Entre los inhibidores de fosfodiesterasas empleados clínicamente, la pentoxifilina ha sido la más extensamente estudiada en relación a la actividad supresora de el TNF (36). El TNF- α es un mediador clave de el síndrome de el shock séptico inducido por LPS o superantígenos bacterianos. Muchas de las respuestas celulares de el TNF- α han sido atribuidas a la activación de el receptor TNF α -R tipo I p55. En contraste poco es conocido acerca de la función de el receptor de TNF- α R tipo p75. Aunque ratones TNF α -R -/- parecen ser resistentes al shock endotóxico ellos son susceptibles a la muerte por infecciones bacterianas (140). El TNF- α se ha visto involucrado en la patogenia de múltiples enfermedades infecciosas (síndrome séptico,

meningitis bacteriana, malaria cerebral, SIDA), enfermedades autoinmunes (Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn's, sarcodiosis, esclerosis múltiple, síndrome de Kaeasaki, enfermedad de el huésped contra injerto, rechazo de transplantes), falla de órganos (síndrome diestres respiratorio de el adulto, falla congestiva de el corazón, infarto al miocardio, falla aguda de el hígado) (36). Por otra parte, se mencionan algunos agentes que inhiben el TNF- α : IL-4, IL-10 (32, 36), factor de crecimiento transformante- β , factor neurotrópico ciliar; mediadores endógenos (corticosteroides, prostanoïdes, adenosina, histamina, óxido nítrico, ácido retinoico, ácidos grasos poli-insaturados n-3); drogas sintéticas (pentoxifilina, rolipram, ciclosporina A, clorpromazina, talidomida, ditiocarbamato-pirridolina, taurolidina, oligonucleótidos antisentido, guanilidrazona tetravalente, imidazoles bicíclicos), inhibición de el procesamiento de el TNF- α , (inhibidores de metaloproteasas: compuesto 2, GI 12471), inhibición de los efectos de el TNF- α , (anticuerpos anti-TNF- α , receptores solubles de el TNF) (36) .

1.10 Interleucina-8 (IL-8)

La IL-8 es un miembro de la subfamilia de quimiosinas CXC, descrita principalmente como un factor quimiotáctico de neutrófilos, producida por monocitos estimulados, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, keratinocitos, melanocitos, hepatocitos, condrocitos y un diverso número de líneas tumorales (127). En muchos tipos de células la síntesis de IL-8 es suprimida por la IL-1 y el TNF- α . La síntesis de IL-8 es inducida también por zimozan, fitohemaglutininas, concavalina A, RNA de doble hebra, esteroides de forbol, cristales de urato de sodio, virus y lipopolisacáridos bacterianos (31). Los glucocorticoides, IL-4, TGF- β , inhibidores de 5' lipoxigenasa y 1,25(OH) $_2$ vitamina D $_3$ inhiben la síntesis de IL-8 (92). El gen de la IL-8 humana, es de 5.1 kb y contiene cuatro exones. La región 5' de el gen de IL-8 contiene sitios de uniones para varios factores nucleares incluyendo factor-1 y factor-2 de activación, factor-1 regulatorio de INF, factor-1 nuclear de hepatocitos, un elemento de respuesta a glucocorticoides y un elemento de shock térmico (8). El receptor de la IL-8 es una glicoproteína dimérica (59 kDa y 67 kDa) conocida como CD128, es expresado en diferentes tipos de células incluyendo aquellos en los que no responden a IL-8. La densidad de el receptor es de aproximadamente 20000 X célula en neutrófilos y aproximadamente 300 X célula en linfocitos T. El receptor de IL-8 es un miembro de una familia de receptores unidos a la proteína G, existen al

menos dos diferentes tipos de receptores de IL-8. El receptor tipo 1 específicamente une a IL-8 ($K_d=0.8^{-4}\text{nM}$). El receptor tipo 2 también une ($K_d=0.3^{-2}\text{nM}$) a factores relacionados a IL-8 (MGSA; actividad estimuladora de el crecimiento de melanoma, GRO, MIP-2, MIP; proteína inflamatoria de macrófagos, y NAP-2 (Proteína-2 activadora de neutrófilos) (3). Las actividades de la IL-8 no son específicas de especie, la IL-8 humana es también activa en células de roedores y conejos. Las actividades biológicas de la IL-8 al parecer son las mismas que las de una proteína relacionada NAP-2 (61).

La IL-8 incrementa el metabolismo de las especies de oxígeno reactivos e incrementa la quimiotaxis y la expresión aumentada de moléculas de adhesión. La IL-8 por sí misma no libera histamina, actualmente se sabe que esta citocina inhibe la liberación de histamina de b́asofilos humanos inducidos por factores liberadores de histamina, proteína-3 activadora de el tejido conectivo (CTAP-3) e IL-3 (73). La IL-8 es quimiotáctica para todos los tipos de células inmunes migratorias, la IL-8 inhibe la adhesión de leucocitos a células endoteliales activadas y además posee actividades anti-inflamatorias. La forma de 72 aminoácidos de IL-8 es diez veces más potente en inhibir la adhesión de neutrófilos que la variante de 77 aminoácidos (74). La IL-8 derivada de macrófagos participa en los desórdenes dependientes de angiogénesis tales como artritis reumatoide,

crecimiento de el tumor y heridas. Una selectiva sobrerregulación en la glándula submucosa bronquial de IL-8 puede representar un evento primario que inicia la inflamación en la submucosa de las vías aéreas en pacientes con fibrosis quística (124).

1.11 Interleucina-12 (IL-12)

La IL-12 conocida anteriormente como Factor de maduración de linfocitos citotóxicos (CLMF), Factor estimulante de células natural killer (NKSF), Factor de maduración de linfocitos T citotóxicos (TcMF) y Factor estimulante de células T (TSF), es una citocina compuesta de dos subunidades (p40 y p35), producida por macrófagos-monocitos, células B y otros tipos de células accesorias (7). Los más potentes inductores de IL-12 son bacterias, productos bacterianos y parásitos. La IL-12 es producida después de la estimulación con esteres de forbol o ionoforo de calcio por células linfoblastoides B humanas. Esta citocina heterodimérica es una reguladora central de la respuesta inmune, producida por células mielomonocíticas, induce fuertemente la respuesta inmune Th1 especialmente debida a su habilidad para inducir la secreción de INF- γ por las células NK y células T. En ausencia de IL-12 una respuesta Th2 puede emerger conduciendo a la secreción de citocinas tales como IL-4, IL-10 e IL-

13. Estas citocinas Th2, especialmente IL-10, disminuye la regulación de la producción de INF- γ derivado de Th1 y de IL-12 derivadas de células presentadoras de antígeno (116). La subunidad p40 muestra alguna homología con el dominio extracelular de el receptor para la IL-6 y p35 parece ser homólogo de IL-6 (44). El receptor de IL-12 parece ser una sola proteína de aproximadamente 110 kDa. Más de 1000 a 9000 receptores de alta afinidad por célula de IL-12 son expresados en células mononucleares de sangre periférica activadas por varios mitógenos de célula T o por IL-12. Los receptores de IL-12 están presentes en células T activadas que expresan CD4, CD8 y en células asesinas naturales CD56 positivas. Las células mononucleares de sangre periférica sin estimular y células B de ganglios, no expresan el receptor de IL-12 . Los híbridos heterodímeros de las subunidades p40 humana y p35 murino retienen su bioactividad en células murinas. La IL-12 murina es activa en linfocitos humanos y murinos. La subunidad p40 de la IL-12 murina (IL-12p40) ha demostrado específicamente antagonizar los efectos de el heterodímero de IL-12 en diversas pruebas funcionando como un inhibidor específico endógeno para el heterodímero de IL-12 (85).

