

endotóxico, protegiendo contra la letalidad inducida por la inyección de el LPS ($P < 0.05$). La administración de el EDLb en ratones no inyectados con LPS, no afectó su morbilidad, mortalidad ni sobrevivencia ($P < 0.05$). La administración de 17 mg/kg de LPS afectó significativamente la morbilidad, mortalidad y sobrevivencia de los ratones ($P < 0.05$). Se observó que después de la inyección de el LPS en los ratones *in vivo* la morbilidad empezó a manifestarse a partir de una hora. La mortalidad se presentó a partir de las 14 horas postinyección con 17 mg/kg de LPS. La administración de el EDLb retardo la mortalidad hasta 20-26 horas ($P < 0.05$) en todos los ratones inoculados con LPS *in vivo* de el shock endotóxico.

Después de 72 horas no se observaron cambios en la letalidad (Figura 9 y Tabla 8).

3.3 Efecto de el EDLb en la expresión de IL-10 en el shock endotóxico murino *in vivo*

La administración a ratones con agua inyectable libre de pirógenos endógenos así como de ratones que no recibieron tratamiento, no estimuló la expresión de IL-10 (Figuras 10, 11 y 12). El tratamiento con EDLb indujo ligeramente la expresión de IL-10 durante todos los tiempos evaluados, (Figura 11). La administración de LPS indujo la expresión de IL-10 a partir de los 30 minutos manteniéndose así hasta las 12 horas y

disminuyendo ligeramente su expresión hasta las 20 horas (Figura 10). En los ratones inyectados con LPS y tratados con EDLb después de 8 horas, se suprimió la expresión de IL-10 en todos los tiempos evaluados (Figura 12).

3.4 Efecto de el EDLb en la expresión de IL-6 en el shock endotóxico murino *in vivo*

No se detectó la expresión de IL-6 en ratones tratados con agua inyectable libre de pirógenos endógenos (Figuras 10, 11 y 12) ni en los tratados con EDLb (Figura 11). La administración de LPS indujo en gran medida la expresión de IL-6 a partir de los 30 minutos, manteniendo su expresión hasta las 20 horas (Figura 10), los ratones en este tiempo presentaban síntomas inminentes de muerte. En los ratones inyectados con LPS y tratados con EDLb después de 8 horas, se suprimió la expresión de IL-6 en todos los tiempos evaluados (Figura 12).

3.5 Efecto de el EDLb en la expresión de TNF- α en el shock endotóxico murino *in vivo*

En el grupo control de ratones (inyectados con agua inyectable libre de pirógenos endógenos) (Figuras 10, 11 y 12) se detectó la expresión de el TNF- α , por otra parte en el grupo de ratones tratados con EDLb se incremento la expresión de el TNF- α manteniendo su expresión hasta las

72 horas (Figura 11). El tratamiento con LPS incremento en gran cantidad la expresión de TNF- α durante todos los tiempos evaluados, disminuyendo ligeramente su expresión a partir de las 20 horas, los ratones en este tiempo presentaban síntomas inminentes de muerte (Figura 10). En el grupo tratado con LPS y después de 8 horas tratados con EDLb los niveles de expresión de el TNF- α disminuyeron a partir de los 4 horas (Figura 12).

3.6 Efecto de el EDLb en la expresión de IL-1 β en el shock endotóxico murino *in vivo*.

En el grupo control (Figuras 10, 11 y 12) y en el tratado con EDLb (Figura 11) mostraron niveles comparables de expresión de IL-1 β . El tratamiento con LPS incremento considerablemente la expresión de IL-1 β en todos los tiempos evaluados, disminuyendo su expresión a las 20 horas (los ratones en este tiempo presentaban síntomas inminentes de muerte) (Figura 10). En ratones inyectados con LPS y después de 8 horas tratados con EDLb se incremento la expresión de IL-1 β a partir de los 30 minutos, mostrando una disminución gradual de expresión dependiente de el tiempo, manteniendo valores similares al control a las 72 horas (Figura 12).

3.7 Efecto de el EDLb en la expresión de IL-12 p40 en el shock endotóxico murino *in vivo*.

En el grupo control, se encontró la expresión de el gen de IL-12p40 (Figuras 10, 11 y 12). En el grupo de ratones tratados con EDLb los niveles de expresión de este gen se incrementaron a partir de las 4 horas, disminuyendo su expresión hasta las 72 horas, sin afectar el comportamiento de los ratones (Figura 11). El tratamiento con LPS incremento la expresión de IL-12 p40 en todos los tiempos disminuyendo su expresión a las 72 horas (Figura 10). En ratones inyectados con LPS y después de 8 horas tratados con EDLb la expresión de IL-12p40 se incremento a partir de las 1.5 horas y los niveles de expresión disminuyeron a partir de las 24 horas (Figura 12).

3.8 Efecto de el EDLb en la producción de IL-10, TNF- α , e IL-6 en el shock endotóxico murino *in vivo*

En los ratones pertenecientes al grupo control, no se observo la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 ($P < 0.01$) (Figuras 13, 14 y 15 respectivamente). En ratones inyectados con EDLb no se encontró la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 ($P < 0.01$) (Figuras 13, 14 y 15 respectivamente). En ratones inyectados con LPS se encontró un incremento significativo ($P < 0.01$) de la producción de citocinas (TNF- α ,

IL-6 e IL-10) (Figuras 13, 14 y 15 respectivamente). En ratones inyectados con LPS y después de 8 horas tratados con EDLb se redujo significativamente ($P < 0.01$) la producción de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 (Figuras 13, 14 y 15).

3.9 Efecto de el LPS en la producción de nitritos en macrófagos peritoneales murinos *in vitro*.

Para determinar la dosis de LPS que inducía un mayor incremento en la producción de nitritos. Macrófagos peritoneales murinos (1.6×10^6 cell/ml) fueron cultivados en cajas de 96 pozos y tratados con diversas dosis de LPS (0,1,10,20,30,40,50,80 y 100 $\mu\text{g/ml}$) e incubados a 37°C en una atmósfera de 95% O_2 y 5% de CO_2 durante 72 horas. El sobrenadante (200 μl) fue colectado y evaluado para determinar la producción de nitritos. Se determino que el estímulo con 20 $\mu\text{g/ml}$ de LPS indujo una mayor producción de nitritos en macrófagos *in vitro* ($P < 0.01$).

Encontrando diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) en cuanto a la producción de nitritos dependientes de las dosis de LPS empleadas en macrófagos peritoneales murinos (figura 16).

3.10 Efecto de el EDLb en la producción de nitritos en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*.

El estímulo con LPS (20 $\mu\text{g/ml}$) en macrófagos peritoneales murinos indujo una gran producción de nitritos ($P < 0.01$) (Figura 16). Se observó que el LPS afectó la viabilidad de estas células de una manera dependiente de dosis (Figura 17). El tratamiento con EDLb (0.5 y 0.05 U/ml) en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS disminuyó significativamente ($P < 0.01$) la producción de nitritos en cada uno de los tiempos de incubación. El tratamiento con EDLb (0.5 y 0.05 U/ml), sin el estímulo de LPS en macrófagos peritoneales murinos no afectó en la producción de nitritos ($P < 0.01$). Se observó diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los diferentes tratamientos empleados en este experimento (Figura 15). También se determinó que el EDLb no afecta la viabilidad ($P < 0.01$) de los macrófagos peritoneales murinos (Figura 19).

3.11 El EDLb modula la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*.

El estímulo con LPS indujo significativamente ($P < 0.01$) la producción de TNF- α , IL-10 e IL-6 (Figuras 20, 21 y 22). El tratamiento con EDLb en macrófagos peritoneales murinos en ausencia de LPS, estimuló significativamente ($P < 0.01$) la producción de IL-10 (Figura 21) e

IL-6 (Figura 22) sin afectar significativamente ($P < 0.01$) la producción de TNF- α (Figura 20). El tratamiento con EDLb en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS redujo significativamente ($P < 0.01$) la producción de TNF- α (Figura 20), IL-6 (Figura 22) e incremento la producción de IL-10 (Figura 21) ($p < 0.01$). Se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos en cuanto a la producción de las diversas citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10).

3.12 Determinación de la viabilidad de macrófagos peritoneales murinos

Al final de todos los experimentos se determinó la viabilidad celular mediante el colorante de exclusión azul tripan encontrando aproximadamente un 95 a 98% de viabilidad en los macrófagos peritoneales murinos.

3.13 Efecto de el EDLb en la expresión del RNAm de citocinas pro-inflamatorias en sangre total humana estimulada con LPS.

En las células mononucleares de sangre periférica (CMNPH) aisladas a partir de sangre total se observó una ligera expresión de el RNAm del TNF- α e IL-8. En CMNPH estimulada con LPS (50 ng/ml) se observo un incremento en la expresión de citocinas (TNF- α e IL-8) y la

inducción de la expresión de el RNAm de IL-1 β , IL-12p40, IL-6 e IL-10. El tratamiento con EDLb (1 U) en CMNPH estimulada con LPS (50 ng/ml) disminuyó la expresión de el RNAm de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y suprimió la expresión de el RNAm de IL-12 p40 e IL-10, sin afectar la expresión de el RNAm de IL-8. El tratamiento con EDLb indujo la expresión de el RNAm de IL-1 β e IL-6, incremento la expresión de IL-8, sin afectar la expresión de IL-12 p40, IL-10 y TNF- α en CMNPH (Figuras 23 y 24).

3.14 Efecto del bEDL en la producción de IL-10, TNF- α e IL-6 en sangre total estimulada con LPS .

El tratamiento con LPS indujo significativamente ($P < 0.01$) la producción de IL-10, TNF- α e IL-6. El tratamiento con EDLb indujo moderadamente la producción de IL-10, TNF- α e IL-6 ($P < 0.01$) (Figuras 25, 26 y 27). El tratamiento con EDLb + LPS disminuyo significativamente ($P < 0.01$) la producción de IL-10, TNF- α e IL-6 (Figuras 25, 26 y 27). En sangre total sin tratar, la producción de IL-10, TNF- α e IL-6 no fue significativa ($P > 0.5$) (Figuras 25, 26 y 27). Se encontró diferencia en los diversos tratamientos con respecto a las citocinas a evaluar (IL-10, TNF- α e IL-6 ($P < 0.01$)). Al final de los experimentos se determinó la viabilidad celular mediante el colorante de exclusión azul tripan encontrando aproximadamente un 95 a 98% de viabilidad de las CMNPH.

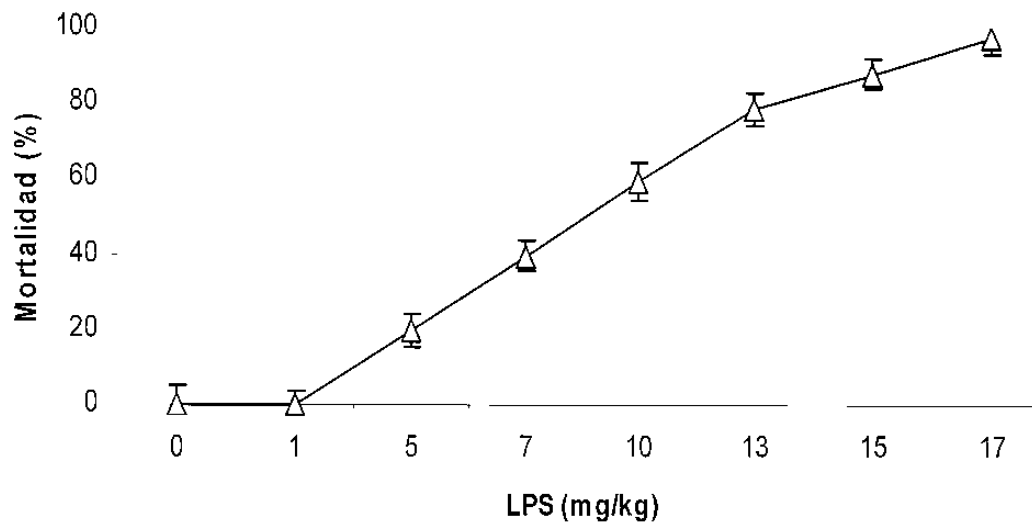


Figura 8. Efecto de el LPS en la mortalidad de ratones. Diferentes grupos de ratones (n=10) fueron tratados i.p. con una dosis de LPS (0, 1, 5, 7, 10, 13, 15, y 17 mg/kg) y la mortalidad fue determinada 72 h más tarde. Los resultados son presentados como porcentajes de mortalidad.

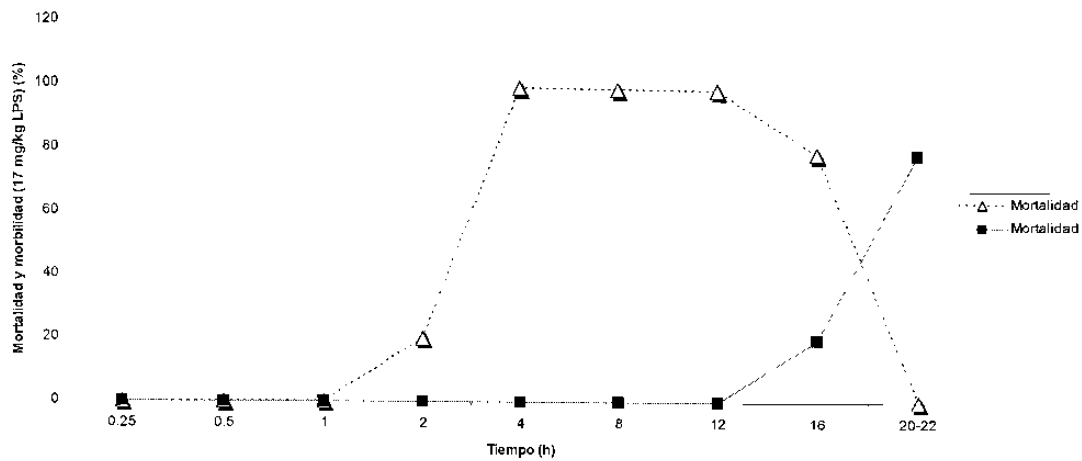
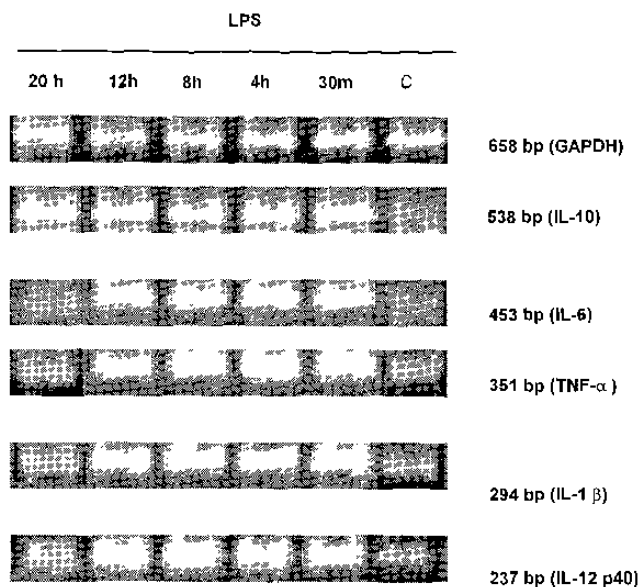


Figura 9. Curva de Mortalidad y Morbilidad inducida por la dosis letal de LPS (17 mg/kg). Ratones Balb/C (n=30) fueron inyectados i.p. con una dosis de 17 mg/kg de LPS y su morbilidad y mortalidad fue monitoreada durante 24 horas. Los resultados son presentados como porcentajes de morbilidad y mortalidad. (La morbilidad fue determinada por los síntomas típicos que incluyen letargia, piloerection, y diarrea.)