Concentraciones picomolares de IL-12 son igual de efectivas que las concentraciones nanomolares de IL-2 en aumentar la actividad citolítica de las células asesinas naturales expandidas *in vivo* por IL-2. La IL-12 también

actúa como un co-mitógeno e incrementa la proliferación de células periféricas en reposo inducidas por IL-2. La IL-12 probablemente esta involucrada en la selección de isotipos de inmunoglobulinas (109). La IL-12 murina altera la diferenciación de la subpoblación de CD4⁺ y participa en la inducción de inmunidad protectora en contra de infecciones de parásitos en ratones curando a ratones infectados con *Leishmania major* (50).

El STAT4 es el factor de transcripción empleado por IL-12. La IL-12 es crítica en peritonitis séptica debido a que promueve la respuesta inflamatoria durante la endotoxemia (80). La IL-12 participa en los procesos inflamatorios tempranos debido a que aumenta la producción de INF- γ . La IL-12 parece ser un componente vital en la defensa de el huésped en contra de organismos gram-negativos y positivos, debido a la resistencia de el huésped conferida por la administración de IL-12 en varios modelos de infección bacteriana. Sin embargo, los efectos pro- inflamatorios de IL-12 pueden ser mortales durante el proceso de sepsis.

La exagerada respuesta pro-inflamatoria a menudo asociada con la producción de IL-12 durante la sepsis puede resultar en daños y algunas veces síntomas fisiológicos fatales de la enfermedad (121).

1.12 Interleucina-10 (IL-10)

La IL-10 es una proteína de 35 kDa de alto poder anti-inflamatorio, producida por las células Th2 de las células CD4⁺, células B, monocitos, keratinocitos y células epiteliales bronquiales (88). La IL-10 juega un importante papel en disminuir la expresión de el TNF- α , IL-1 y miembros de las familias de quimosinas C-X-C y C-C. En macrófagos / monocitos la IL-10 disminuye la expresión de el RNA mensajero de las citocinas pro-inflamatorias inducidas por el LPS incluyendo TNF- α , IL-1, IL-12, quimosinas, proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α) y MIP-2 (45). Además de esto, la IL-10 inhibe la expresión de superficie de moléculas de el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, la síntesis de el óxido nítrico y la translocación nuclear de el NF- κ B después de la estimulación de el LPS y causa la modulación de los receptores de TNF- α (135). La IL-10 es una citocina crítica en la regulación de la sintetasa de el óxido nítrico inducible (iNOS) en células de las vías aéreas murinas y su ausencia puede conducir a una sobrerregulación de la iNOS y el desarrollo de inflamación alérgica de las vías aéreas (5). Varios estudios han identificado a la IL-10 como un importante regulador de la inflamación en una variedad de enfermedades inflamatorias incluyendo sepsis (121).

En varios modelos animales de sepsis la neutralización de IL-10 resulta en una exagerada expresión de citocinas pro-inflamatorias y muerte,

mientras la administración de la IL-10 recombinante confiere una significativa protección terapéutica (134). Estudios en animales y en pacientes críticamente enfermos han demostrado un incremento de la apoptosis en los órganos linfoides y algunos tejidos parénquimales; los cuales contribuyen a una supresión inmunológica, anergia y disfunción sistémica de órganos. Durante el síndrome séptico, la apoptosis de los linfocitos puede ser iniciada por ausencia de IL-2 o por la liberación de glucocorticoides, granzimas o las llamadas citocinas de muerte: TNF- α o ligando de Fas (103). La IL-10 ha mostrado inhibir la apoptosis inducida por LPS y por las citocinas recombinantes humanas TNF- α , IFN- γ , G-CSF y GM-CSF además se ha encontrado que la IL-4 e IL-13 recombinante humana (citocinas anti-inflamatorias) no inhiben la apoptosis. El desarrollo de colitis en ratones deficientes de IL-10, junto con las conocidas propiedades inmunomodulatorias y anti-inflamatorias de esta citocina han tomado en consideración a la IL-10 como un tratamiento para la enfermedad inflamatoria del intestino (60).

1.13 Oxido nítrico

El óxido nítrico (NO) endógeno es sintetizado a partir de la L-arginina por una familia de isoenzimas llamadas sintasas de el óxido nítrico (NOS) : NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS). Generalmente, el NOS constitutivo (cNOS) como eNOS y nNOS es activado por un incremento pasajero en el calcio citosólico que promueve la liberación de NO por varios minutos. El iNOS es expresado por muchas células incluyendo macrófagos y hepatocitos después de la estimulación de reacciones inflamatorias o inmunológicas produciendo grandes cantidades de NO por varios días. Los inhibidores de la NOS, como el N-monomethyl-L-arginina (L-NMMA), es ampliamente usado para inhibir la síntesis de el NO. El NO es un mensajero transcelular, multifuncional y difundible el cual ha estado implicado en numerosas condiciones patológicas y fisiológicas (54). La isoforma nNOS o tipo NOS I, es dependiente de calcio, encontrada en varias poblaciones de células nerviosas, apoya una función neurotransmisora en el sistema nervioso central y periférico; el eNOS o tipo III, es una isoforma dependiente de calcio expresada por células endoteliales, su principal función radica en la regulación del tono vasomotor y limita las interacciones entre las células endoteliales y células de la sangre en circulación (leucocitos y plaquetas).

La iNOS o tipo II es una isoforma independiente de calcio en la que su expresión es inducida en numerosos tipos de células debido a una estimulación por productos bacterianos tales como LPS de bacterias gram-negativas y por citocinas pro- inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e INF- γ).

Los mecanismos involucrados en el proceso de la inducción de iNOS son complejos y no están totalmente comprendidos. Ellos incluyen la activación de tirosinas quinasas y NF κ B.

Una vez expresada la iNOS produce grandes cantidades de NO por largos períodos de tiempo, es de hacer notar que en la nomenclatura inicial de las isoformas tanto de eNOS y nNOS fueron caracterizadas como constitutivas contrastando con el carácter inducible de iNOS. Sin embargo, esta distinción ha sido abandonada, desde que se conoce que los niveles de la expresión de el gen tanto de eNOS y nNOS pueden ser inducidos también bajo diferentes condiciones fisiológicas y que iNOS puede funcionar como una enzima constitutiva bajo condiciones fisiológicas en algunas células. Las diferentes isoformas de NOS catalizan la oxidación 5-electrón de uno de los nitrógenos de L-arginina, produciendo NO y citrulina. La reacción involucra oxígeno molecular y difosfonucleótido de nicotinamida (NADPH) como sustrato y requiere varios cofactores incluyendo un grupo hemo conteniendo hierro (protoporfirina IX-hierro), flavin-adenin-mononucleótido (FAD) y tetrahidrobiopterina. Los electrones derivados de