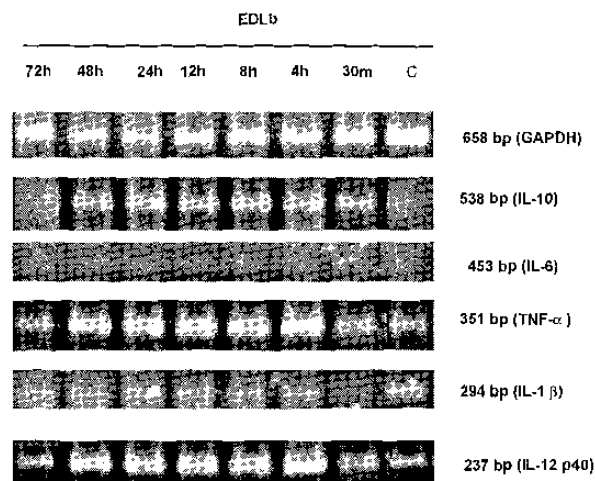


A

Citocinas	Control	30 min	4 h	8 h	12 h	20 h
IL-10	0 ± 0	8.2 ± 0.3**	8.1 ± 0.2**	8.1 ± 0.4**	8.1 ± 0.3**	8.2 ± 0.5*
IL-6	0 ± 0.5	11 ± 0.6**	10 ± 0.3**	9.5 ± 0.2**	10 ± 0.5**	0 ± 0.4
TNF-α	0.7 ± 0.2	17.4 ± 0.3**	18.2 ± 0.3**	16.8 ± 0.2**	9.5 ± 0.5**	0.8 ± 0.5
IL-1β	0.7 ± 0.4	18 ± 0.2**	17.7 ± 0.4**	17.7 ± 0.3**	17.2 ± 0.7**	8.2 ± 0.2*
IL-12p40	0.8 ± 0.5	15 ± 0.2**	15.1 ± 0.3**	16.3 ± 0.4**	17.0 ± 0.2**	2.2 ± 0.1*
GAPDH	1 ± 0.2	1 ± 0.5	1 ± 0.5**	1 ± 0.4	1 ± 0.4	1 ± 0.1

B

Figura 10. Expresión de los genes de citocinas en el shock endotóxico inducido por el LPS. El RNA total fue extraído de los bazo de ratones 30 min, 4, 8, 12, y 20 h después de el tratamiento con LPS (17 mg/kg). El RNA fue analizado para determinar la expresión de el RNAm de las citocinas (IL-10, IL-6, TNF-α, IL-1β, e IL-12p40) mediante RT-PCR, como se ha descrito en materiales y métodos. A) El tamaño y la cantidad de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados empleando bromuro de etidio con luz ultravioleta, y fotografiado. Los datos representan uno de 10 experimentos independientes (bazo); los diez experimentos muestran resultados similares. C significa los ratones sin tratar. B) El nivel de el RNAm en las citocinas fue cuantificado por densitometría y normalizados de acuerdo a la expresión constitutiva de el gen control (GAPDH). La media de los valores de diez experimentos independientes (bazo) ± SD. **P<0.01, *P<0.05 comparados con el ratón control sin tratar.

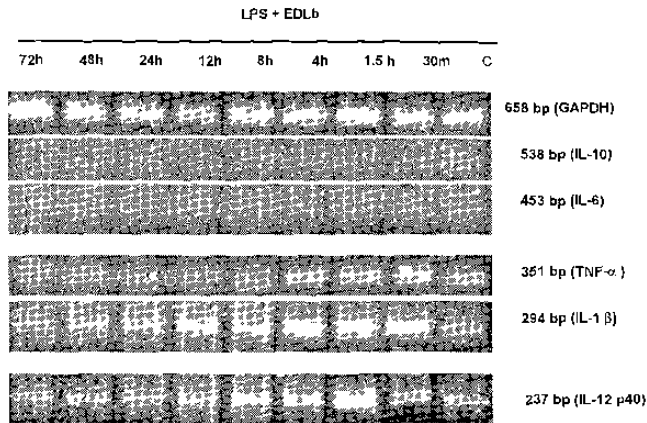


A

Citocinas	Control	30 min	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
IL-10	0 ± 0.2	2.2 ± 0.4**	2.8 ± 0.3**	2.3 ± 0.3**	2.3 ± 0.7**	2.4 ± 0.3**	1.3 ± 0.3**	0 ± 0.5
IL-6	0 ± 0.1	0 ± 0.5	0 ± 0.6	0 ± 0.3	0 ± 0.2	0 ± 0.5	0 ± 0.1	0 ± 0.4
TNF- α	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.5	3.7 ± 0.3*	3.2 ± 0.3*	3.2 ± 0.3*	3.2 ± 0.2*	3.1 ± 0.5*	0.8 ± 0.5
IL-1 β	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.7	1.0 ± 0.2
IL-12p40	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	3.7 ± 0.6*	3.2 ± 0.3*	3.3 ± 0.6*	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.4*	0.9 ± 0.6
GAPDH	1 ± 0.5	1 ± 0.5	1 ± 0.2	1 ± 0.3	1 ± 0.4	1 ± 0.2	1 ± 0.1	1 ± 0.2

B

Figura 11. Expresión de los genes de citocinas en ratones tratados con el EDLb. El RNA total fue extraído de los bazo de ratones 30 min, 4, 8, 12, 24, 48, y 72 h después de el tratamiento con el EDLb (1U). El RNA fue analizado para determinar la expresión de el RNAm de las citocinas (IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1 β , e IL-12p40) mediante RT-PCR, como se ha descrito en materiales y métodos. A) El tamaño y la cantidad de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados empleando bromuro de etidio con luz ultravioleta, y fotografiado. Los datos representan uno de 10 experimentos independientes (bazo); los diez experimentos muestran resultados similares. C significa los ratones sin tratar. B) El nivel de el RNAm en las citocinas fue cuantificado por densitometría y normalizados de acuerdo a la expresión constitutiva de el gen control (GAPDH). La media de los valores de diez experimentos independientes (bazo) \pm SD. **P<0.01, *P<0.05 comparados con el ratón control sin tratar.



Citocinas	Control	30 min	1.5 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
IL-10	0 ± 0.2	0 ± 0.2	0 ± 0.1	0 ± 0.3	0 ± 0.2	0 ± 0.4	0 ± 0.3	0 ± 0.3	0 ± 0.5
IL-6	0 ± 0.2	0 ± 0.5	0 ± 0.3	0 ± 0.6	0 ± 0.3	0 ± 0.2	0 ± 0.5	0 ± 0.2	0 ± 0.2
TNF- α	0.8 ± 0.5	2.4 ± 0.4*	2.1 ± 0.6*	2.2 ± 0.4*	0.2 ± 0.5	0.2 ± 0.7	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.6
IL-1 β	0.6 ± 0.5	3.8 ± 0.4*	3.9 ± 0.5*	3.5 ± 0.2*	3.3 ± 0.4**	3.3 ± 0.3**	2.4 ± 0.3**	2.6 ± 0.7**	0.7 ± 0.2
IL-12p40	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.5	3.2 ± 0.7**	3.1 ± 0.3*	3.5 ± 0.4*	3.2 ± 0.2**	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.5
GAPDH	1 ± 0.5	1 ± 0.5	1 ± 0.4	1 ± 0.2	1 ± 0.3	1 ± 0.4	1 ± 0.2	1 ± 0.1	1 ± 0.2

B

Figura 12. Expresión de los genes de citocinas en el shock endotóxico inducido por el LPS en ratones tratados con el EDLb. El RNA total fue extraído de los bazo de ratones 30 min, 1.5, 4, 8, 12, 24, 48, y 72 h después de el tratamiento con el EDLb (1U) en el shock endotóxico en los ratones inducido por la administración de LPS (17 mg/kg). El RNA fue analizado para determinar la expresión de el RNAm de las citocinas (IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1 β , e IL-12p40) mediante RT-PCR, como se ha descrito en materiales y métodos. A) El tamaño y la cantidad de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados empleando bromuro de etidio con luz ultravioleta, y fotografiado. Los datos representan uno de 10 experimentos independientes (bazo); los diez experimentos muestran resultados similares. C significa los ratones sin tratar. B) El nivel de el RNAm en las citocinas fue cuantificado por densitometría y normalizados de acuerdo a la expresión constitutiva de el gen control (GAPDH). La media de los valores de diez experimentos independientes (bazo) \pm SD. **P<0.01, *P<0.05 comparados con el ratón control sin tratar.