NADPH son almacenados por las flavinas y entonces transferidas al grupo prostético hemo permitiendo la reducción de el hierro y la subsecuente activación y ruptura de el oxígeno molecular. Un átomo de oxígeno es liberado como agua y el otro es incorporado a la L-arginina dando como resultado el producto intermediario N-hidroxi-L-arginina (NOHA). La incorporación de un átomo más de oxígeno a NOHA produce NO y su co-producto L-citrulina. La biosíntesis de el NO depende de la unión a la enzima de la calmodulina que es una proteína regulatoria de el calcio que controla la transferencia de electrones de el dominio reductasa de NOS (que une NADPH y las flavinas) al dominio catalítico oxigenasa de la enzima (que une hemo, BH₄ y L-arginina). La unión de calmodulina a eNOS y nNOS es promovida por calcio, mientras que calmodulina es levemente unida a iNOS como un grupo prostético. Así la actividad de eNOS y nNOS es regulada por calcio intracelular, mientras iNOS es mantenida en un estado activado independientemente de el calcio (79). En los últimos años se ha demostrado que un aumento en la producción de el NO esta relacionado con un incremento en la expresión de iNOS el cual esta implicado en la patogénesis de un número de enfermedades incluyendo shock circulatorio de varias etiologías, en particular shock séptico. Varios estudios han reportado un incremento en nitritos y nitratos, los cuales son productos estables de la oxidación de el NO y marcadores de la biosíntesis de el NO en pacientes sépticos. Las concentraciones de nitritos y nitratos, en el

plasma se correlacionan directamente con el vaciamiento cardíaco e inversamente con la resistencia de el sistema vascular apoyando el concepto de que la excesiva producción de el NO contribuye al estado hiperdinámico de vasodilatación característico de sepsis. La aumentada síntesis de NO en las paredes vasculares conducen a una marcada y sostenida vasodilatación, asociada con una disminución en la reacción vascular a agentes vasopresores, una caída en la resistencia vascular sistémica y el desarrollo de hipotensión refractaria, mientras la relajación de el lado venoso de la circulación favorece el reclutamiento periférico de sangre y disminuye el retorno venoso al corazón. A nivel microcirculatorio el exceso de el NO puede jugar un papel en la pérdida de el control microvascular conduciendo a una mala distribución de el flujo de sangre en los tejidos. El NO disminuye la contractilidad cardíaca y puede además ser un importante agente para la disfunción cardíaca observada durante el shock séptico (110, 143). Un número de consecuencias patológicas debidas al exceso de la producción de el NO están relacionadas a la citotoxicidad mediada por el NO. Las reacciones de el NO con el anión superóxido conduce a la formación de peroxinitritos, que disminuye rápidamente una vez protonado, el cual es altamente tóxico, iniciando la peroxidación lipídica e irreversible daño celular. Los efectos citotóxicos de el NO también incluyen interacciones complejas con las vías metabólicas involucradas en la producción de energía celular relacionada a una inhibición mediada por

NO de enzimas claves de el ciclo de Kreb's (cis-aconitasa) y la cadena transportadora de electrones mitocondriales (NADH: ubiquinona oxidoreductasa, NADH: succinato oxireductasa y citocromo oxidasa), así como la inhibición mediada de el NO de la glicólisis conduciendo a una disminución en la producción de acetyl-coA y equivalentes de reducción. Otros efectos citotóxicos de el NO incluyen inhibición de la síntesis proteica y alteraciones estructurales de el DNA.

Debido al importante papel de el NO como un importante mediador de el shock séptico, se han implementado estrategias terapéuticas principalmente encaminadas a interferir con la vía L-arginina/NO. Se han propuesto 5 estrategias diferentes para llevar a acabo este propósito e incluyen: 1).- prevenir la expresión de iNOS, 2).- inhibición de la actividad catalítica de NOS, 3).- reducción de la disponibilidad de la L-arginina, 4).- modulación de mensajeros secundarios, principalmente la vía guanilato-ciclasa-GMPc y 5).- el empleo de moléculas capaces de disociar al NO mismo. Entre todas estas modalidades terapéuticas la inhibición de la actividad catalítica de la NOS es considerada la más factible. Varias estructuras análogas de la L-arginina, que sustituyen al nitrógeno guanidino terminal, han demostrado actuar como inhibidores competitivo de NOS, N^G-monomethyl-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NA) y su methylester (L-NAME). Una importante característica de estas moléculas es

su falta de selectividad, lo que significa que ellos indiferencialmente bloquean la actividad catalítica de todas las isoformas de NOS. La administración de estos inhibidores de NOS producen una marcada mejoría en la reactividad vascular (81).

1.14 Definición de el Factor de Transferencia

La respuesta de inmunidad mediada por células de donadores inmunes a recipientes no inmunes fue primero descrita por Landsteiner y Chase en los inicios de 1940 (63). El Factor de Transferencia (FT) es el término empleado para definir a una variedad de sustancias presentes en los extractos dializables de leucocitos que pueden ser extraídos de células linfoides de humanos y de otros mamíferos (16, 68), que han demostrado transferir hipersensibilidad de tipo retardado e inmunidad protectora de el huésped a un animal o humano inmunodeficiente o inmunocomprometido (111). La presencia en los linfocitos de una sustancia comúnmente llamada FT y el papel de esta sustancia como portador de la memoria inmune celular fue primero demostrada por H.S. Lawrence (78). Se ha demostrado que la sustancia referida como FT es una mezcla de sustancias las cuales pueden ser definidas por sus propiedades químicas, perfil espectrofotométrico y principalmente por las propiedades biológicas de transferir inmunidad celular contra uno o una variedad de antígenos (64). El componente activo

de el extracto dializable de leucocitos (EDL) es llamado FT, solo cuando se refiere a la transferencia producida por el EDL. Sin embargo, desde que se sabe que el EDL contiene varios cientos de porciones químicas, muchos de los cuales son muy activos biológicamente ahora se reconoce el empleo del término EDL, conteniendo actividad de FT, el cual es una descripción más precisa para todas estas características (136).

1.15 Obtención de el Factor de Transferencia

El FT, presente en el EDL (10), se puede obtener a partir de tejidos como leucocitos de el suero de la sangre (16), ganglios linfáticos (70), bazo (66), calostro, leche (137); en condiciones *in vitro* mediante el cultivo de células de la línea linfoblastoide, etc. (47). La obtención de el FT puede hacerse específica o inespecífica hacia cualquier antígeno (16). Se han elaborado FT específicos a PPD (derivados de proteína purificadas de tuberculina), varidasa, candida, herpes, virus de inmunodeficiencia del simio (VIS), herpes virus, etc. (131).

1.16 Caracterización de el Factor de Transferencia.

El FT esta formado por un conjunto de moléculas pequeñas que pasan por poros que excluyen moléculas mayores de 10,000 a 12,000 kDa. El FT carece de efectos secundarios, no es tóxico al organismo y puede ser administrado tanto por vía oral como parenteral.

En 1983, Lawrence, S. encontró que si se hacía pasar el EDL por una membrana que exclusivamente deje pasar moléculas menores de 3500 kDa las moléculas que se retienen son específicas de antígeno, mientras que las moléculas que atraviesan el filtro tienen propiedades de incrementar en forma no específica la respuesta inmunológica. Las moléculas específicas han sido caracterizadas por varios investigadores entre otros por el grupo de Kirkpatrick como péptidos hidrofílicos altamente polares, con potente actividad biológica. Estos péptidos son los responsables de transferir inmunidad celular contra los gérmenes intracelulares (39).

Los FT son más pequeños que los anticuerpos y no transfieren respuestas mediadas por anticuerpos y a su vez no inducen la producción de anticuerpos (114). A la fecha no se ha logrado la caracterización de un FT esencialmente puro. Se fraccionaron extractos de leucocitos humanos mediante cromatografía de intercambio iónico, empleando diethylaminoethyl cellulosa (DEAE), filtración en gel, y cromatografía; encontrando nucleósidos en el FT. En 1983 Lawrence et al., empleando cromatografía por filtración en gel en extractos de leucocitos de humanos sensibilizados propone que el FT es: soluble en agua, dializable, con un peso molecular menor de 10,000 kDa y es resistente a la digestión por deoxyribonucleasa, ribonucleasa y tripsina y que posee un pico cromatográfico con una absorbancia mayor de 260 nm a 280 nm.

Esta combinación de factores proponen que el FT es un polirribonucleótido resistente a ribonucleasas. El progreso hacia la caracterización molecular de los FT ha sido lento, limitados por la falta de una adecuada metodología de purificación y la necesidad de cuantificar los métodos del ensayo. Se ha demostrado que las moléculas que tienen actividad de FT son relativamente pequeñas, menores de 6000 Da, hidrofílicas y polares en forma nativa. Además la actividad de este compuesto permanece si se calienta a 56 °C pero no a 75°C por 30 minutos y a una breve exposición de etanol al 95%. Los resultados de estudios de sensibilidad enzimática y depleción de actividad han producido resultados compatibles con un modelo de nucleoproteína o nucleopéptido para la estructura de los FT.

La idea de que un nucleótido es una parte de la molécula del FT fue continuada por Gottlieb et.al., el cual diferencia a los FT de moduladores inmunes y amplificadores. Se cree que los FT están codificados por rearrreglos de genes de la línea germinal en las células T CD4⁺, además es creíble que bajo condiciones naturales los FT funcionen seguidos a la presentación de antígeno restringido al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a células T apropiadas conteniendo FT. Se cree que los FT son liberados por células T estimuladas dentro del medio ambiente extracelular donde se unen a moléculas receptoras del FT en la superficie de células T vírgenes cercanas. Al igual se cree que los FT

liberados por células T tengan un papel en la presentación de antígeno lo cual puede ser manifiesto a través de la actividad de unión al antígeno específico de FT y facilitados a través de la formación de complejos antígeno-FT-producto MHC, en la superficie de células presentadoras de antígeno (65).

El FT posee propiedades dependientes e independientes de antígeno como se puede apreciar en las **tablas 3 y 4**.

Tabla 3.- Actividades de el FT independientes de antígeno

Aumento de la expresión de receptores de eritrocitos de carnero por linfocitos T
Actividad quimiotáctica
Acumulación de nucleótidos cíclicos por células mononucleares
Activación de macrófagos para producir factor de activación de linfocitos (FAL).
Aumento de respuesta de los linfocitos a mitógenos
Incremento en peso de órganos linfoides

Tabla 4.- Actividades de el FT dependientes de antígenos

Conversión de la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado
Producción inducida por antígeno de linfocitos
Aumento de la respuesta de la transformación de linfocitos a antígenos

Los modelos empleados han sido en la transferencia de inmunidad celular *in vivo* con FT murino y FT humano, pruebas *in vitro* de efectos de el FT en la producción de el factor de la inhibición de migración de leucocitos

inducido por antígenos se han llevado a cabo y los datos se enlistan en la tabla 6.

Tabla 5.- Efecto enzimático en la actividad de el factor de transferencia

Enzima	Conversión de la prueba en piel de hipersensibilidad de tipo retardada	Producción de inducción de LIF
Pronasa	S	S
Proteasa K	S	-
Carboxipeptidasa A	S	-
Leucina aminopeptidasa	R	-
Tripsina	R	R
Quimotripsina	R	R
Fosfodiesterasa I	S	R
Fosfodiesterasa II	R	S
Fosfatasa alcalina	R	S
Ribonucleasa T1	R	S
Ribonucleasa A	R	R
Ribonucleasa dimerizada A	S	-
Nucleasa P1	-	S
Desoxirribonucleasa	R	R

S=sensitivo; R=resistente en modelos humanos y murinos (37)

Se encontró que la actividad específica de antígeno de el EDL murino y humano reside en la fracción dializable < 3500 kDa y no en la fracción de >3500 kDa (100). El FT humano ha sido fraccionado en cromatografía de exclusión y las fracciones evaluadas para determinar su actividad biológica *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que la actividad específica del FT *in vivo* reside en la fracción III. Se encontró actividad supresora en la fracción I al igual que en la fracción IV, la cual muestra supresión de respuesta al antígeno, cuando es separado de otros componentes en la preparación y el

componente supresivo en esta fracción fue identificado como nicotinamida, es importante notar que la supresión de la transformación de linfocitos no se detectó hasta que la nicotinamida fue separada de los otros componentes (19). Se ha demostrado que el FT tiene efectos moduladores en los canales de Ca^{2+} lo cual estimula que se transporte Ca^{2++} hacia el interior de la célula. Se conoce que el Ca^{2++} es uno de los mensajeros que activan procesos celulares y pueden conducir a la diferenciación y producción celular de sustancias bioactivas. Esta es una de las vías posibles de la respuesta inmune (40).

Se han encontrado en el dializado de leucocitos ocho moléculas con actividades modulatorias, de las cuales seis moléculas tienen actividad amplificadora y dos tienen actividad supresora. Se considera usar el material amplificador en el tratamiento de condiciones anérgicas y condiciones de hiposensitividad inmune, tanto local y sistémica. Mientras el material supresor es empleado para la preparación y tratamiento de condiciones de hipersensibilidad local tales como veneno de hiedra y otros. Los factores inductores y supresores específicos de antígeno se pueden encontrar en la fracción de el dializado $< 12,000$ Da, con una mezcla de moléculas con actividades semejantes a adyuvantes no específicas como serotonina, bradikinina, ascorbato, nicotinamida, prostaglandinas, nucleótidos cíclicos y timosina α -1. Cuando los dializados son preparados de linfocitos purificados por Ficoll-Hypaq todos estos materiales y

probablemente otros se pueden encontrar en tal preparación. Si el dializado < 12,000 Da es sujeto a rediálisis a un corte de 3500-Da, entonces la fracción de la diálisis > 3500 Da contiene los factores supresores e inductores específicos de antígeno, mientras las moléculas semejantes a adyuvantes más pequeñas con actividad supresora no específica son segregadas en la fracción de la diálisis < a 3500 Da.

Alternativamente, los dializados conteniendo el factor inductor pueden ser preparados directamente de poblaciones de linfocitos purificados enriquecidas por células T cooperadoras y los dializados conteniendo factor supresor pueden ser preparados directamente de poblaciones de linfocitos purificados enriquecidas por células T supresoras (77) (Figura 6 y Tablas 6 y 7)