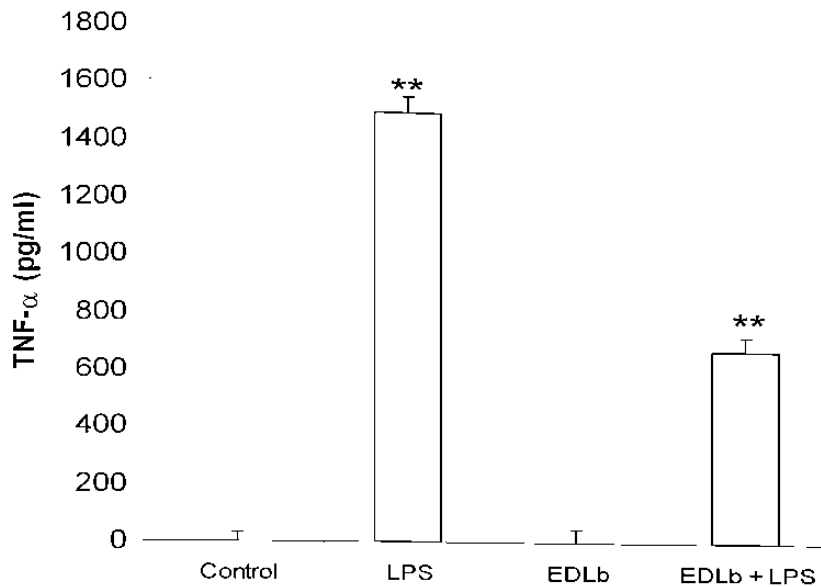


Figura 13. Efecto de el EDLb en la producción de el TNF- α en el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS. Grupos de animales (n=10) control, bDLE, y LPS fueron inyectados i.m. o i.p. con agua libre de pirogenos, EDLb (1 U), o LPS (17 mg/kg), respectivamente. Ratones Balb/C (n=10) fueron inyectados intramuscularmente with EDLb (1 U) 8 h después de el pre-tratamiento con LPS (17 mg/kg) inyectados intraperitonealmente; después de 20 h los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical; la sangre fue colectada, y el suero fue mantenido a -70°C para la cuantificación de citocinas empleando la técnica de ELISA. Los niveles de TNF- α fueron determinados empleando un kit comercial de ELISA para esta citocina (BIOSOURCE INTERNATIONAL, INC. Camarillo, CA. USA). Los kits fueron usados de acuerdo a las especificaciones de el fabricante. A) Media de los valores de diez experimentos independientes (suero) \pm SD. **P<0.01, comparados con ratones control sin tratar.

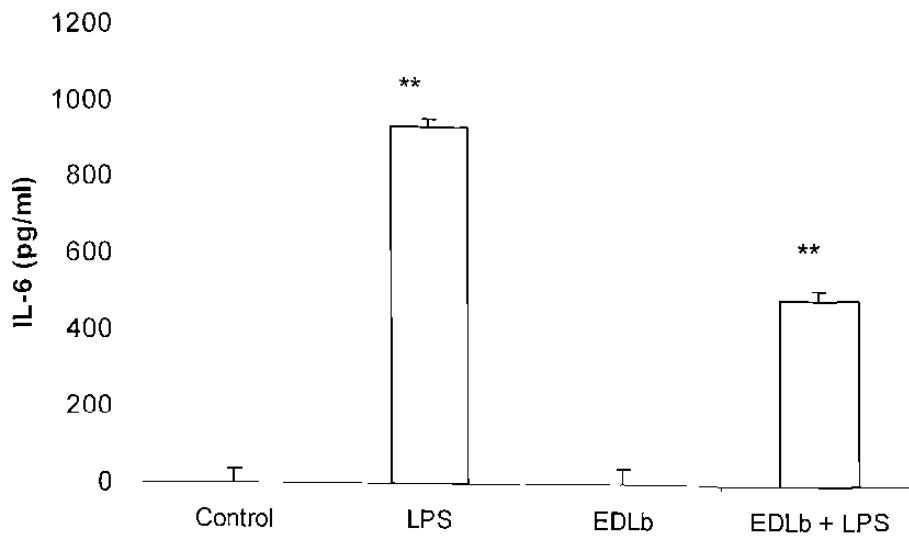


Figura 14. Efecto de el EDLb en la producción de IL-6 en el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS. Grupos de animales (n=10) control, bDLE, y LPS fueron inyectados i.m. o i.p. con agua libre de pirogenos, EDLb (1 U), o LPS (17 mg/kg), respectivamente. Ratones Balb/C (n=10) fueron inyectados intramuscularmente with EDLb (1 U) 8 h después de el pre-tratamiento con LPS (17 mg/kg) inyectados intraperitonealmente; después de 20 h los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical; la sangre fue colectada, y el suero fue mantenido a -70°C para la cuantificación de citocinas empleando la técnica de ELISA. Los niveles de IL-6 fueron determinados empleando un kit comercial de ELISA para esta citocina (BIOSOURCE INTERNATIONAL, INC. Camarillo, CA. USA). Los kits fueron usados de acuerdo a las especificaciones de el fabricante. Media de los valores de diez experimentos independientes (suero) \pm SD. **P<0.01, comparados con ratones control sin tratar.