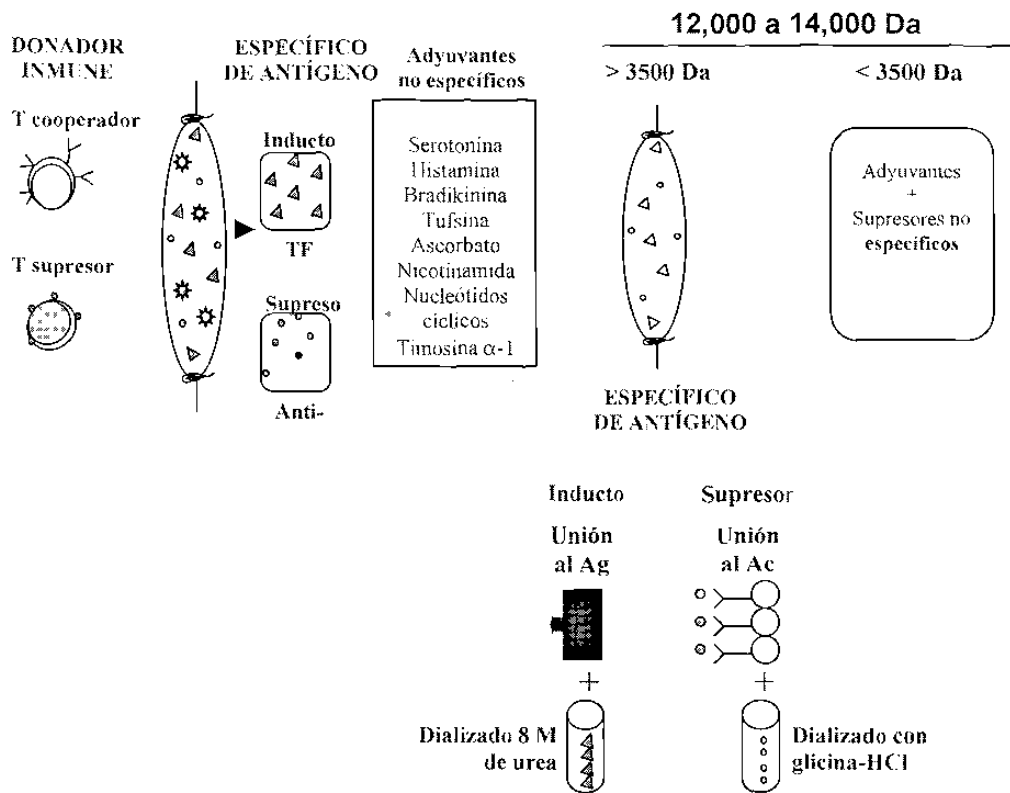


Figura 6.- Análisis cualitativo de el dializado de leucocitos conteniendo factores supresores y factores inductores de varias especificidades, aislamiento y purificación por diálisis diferencial e inmunoabsorción de afinidad.

Tabla 6.- Propiedades inductoras-cooperadoras de el FT

Unión a antígenos específicos pero no a anticuerpos específicos
Recuperación de antígeno-inmunoabsorbencia con urea 8 M
Unión a Anti-V _H pero no a anticuerpos Anti-V _K
Unión a Anti-Ia pero no a anticuerpos β_2 -Microglobulinas
Reside en células T cooperadoras y no en células T supresoras.
Absorbido por células T supresoras y por macrófagos
Es encontrado en la fracción de la diálisis > 3500 < 12,000 kDa
Células no-inmunes equipadas con una parte de unión al antígeno
No se sabe si es un fragmento dializable del receptor de antígeno de células T cooperadoras.

Tabla 7.- Propiedades supresoras del FT

Unión a anticuerpos IgG específicos pero no a antígeno específico
Recuperación de inmunoabsorbencia de IgG con Glycine-HCL
Unión a Anti-V _K pero no a anticuerpos Anti-V _L
Unión a Anti-Ia pero no a anticuerpos Anti- β_2 -Microglobulinas
Reside en las células T supresoras y no en las células T colaboradoras
Es absorbido por células T colaboradoras y por macrófagos
Se encuentra en la fracción de la diálisis > 3500 < 12,000 kDa
Bloquea la actividad inductora-cooperadora de FT sobre células no-inmunes en una dosis dependiente.
Abroga la respuesta de células inmunes a antígenos específicos <i>in vitro</i> y suprime la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado en el cojinete plantar en ratones Balb/c inmunes <i>in vivo</i> .

En 1995, Kirkpatrick et al., determinó que el FT es eficaz cuando se administra por vía oral, siendo resistente al medio ambiente enzimático y ácido de el estómago, y también postula que moléculas pequeñas tales como factores de transferencia (~5000-Da) son rápidamente absorbidos y evitan una prolongada exposición a un medio ambiente de degradación (62). Se ha reportado su efectividad administrándose por vía oral en el

tratamiento de herpes virus simplex, I y II, el efecto es manifiesto a partir de pocos días hasta 3 meses, la dosis y administración de el tratamiento necesita ser individualmente adaptado a cada paciente aunque todos los pacientes responden a dosis estándares de 2 unidades cada 3 días (1 unidad es obtenida de 10^8 células) (132).

El EDL conteniendo FT, se ha empleado en la práctica clínica en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades, como:

Infecciones virales: virus de el Epstein-Barr, (97), virus de el herpes simplex, hepatitis B (108), pacientes con SIDA, síndrome de inmunodeficiencia de el simio (SAIDS) (131), virus de Varicella-Zooster (119), citomegalovirus (102), estomatitis aftosa recurrente (sin etiología determinada), síndrome de fatiga crónica, fibromialgia (117).

Parásitos: Criptosporidiasis (86), coccidia (35), especies de Leishmaniasis.

Cáncer: carcinoma de pulmón (69), sarcoma osteogénico no metastático (46), papiloma laríngeo (4).

Enfermedades infecciosas: Micoplasma, neumonía, tonsilitis habitual, meningitis supurativa, cistitis crónica, tuberculosis pulmonar, postulosis palmoplantar, sarcoidosis, alergias (4), Candida albicans, Pneumocystis carini, (35), Histoplasma capsulatum, Coccidioido immitis, isospora y dermatitis infecciosa, entre otras (67).

1.17 Hipótesis

El extracto dializable de leucocitos bovino (EDLb) protege en contra de el shock endóxico inducido por el LPS modulando la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias.

1.18 Objetivos

- 1.- Determinar la dosis letal de el LPS en ratones Balb/C *in vivo*.
- 2.- Determinar el efecto biológico de el EDLb en la sobrevivencia de el modelo experimental de el shock endotóxico murino *in vivo*.
- 3.- Determinar el efecto biológico de el EDLb en la expresión de el RNAm de los genes de las citocinas pro-inflamatorias en el shock endotóxico murino *in vivo*.
- 4.- Determinar el efecto biológico de el EDLb en la producción de las citocinas pro-inflamatorias en el shock endotóxico murino *in vivo*.
- 5.- Determinar la dosis de el LPS en la que se produce una mayor cantidad de nitritos en macrófagos peritoneales murinos *in vivo*.
- 6.- Determinar el efecto biológico de el EDLb en la producción de nitritos en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*.
- 7.- Determinar el efecto biológico de el EDLb en la producción de las citocinas pro-inflamatorias en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*.

8.- Determinar el efecto biológico de el EDLb en la expresión de el RNAm de los genes de las citocinas pro-inflamatorias en células mononucleares de sangre periférica humana estimulada con LPS *in vitro*.

9.- Determinar el efecto biológico de el EDLb en la producción de las citocinas pro-inflamatorias en sangre periférica humana estimulada con LPS *in vitro*.

CAPITULO 2

Materiales y Métodos

2.1 Animales

Ratones Balb/C machos de 6 semanas de edad, se obtuvieron de el Bioterio de el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Los ratones fueron alimentados con una dieta balanceada de ratón y agua bidestilada *ad libitum*.

2.2 Elaboración del Extracto Dializable de Leucocitos bovino (EDLb)

El Extracto Dializable de Leucocitos Bovino, (Producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México) es un producto de un peso molecular de 10-12 kDa, elaborado a partir de el homogenizado del bazo de bovinos sanos, dializado, liofilizado y posteriormente sometido a pruebas de esterilidad (inoculación de ratones *in vivo*, cultivo en diversos medios de cultivo y determinación de endotoxinas mediante la prueba de *Limulus* del lizado de amoeboцитos (LAL) (Endotoxin-Kit-Timed Gel Formation, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA), libre de la presencia de pirógenos endógenos y bacterias. Se empleo un solo lote de EDLb para todos los experimentos

realizados. El EDLb obtenido de 1.0×10^8 leucocitos (definido como una unidad; 1U) fue disuelto en agua inyectable libre de pirógenos en un volumen de 0.2 ml e inmediatamente administrado a los ratones vía intramuscular (*i.m.*) según el modelo experimental a evaluar.