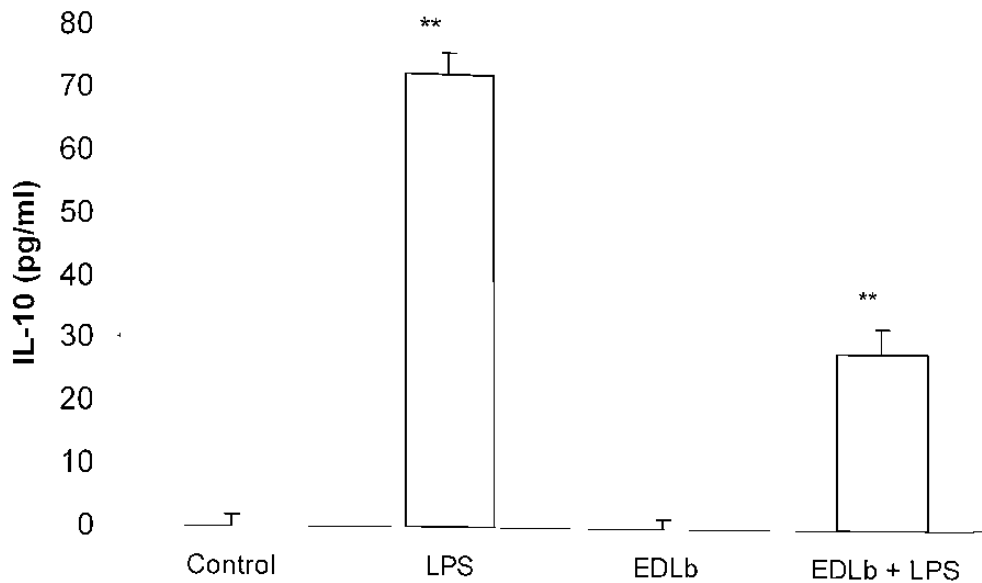


Figura 15. Efecto de el EDLb en la producción de IL-10 en el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS. Grupos de animales (n=10) control, bDLE, y LPS fueron inyectados i.m. o i.p. con agua libre de pirogenos, EDLb (1 U), o LPS (17 mg/kg), respectivamente. Ratones Balb/C (n=10) fueron inyectados intramuscularmente with EDLb (1 U) 8 h después de el pre-tratamiento con LPS (17 mg/kg) inyectados intraperitonealmente; después de 20 h los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical; la sangre fue colectada, y el suero fue mantenido a -70°C para la cuantificación de citocinas empleando la técnica de ELISA. Los niveles de IL-10 fueron determinados empleando un kit comercial de ELISA para esta citocina (BIOSOURCE INTERNATIONAL, INC. Camarillo, CA. USA). Los kits fueron usados de acuerdo a las especificaciones de el fabricante. Media de los valores de diez experimentos independientes (suero) \pm SD. **P<0.01, comparados con ratones control sin tratar.

Tratamientos	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)
Control	0	0
LPS	100	100
EDLb	0	0
EDLb (72 h antes)+LPS	100	100
EDLb (48 h antes) +LPS	100	100
EDLb (24 h antes) +LPS	100	100
EDLb (12 h antes) +LPS	100	100
EDLb (8 h antes) +LPS	100	100
EDLb (4 h antes) +LPS	100	100
EDLb (30 min antes) +LPS	100	100
LPS+EDLb (30 min despues)	100	20
LPS+EDLb (4 h despues)	100	20
LPS+EDLb (8 h despues)	100	10
LPS+EDLb (12 h despues)	100	20

Tabla 8. Efecto de el EDLb en la sobrevivencia de el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS. Grupos de animales (n=10) control, bDLE, y LPS fueron inyectados i.m. o i.p. con agua libre de pirogenos, EDLb (1 U), o LPS (17 mg/kg), respectivamente y monitoreados durante 72 horas. La mortalidad y morbilidad fue monitoreada y expresada como porcentajes. (**grupo sin tratar:** animales control (n=10) fueron monitoreados por 72 horas. **Grupo de EDLb:** Ratones Balb/C (n= 10) fueron inyectados intramuscularmente con EDLb (1 U) y se monitorearon durante 72 h. **Grupo LPS:** Ratones Balb/C (n= 10) fueron inyectados intraperitonealmente con LPS (17 mg/kg) y se monitorearon durante 72 h. **Grupos pretratado con EDLb + LPS:** ratones Balb/C fueron pretratados (inyecciones i.m.) con EDLb (1 U) a los 30 min, 4, 8, 12, 24, 48, y 72 h (n=10 cada grupo); además recibieron inyecciones intraperitoneales de LPS (17 mg/kg) y fueron monitoreados durante 72 h. **Grupos de LPS (pretratados) + EDLb:** ratones Balb/C fueron pretratados con LPS (Inyecciones i.p., 17 mg/kg) y luego inyectados intramuscularmente con EDLb (1 U) en los siguientes tiempos: 30 min, 4, 8 y 12 h (n=10 cada grupo), y monitoreados durante 72 horas.

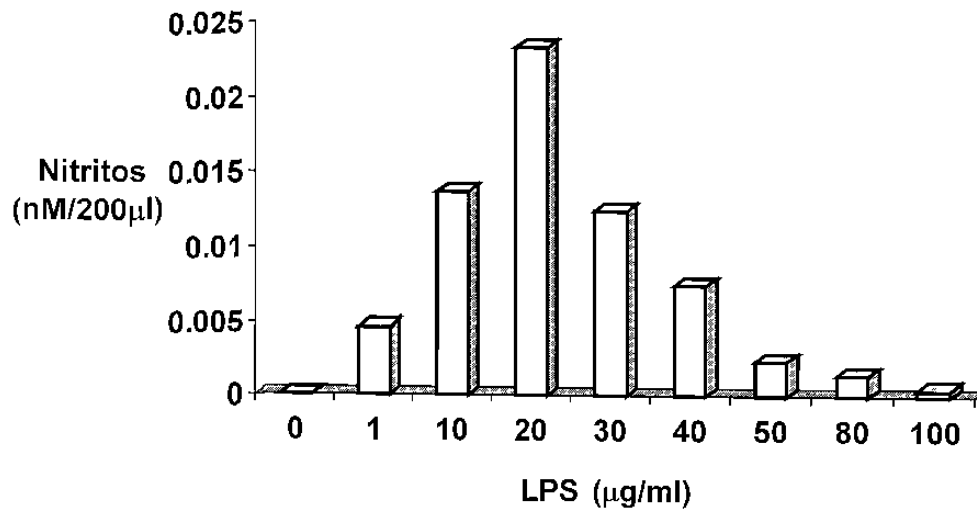


Figura 16. Efecto de el LPS sobre la producción de el oxido nitrico en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una densidad celular de 1.6×10^6 cells/ml en placas de 96 pozos y tratados con LPS (0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, y 100 mg/ml) e incubados en una atmósfera a 37°C con 95% O₂ y 5% CO₂ durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron colectados para dterminar la producción de ON empleando el reactivo de Greiss.

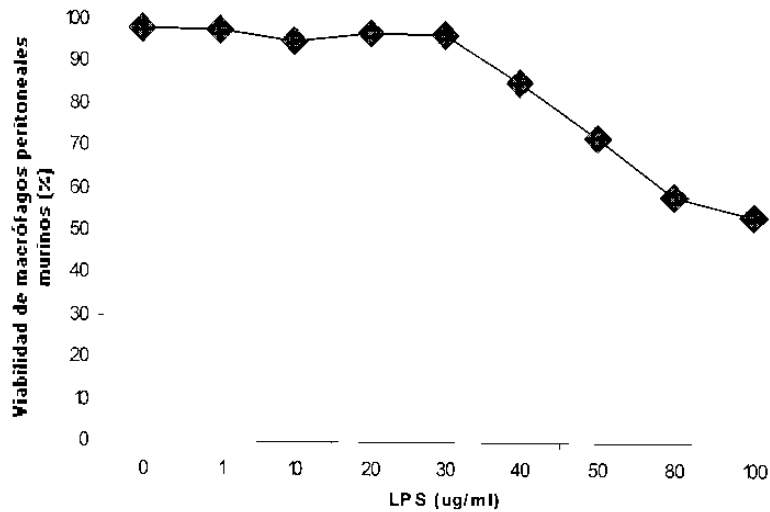


Figura 17. Efecto de el LPS sobre la viabilidad celular en macrófagos peritoneales murinos. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una densidad celular de 1.6×10^6 cells/ml en placas de 96 pozos y tratados con LPS (0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, y 100 mg/ml. Además la viabilidad celular relativa (%) fue determinada por el colorante de exclusión celular azul trypan.

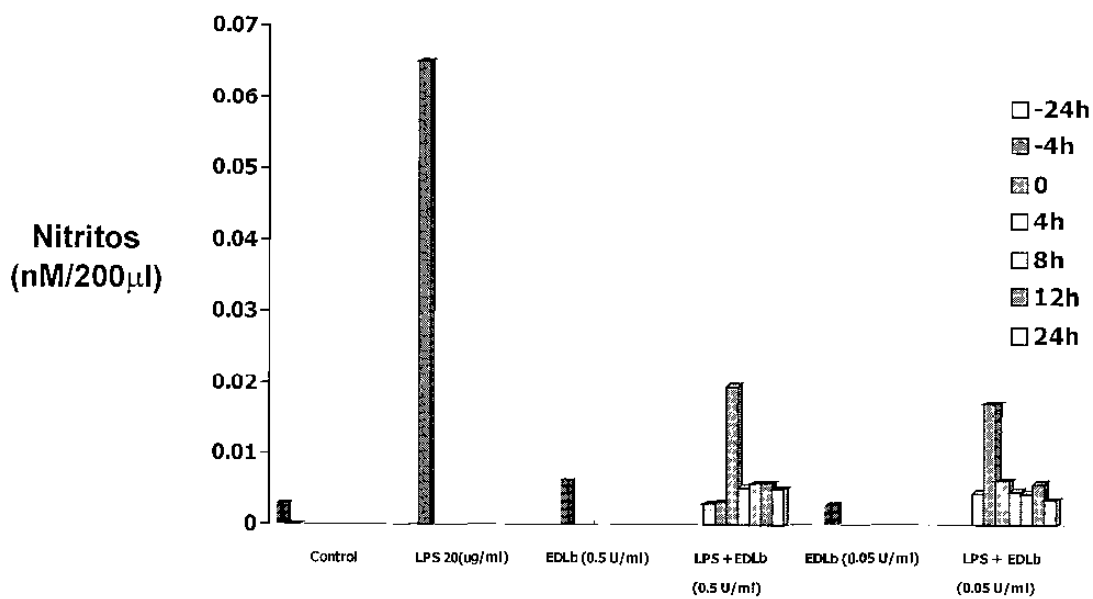


Figura 18. Efecto de el EDLb sobre la producción de el ON en macrófagos peritoneales murinos. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una densidad celular de 1.6×10^6 cells/ml en placas de 96 pozos y tratados con EDLb (0.05 y 0.5 U/ml) durante 4 y 24 h; además, fueron estimuladas con LPS (20 mg/ml) e incubadas a 37°C en una atmósfera a 37°C con 95% O₂ y 5% CO₂ durante 72 horas. También los macrófagos peritoneales murinos fueron estimulados con LPS (20 mg/ml) durante 0, 4, 8, 12, y 24 h; además, fueron tratados con EDLb (0.05 y 0.5 U/ml) e incubados a 37°C en una atmósfera a 37°C con 95% O₂ y 5% CO₂ durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron colectados para la evaluación de el ON mediante el reactivo de Greiss.

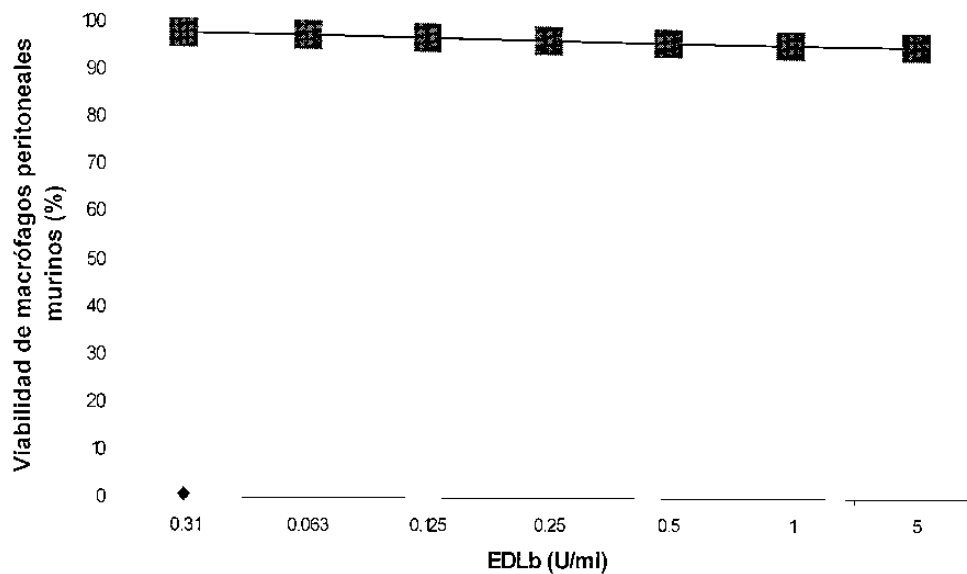


Figura 19. Efecto de el EDLb sobre la viabilidad celular en macrófagos peritoneales murinos. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una densidad celular de 1.6×10^6 cells/ml en placas de 96 pozos y tratados con EDLb (0, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1, y 5 U/ml), durante 72 h. Además, la viabilidad celular relativa (%) fue determinada por el colorante de exclusión celular azul trypan.

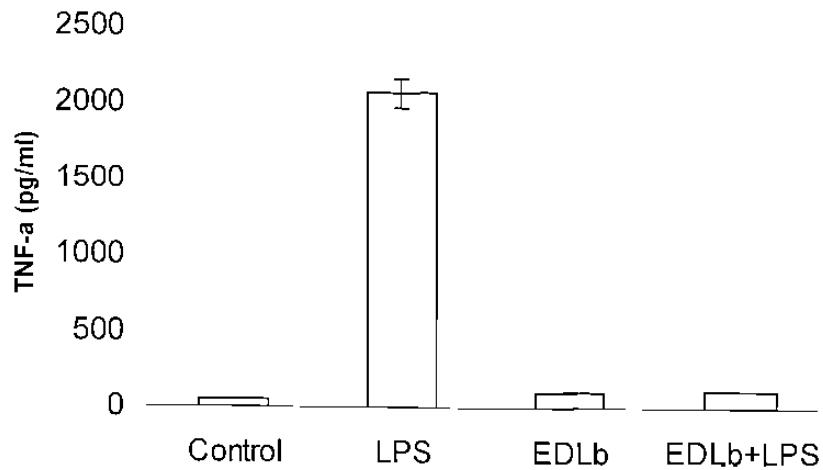


Figura 20. El EDLb modula la producción de el TNF-a en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una concentración celular de 5×10^6 células/pozo y estimulados con LPS (20 mg/ml) y tratados con EDLb (0.5 U/ml) e incubados en una atmósfera a 37°C con 95% O₂ y 5% CO₂ durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron analizados para determinar la producción de TNF-a mediante la técnica de ELISA de acuerdo a las especificaciones de el fabricante.

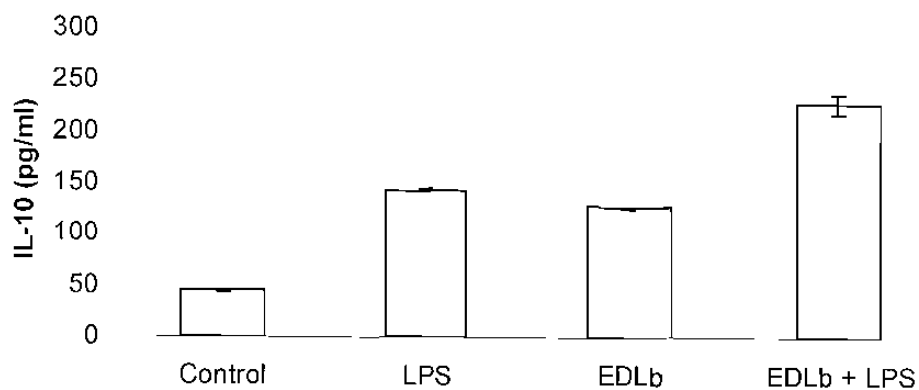


Figura 21. El EDLb modula la producción de IL-10 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una concentración celular de 5×10^6 células/pozo y estimulados con LPS (20 mg/ml) y tratados con EDLb (0.5 U/ml) e incubados en una atmósfera a 37°C con 95% O₂ y 5% CO₂ durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron analizados para determinar la producción de IL-10 mediante la técnica de ELISA de acuerdo a las especificaciones de el fabricante.