2.3 Lipopolisacáridos

El lipopolisacárido B (Lipopolysaccharide B from *E. coli* 026:B6 fue obtenido de SIGMA, Chemical Company, St. Louis, MO, USA) reconstituido en agua libre de pirógenos para preparar un stock a una concentración de 1 mg/ml, almacenado a -20°C hasta su empleo.

2.4 Tratamientos

2.4.1 Administración de diversas dosis de LPS en ratones *in vivo* para la determinación de la dosis letal

Se administraron diferentes dosis de LPS de 1 a 17 mg/kg de peso por animal por vía intraperitoneal. En grupos de 10 ratones para cada una de las dosis administradas, monitoreando la morbilidad, mortalidad y sobrevivencia por un período de 72 horas. Se determinó la dosis letal de el 100% inducida por LPS.

2.4.2 Administración de el EDLb en el shock endotóxico murino inducido por LPS

El EDLb (1U) fue disuelto en 0.2 ml de agua inyectable libre de pirógenos e inyectado vía intramuscular a diferentes tiempos (30 min, 4, 8 y 12 h) después de el tratamiento con LPS (17 mg/kg). Los animales control recibieron como tratamiento 0.2 ml de agua inyectable libre de pirógenos vía i.m. o EDLb (1U) vía i.m. Para cada uno de los tratamientos se formaron grupos de 10 ratones y se monitorearon morbilidad, mortalidad y sobrevivencia por un período mayor de 72 horas. Posteriormente, los animales se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente fue colectado el bazo mediante esplenectomía radical y la sangre mediante punción cardíaca a intervalos regulares de tiempos una vez que recibieron el tratamiento con LPS, EDLb, o LPS + EDLb (30 minutos, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas). El RNA total fue aislado de los bazos para el análisis de el RNAm de citocinas pro-inflamatorias mediante RT-PCR y el suero fue conservado a -70°C para la determinación de citocinas por ELISA.

2.4.3 Obtención, tratamiento y cultivo de macrófagos peritoneales murinos.

Ratones Balb/C hembras de 6 semanas de edad, fueron sacrificados mediante dislocación cervical, para la obtención de macrófagos peritoneales residentes, mediante lavados repetidos y recuperación de el medio de cultivo RPMI-1640 estéril y frío dentro de la cavidad peritoneal de el ratón, empleando una jeringa con aguja estéril.

Una vez obtenidas las células, se centrifugaron a 1200 RPM por 10 minutos, se lavaron 2 veces con medio de cultivo RPMI-1640 estéril. Los macrófagos peritoneales fueron cultivados en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA) a una concentración de 1.6×10^6 células / ml en medio de cultivo RPMI-1640 completo (conteniendo 10% de SFB inactivado y 1% de una solución penicilina estreptomycin), se incubaron durante 2 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%CO₂, para permitir la adherencia de los macrófagos al plástico, después se decanto el medio y se estimularon con LPS (Lipopolysaccharide from E. coli 026:B6 Sigma Chemical. St.) en un rango de dosis de 1 a 100 µg/ml para determinar la dosis que inducía una mayor producción de LPS durante un período de incubación de 72 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%O₂. Todos los tratamientos se ajustaron a un volumen final de 200 µl.

Posteriormente, para determinar el efecto de la administración a diferentes tiempos del EDLb (0.5 y 0.05 U/ml) en la producción de nitritos en macrófagos peritoneales estimulados con LPS, se incubaron durante 72 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%CO₂. Un volumen de 200 µl de los sobrenadantes de cada tratamiento fue colectado y almacenados a -70° C en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles hasta su evaluación para la determinación de nitritos mediante el método de Greiss. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

2.4.4 Determinación de la producción de citocinas pro-inflamatorias

TNF- α , IL-6 e IL-10 en macrófagos peritoneales murinos mediante

ELISA

Los macrófagos peritoneales murinos (5×10^6 células / pozo) fueron cultivados en placas de 6 pozos, en medio RPMI-1640 completo (conteniendo 10% de SFB inactivado y 1% de una solución penicilina-estreptomicina), estimulados con 100 µg de LPS y tratados con 1 U de EDLb e incubados durante los tiempos indicados. Posteriormente, los sobrenadantes fueron centrifugados por 5 minutos a 1200 rpm/ min para remover restos celulares y transferidos a tubos eppendorf estériles y almacenados a -70°C hasta su análisis de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 mediante ELISA.

2.4.5 Determinación de la producción de citocinas pro-inflamatorias

TNF- α , IL-6 e IL-10 en sangre periférica humana *in vitro*

La sangre de individuos voluntarios sanos fue colectada en jeringas estériles conteniendo heparina. Alícuotas de 5 ml de sangre fueron colocados en tubos de polipropileno (Falcon, Heidelberg, Germany), estimulados con 50 ng de LPS y tratados con 1 U de EDLb. Los tubos conteniendo las muestras de sangre fueron colocados en un rotor e incubados a 37°C, 95%O₂ y 5%CO₂ durante 5 h. Después de esto el plasma fue colectado mediante centrifugación de la sangre (a 1200 rpm / 5 min) y transferidos a tubos nuevos estériles y almacenados a - 70° C hasta su evaluación para la determinación de la producción de citocinas mediante ELISA.

2.4.6 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (CMNPH) para la determinación de la expresión de el RNA m de citocinas pro-inflamatorias mediante RT-PCR.

Muestras de sangre periférica humana fueron estimuladas con 50 ng de LPS y tratadas con 1 U de el EDLb. Los tubos conteniendo las muestras de sangre fueron colocadas sobre un rotor e incubados a una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%O₂, durante un período de 5 horas.

Posteriormente, las muestras fueron procesadas inmediatamente para la colección de las CMNPH. En un gradiente de densidad Histopaque-1077 (Sigma #1077-1 ST. Louis, MO, USA). Las CMNPH fueron colectadas y lavadas 2 veces con medio RPMI-1640 sin SFB y ajustadas a una densidad de 5×10^6 células / ml, el pellet de las CMNPH fue obtenido mediante una centrifugación a 1200 rpm/5 min y 1 ml de TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY) fue adicionado para la obtención de el RNA total. Posteriormente se determinaron las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 mediante RT-PCR.

2.4.7 Determinación de la Viabilidad Celular

Al final de todos los experimentos se determino la viabilidad celular empleando el colorante azul trypan (Sigma Chemical ST. Louis MO). El empleo de el azul trypan permite determinar la diferenciación entre una célula viva de una muerta mediante exclusión celular.

2.5 ELISA

(Enzyme-linked immunosorbent assay)

Es un método que cuantifica un antígeno fijado sobre una superficie sólida empleando un anticuerpo específico con una enzima acoplada covalentemente. La cantidad de anticuerpo que une el antígeno es proporcional a la cantidad de antígeno presente y es determinada espectrofotométricamente midiendo la conversión de un sustrato sin color a un producto coloreado por el acoplamiento de la enzima.