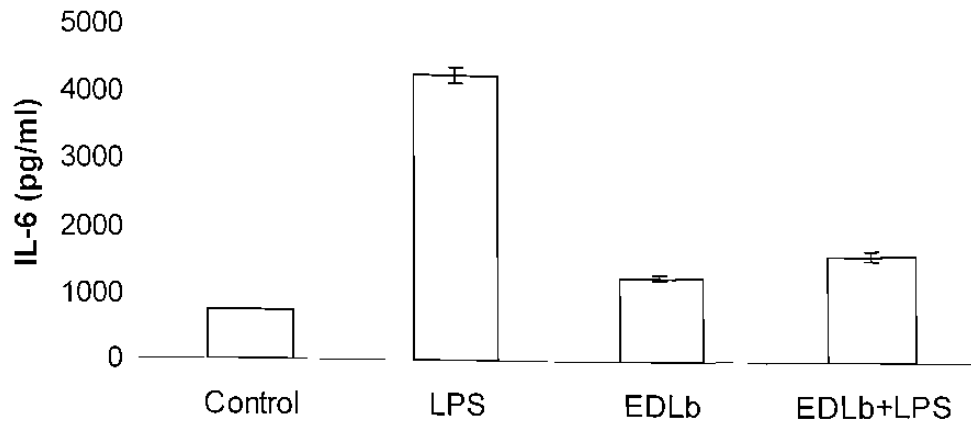


Figura 22. El EDLb modula la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una concentración celular de 5×10^6 células/pozo y estimulados con LPS (20 mg/ml) y tratados con EDLb (0.5 U/ml) e incubados en una atmósfera a 37°C con 95% O_2 y 5% CO_2 durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron analizados para determinar la producción de IL-6 mediante la técnica de ELISA de acuerdo a las especificaciones de el fabricante.

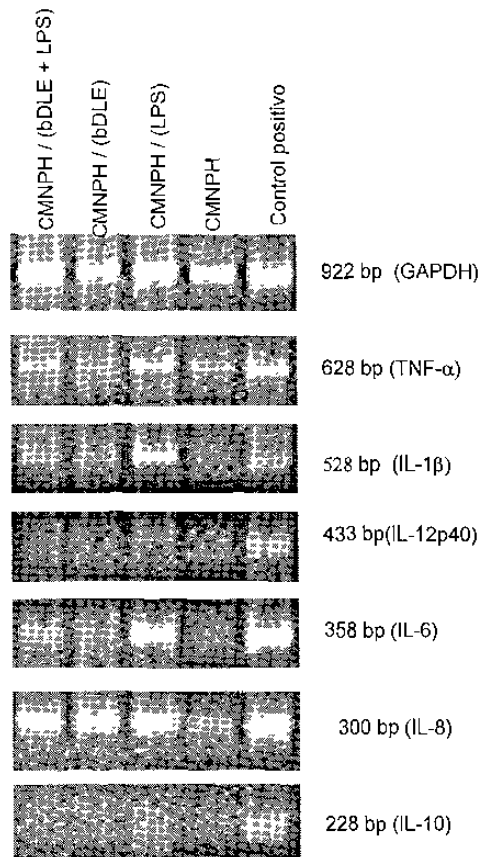


Figura 23. El EDLb modula la expresión de el RNAm de las citocinas pro-inflamatorias en células de sangre humana estimulada con LPS. El RNA total fue extraído de CMNPH de sangre humana sin tartar, estimuladas con LPS (50 ng), EDLb (1U), y LPS (50 ng) + EDLb (1U), incubadas durante 5 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y de 5%CO₂. El RNA fué analizado para determinar la expresión de las citocinas pro-inflamatorias (IL-10, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-1 β , e IL-12p40) mediante RT-PCR, como se describe en materia y métodos. 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 ethidio. Marcadores de peso molecular: control positivo de citocinas de sepsis de humano.

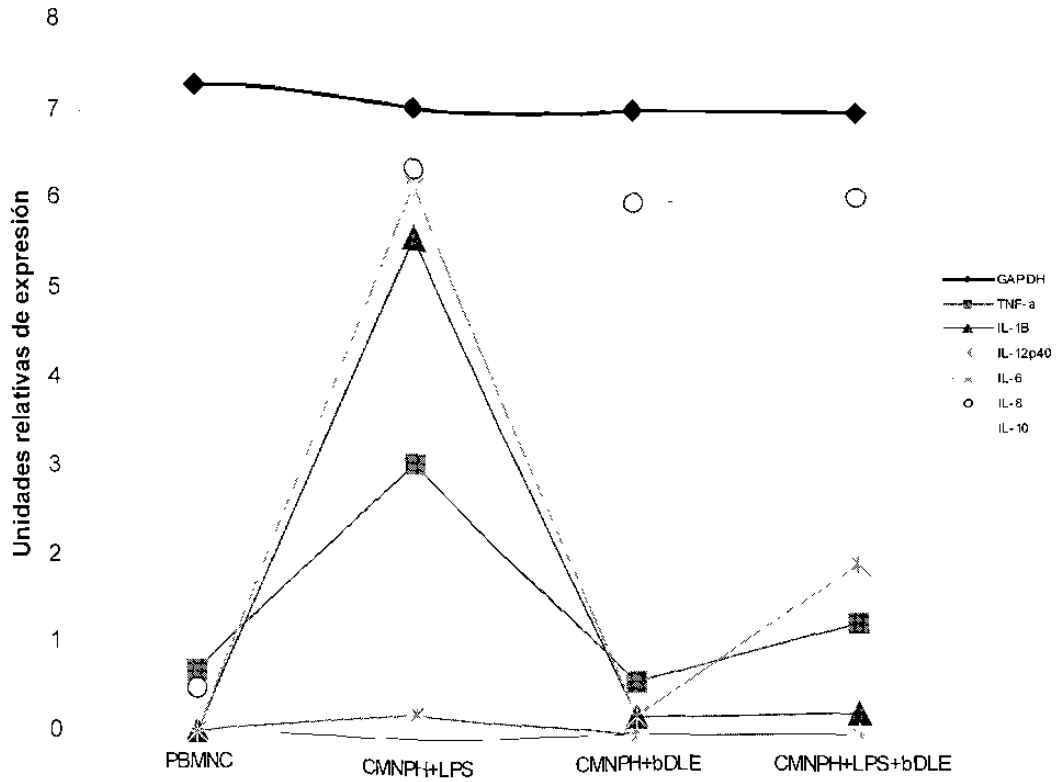


Figura 24. Niveles de expresión de los genes de citocinas en células de sangre humana estimulada con LPS y tratada con EDLb. Total RNA was extracted from untreated, LPS (50 ng), bDLE (1U), and LPS (50 ng) + bDLE (1U) PBMC, El RNA total fue extraído de CMNPH de sangre humana sin tartar, estimuladas con LPS (50 ng), EDLb (1U), y LPS (50 ng) + EDLb (1U), incubadas durante 5 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O2 y de 5%CO2. El RNA fué analizado para determinar la expresión de las citocinas pro-inflamatorias (IL-10, IL-6, TNF-α, IL-8, IL-1b, e IL-12p40) mediante RT-PCR, como se describe en materia y métodos. 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 y cuantificado con un software UVP Labworks Media Cybernetics Gel-Pro Analyzer TM, Maryland U.S.A. Los datos fueron reportados como unidades relativas de expresión.