Procedimiento:

- 1.- Se determina el número de tiras a usar
- 2.- Se adicionan 100 μ l del buffer diluyente standard al pozo cero
- 3.- Se adicionan 100 μ l de cada uno de los standard a los pozos apropiados
- 4.- Se adicionan 50 μ l del buffer diluyente standard por pozo + 50 μ l de la muestra problema
- 6.- Se adicionan 50 μ l del anticuerpo Anti-TNF- α biotinilado (Conjugado de biotina) en cada pozo excepto en el blanco del cromógeno.

7.- Se mezcla suavemente, se cubre el plato con un plástico y se incuba por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente

8.- Se decanta la solución de los pozos, se descarta el líquido, se lavan los pozos 4 veces con el buffer de lavado

9.- Se adicionan 100 μ l de estreptavidina-HRP (Solución previamente elaborada). Excepto el blanco del cromógeno.

10.- Se cubre el plato con el plástico y se incuba por 30 min a temperatura ambiente

11.- Se decanta la solución de los pozos y se descarta el líquido, se lavan los pozos 4 veces con el buffer de lavado diluido.

12.- Se adicionan 100 μ l del cromógeno estabilizador a cada pozo. También se agrega al pozo que se dejó para el cromógeno. El líquido en el pozo se empieza a tornar azul.

13.- Se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad (no cubrir con metal o papel aluminio)

14.- Se adicionan 100 μ l de la solución de terminación de la reacción (Stop Solution) a cada pozo, se cubre y se mezcla suavemente. Los pozos cambian de azul a amarillo.

15.- La absorbancia se lee a 450 nm y se blanquea contra el pozo de el cromógeno (que contiene 100 μ l de el cromógeno y 100 μ l de la solución de terminación de la reacción).

16.- La lectura debe realizarse no pasándose de 2 horas después de agregar la solución de parado.

17.- Se multiplican los valores obtenidos por muestra por 2

Preparación de reactivos

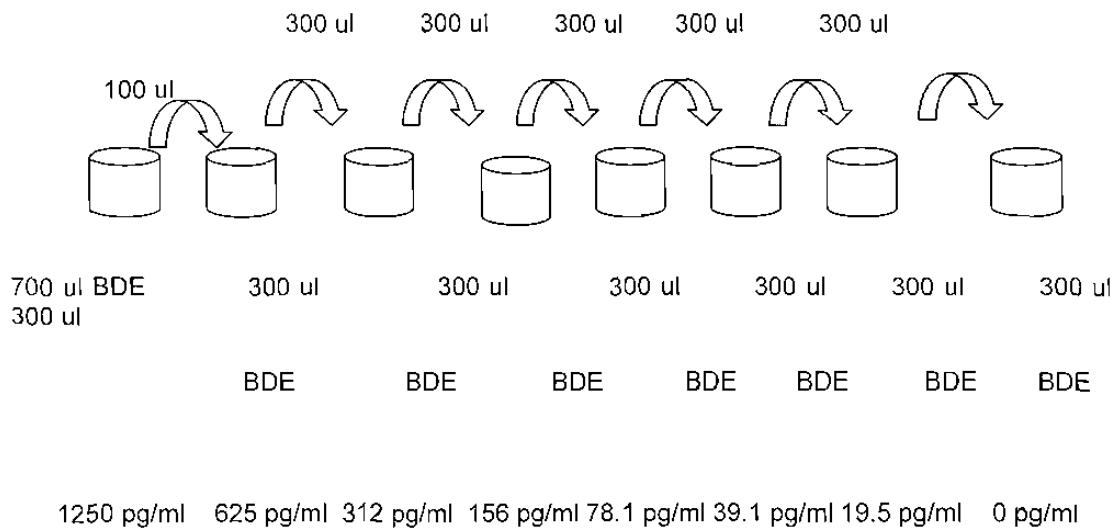
Buffer de Lavado (25X; 100 ml por bote): Se deja a temperatura ambiente y se mezcla, posteriormente se diluye tomando 1 volumen de 25 X con 24 volúmenes de agua deionizada, una vez preparado el buffer se guarda en refrigeración y luego se desecha a los 14 días.

Procedimiento de lavado: Se aspira el líquido de los pozos o se decanta, luego se llena cada pozo con 400 μ l de buffer de lavado diluida, se agita por 15 segundos y se aspira el líquido o decanta, después el plato es invertido y se coloca un papel absorbente abajo.

Buffer Diluyente Estandar: se emplea sin diluir.

Recostitución de el estandar:

El estándar se reconstituye con 1.3 ml del buffer diluyente estándar. Posteriormente se hacen diluciones tal como se muestran en la **Figura 7**.



BDE= Buffer diluyente estándar

Figura 7.- Dilución de el buffer diluyente estándar

Se descartan los estándares diluidos como el estándar después de llevada a cabo la prueba. El buffer diluyente estándar se refrigera.

Almacenaje y Reconstitución de Estreptavidina-HRP 100X:

Se Diluyen 10 µl de esta solución concentrada con 1 ml del diluyente estreptavidina-HRP para cada tira de 8 pozos a usar en la prueba.

2.6 RT-PCR

(reverse transcription-polymerase chain reaction)

Es una adaptación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleada para amplificar un DNA complementario (DNAc) de un gen de interés. En este método, el RNA es aislado de una célula la cual está expresando el gen, y los DNA complementarios son sintetizados mediante el empleo de la enzima transcriptasa reversa. El DNAc de interés es amplificado por técnicas convencionales de PCR con primers específicos del gen.

Aislamiento de el RNA total (TRIZOL Reagent)

Producción esperada de RNA por mg de tejido o por 1×10^6 cells:

Hígado y Bazo: 6-10 μg

Células epiteliales: 8-15 μg

Fibroblastos: 5-7 μg

Se obtienen 50 μg de RNA total los cuales son resuspendidos en 10 μl de agua DEPC, (50 μg RNA total / 10 μl de agua DEPC). De este stock se toman 2 μl de RNA total para llevar a cabo la reacción del DNAc.

Homogenización:

El trizol es una mezcla de fenol y GTC. El fenol es un solvente orgánico que desnaturaliza proteínas. GTC, es un inactivador de RNAasas. Ambos compuestos son tóxicos y causan quemaduras.

1.- Se adicionan 1ml de Trizol a 50 mg ó 100 mg de tejido ó $5-10 \times 10^6$ células.

Fase de Separación

2.- Se incuba la muestra por 5 minutos a 15-30°C

3.- Se adicionan 200 μ l de cloroformo / ml de trizol empleado

4.- Se agita la muestra durante 15 segundos

5.- Se incuba a 15-30 grados centígrados durante 2-3 minutos

6.- Se centrifugan las muestras a 12,000 x g / 15 minutos a 2-8°C

(Nota: el cloroformo es un solvente orgánico denso que puede forzar la fase acuosa y fenolica a separarse)

7.- Se obtienen tres fases: a).- en la parte superior, se obtiene una fase acuosa sin color la cual contiene el RNA total de donde se pueden colectar 600 μ l de la suspensión. b).- Interfase, es una banda de color

bianco, aquí se encuentra el DNA genómico. c).- Fase roja, cloroformo fenol, en esta fase se encuentran las proteínas.

8.- De la fase acuosa se toman de 400 a 600 μ l, los cuales se colocan en un tubo eppendorf estéril nuevo, se tiene cuidado de no aspirar la interfase.

Precipitación

9.- Se adicionan 500 μ l de Isopropanol alcohol absoluto

10.- Se incuba a 15-30°C / 10 minutos

11.- Se centrifuga a 12,000 x g / 10 minutos a 2-8°C

(Nota: el isopropanol causa que el RNA precipite en la solución, muchas sales incluyendo GTC pueden permanecer en la solución).

Lavado de el RNA

12.-Se remueve el sobrenadante por inversión y se lava el pellet con 1 ml de etanol al 75%. (Nota: el etanol mantiene el precipitado de RNA; el 25% de agua es suficiente para permitir que las sales sean removidas del pellet).

13.- Se mezcla mediante agitación en vortex

14.- Se centrifuga a 7500 x g /5 minutos a 2-8°C

15.- Se remueve el sobrenadante por inversión y se seca el pellet de el RNA total a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.

Disolviendo el RNA

16.- Se disuelve el RNA en 10 µl de agua DEPC, se pipetea varias veces para disolver, posteriormente la muestra se incuba a una temperatura de 55 a 60°C / 10 minutos.

17.- Se calcula la concentración de el RNA total, haciendo una dilución de las muestras de el RNA: 1.1000 = 1 µl RNA + 999 µl de agua o 1.500 = 2 µl de RNA + 998 µl de agua. Se lee la absorbancia a 260 nm y se hacen los siguientes cálculos $RNA(ug/ul) = (DO_{260nm})(dilución)(.05ug/µl)$

Aislamiento del RNA empleando la técnica del TRIZOL Reagent, (LIFE TECHNOLOGIES) GIBCO BRL. Cat. No. 15596.

Síntesis de la primera cadena de cDNA usando la enzima SUPERScript II (Rnase H Reverse Transcriptase) Cat. No. 18064-014. 10,000 units; 200U/ μ l.

Un volumen de reacción de 20 μ l se emplean para 5 μ g de RNA total o 1 ng – 500 ng de RNA mensajero. Se Adicionan los siguientes componentes a un tubo de Eppendorf libre de nucleasas:

1 μ l de Oligo (dt)12-18 (500 μ g/ml)

2 μ l de RNA total (1ng a 5 μ g de RNA total)

1 μ l del stock de 10 mM dNTP Mix

8 μ l de agua destilada estéril

4 μ l de 5X First-Strand Buffer

2 μ l de 0.1 M DTT

1 μ l de Inhibidor de Ribonucleasas (40 unidades/ μ l) (cuando use menos de 50 ng de RNA inicial, la adición del inhibidor es esencial).

1 μ l de SuperScript II (200 unidades), se mezcla generosamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo.

Al final de la mezcla se obtiene un volumen total de 20 μ l el cual se incuba a 42°C durante 50 minutos. la reacción se inactiva a 70°C durante un tiempo de 15 minutos. El DNAC puede ser usado como templado para la amplificación en PCR.

Para llevar a cabo la reacción de M-PCR, se adicionan en un tubo estéril:

H ₂ O DEPC	7.625 μ l
10Xm SEP2G MPCR Buffer	1.250 μ l
10Xm SEPG MPCR Primer	1.250 μ l
Taq DNA Polimerase (GIBCO) (5 U/ μ l)	0.250 μ l
dNTP	4 μ l
DNAc	2 μ l

Se obtiene un volumen total de : 16.372 μ l

La reacción de el PCR para determinar los genes de las citocinas pro-inflamatorias de ratón se llevo a cabo en un termociclador PTC-200, Peltier Thermal Cycler. (MJ RESEARCH INC. Masachussetts, USA), involucrando un período de desnaturalización de 4 min a 94°C; además de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 2 min y 72°C por 2 min seguido por una extensión final a 72°C por 7 min. El tamaño del DNA amplificado fue de 658 pb para GAPDH, 538 pb para IL-10, 453 pb para IL-6, 351 pb para TNF- α , 294 pb para IL-1 β , 237 pb para IL-12 p40 (MPCR Kits for Mouse Sepsis Cytokines Set-2 Cat.#: SEP-M152G, SEP-M112G& SEP-M554 G, Instruction Manual, Maxim Biotech, Inc.) El tamaño y la cantidad

de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

La reacción de PCR para determinar los genes de las citocinas pro-inflamatorias de humano llevo a cabo en un termociclador PTC-200, Peltier Thermal Cycler (MJ RESEARCH INC. Masachussetts, USA) empleando un multikit conteniendo primers específicos (MPCR Kits For Human Sepsis Cytokines Set-2. Cat. #: SEP-M052G & SEP-M012G Maxim Biotech, Inc. SAN FRANCISCO, CA.). El Kit fue usado de acuerdo a las especificaciones de el fabricante. Involucrando un período de desnaturalización de 4 min a 94°C; además de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 2 min y 72°C por 2 min seguidos de una extensión final a 72°C por 7 min. El tamaño de el DNA amplificado fue de 922 pb para GAPDH, 682 pb para TNF- α , 528 pb para IL-1 β , 433 pb para IL-12 p40, 358 pb para IL-6, 300 pb para IL-8 y 228 pb para IL-10. Una vez concluida la reacción de PCR, se toman 8 – 10 μ l de esta reacción y se combina con 1.5 μ l de jugo azul, para determinar la expresión de los genes, en un gel de agarosa al 2%, con un voltaje de 90 volts, y un buffer de corrida al 1X. El tamaño y la cantidad de los productos de PCR fueron analizados por electrofóresis en geles de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

2.7 Determinación de óxido nítrico basado en la reacción de Greiss

La cantidad de nitritos en los sobrenadantes del cultivo fueron determinados con el ensayo de Greiss la L-Arginina, es el sustrato para la sintetasa de óxido nítrico (NOS) y es convertida a L-citrulina y óxido nítrico (NO). El NO es oxidado a compuestos estables que son NO_2^- y NO_3^- . Los reactivos del ensayo de Griess son : Sulfanilamide 1% más 7 ml de H_3PO_4 y N-(1-naphthyl)-ethylendiamine hidrocloreto 0.1% (0.1g en 100 ml de agua destilada) (NED). Estos compuestos son premezclados en partes iguales y entonces incubados con una muestra conteniendo NO_2^- (proporción 1:1) formándose un color púrpura, el producto coloreado fue cuantificado empleando un lector de ELISA (autoreader Bio-tek Instruments INC. EL311) a una absorbancia de 540 nm. La concentración de nitritos en las muestras fueron determinadas como μM de NO_2^- / ml empleando una curva estándar para nitritos la cual fue incluida en cada prueba.

CAPITULO 3

Resultados

3.1 Efecto dosis-respuesta de la administración de el LPS

La administración de diferentes dosis de el LPS (1, 5, 7, 10, 13, 15 y 17 mg/kg) en ratones Balb/C, indujo el desarrollo de la sintomatología de el shock endotóxico: pilo-erección y diarrea. La severidad de los síntomas y el grado de sobrevivencia de los ratones fue dependiente de la dosis de LPS utilizada (Figura 8). La administración de el LPS afectó la morbilidad, mortalidad y sobrevivencia, encontrando que la dosis de LPS de 17 mg/kg indujo en los ratones el 100% de mortalidad en un período no mayor a 22 horas (Figuras 8 y 9). La dosis de LPS de 17 mg/kg fue empleada para evaluar los efectos de el EDLb en la sobrevivencia de los animales seguido al shock endotóxico inducido por LPS (Figura 8 y Tabla 9).

3.2 Efecto protector de el EDLb en el shock endotóxico murino inducido por LPS

La administración de el EDLb (1 U/ratón) protegió contra la muerte inducida por 17 mg/kg de LPS en el shock endotóxico murino *in vivo*.

Sobresaliendo en un 90 % de sobrevivencia la eficacia de la administración de el EDLb 8 horas después de inducido el shock