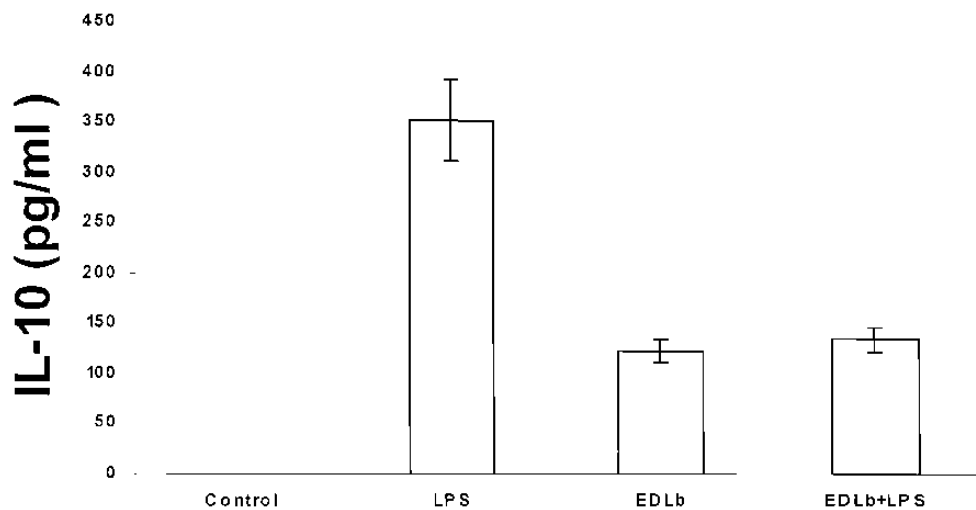


Figura 25. El EDLb modula la producción de IL-10 en células de sangre humana estimuladas con LPS. Las muestras de sangre humana fueron estimuladas con LPS (50 ng), EDLb (1U), and LPS (50 ng) + EDLb (1U). Las muestras de sangre contenidas en tubos fueron colocadas en un rotor e incubadas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%CO₂ durante 5 horas. El plasma fue colectado para la determinación de citocinas mediante ELISA.

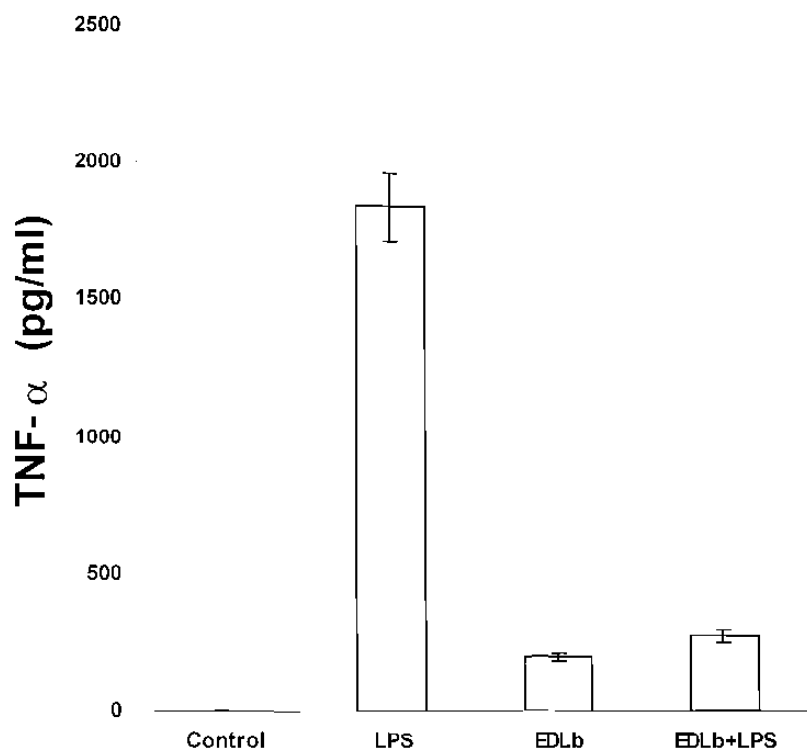


Figura 26. El EDLb modula la producción de el TNF- α en células de sangre humana estimuladas con LPS. Las muestras de sangre humana fueron estimuladas con LPS (50 ng), EDLb (1U), and LPS (50 ng) + EDLb (1U). Las muestras de sangre contenidas en tubos fueron colocadas en un rotor e incubadas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%CO₂ durante 5 horas. El plasma fue colectado para la determinación de citocinas mediante ELISA.

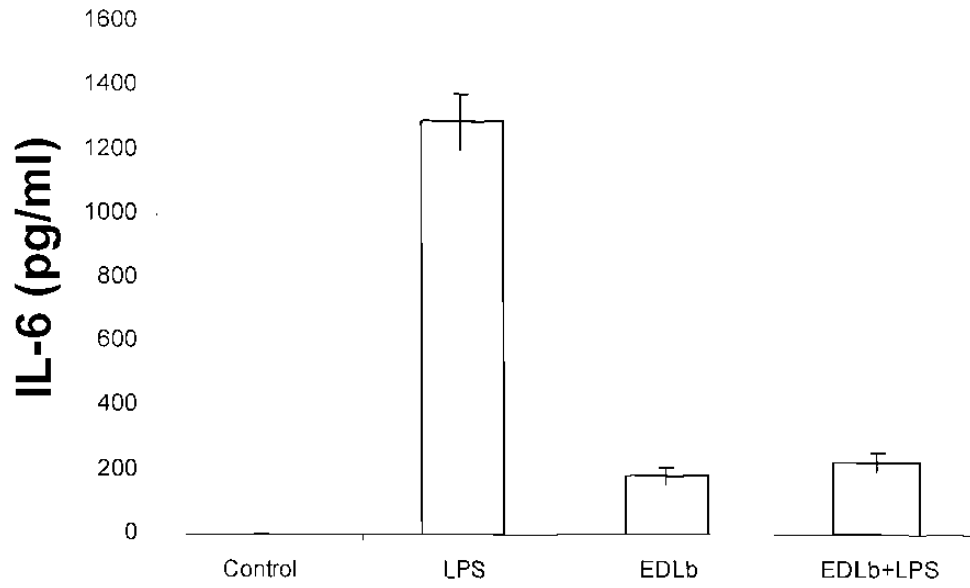


Figura 27. El EDLb modula la producción de IL-6 en células de sangre humana estimuladas con LPS. Las muestras de sangre humana fueron estimuladas con LPS (50 ng), EDLb (1U), and LPS (50 ng) + EDLb (1U). Las muestras de sangre contenidas en tubos fueron colocadas en un rotor e incubadas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%CO₂ durante 5 horas. El plasma fue colectado para la determinación de citocinas mediante ELISA.

CAPITULO 4

DISCUSION

Efecto dosis-respuesta de la administración de el LPS en ratones in vivo

La aplicación de altas dosis de el LPS induce en los ratones un estado semejante al shock séptico (58). Sepsis es una condición muy compleja que involucra una gran variedad de respuestas inflamatorias a nivel local y sistémica (129). Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que todas las dosis de el LPS inducen morbilidad después de su administración en los modelos animales. La severidad de los síntomas y la sobrevivencia fueron dependientes de la dosis de el LPS empleada (Figura 1). La administración de el LPS a una dosis de 17mg/kg indujo el 100% de moratlidad en un período no mayor a 22 horas (Figura 9 y Tabla 9). Víctor V.M. et al., 2000 y Moreira et al., 1997, demostraron de igual manera que la morbilidad y mortalidad de los ratones fue dependiente de la dosis administrada. La muerte inducida por el LPS en el torrente sanguíneo es debida a una gran variedad de respuestas fisiopatológicas en varios sistemas de órganos y tejidos lo cual conduce a fallos circulatorios y daño a tejidos inducidos por leucocitos y activación del sistema de coagulación e inmunológico los

cuales parecen ser determinantes críticos en el desarrollo de falla múltiple de órganos y la subsecuente muerte, es sabido que el TNF- α , es el principal mediador que da inicio al desarrollo de todos estos eventos (48).

EDLb protege a ratones de la letalidad de el LPS

El shock séptico es el resultado de una descontrolada liberación de mediadores con actividad pro-inflamatoria en respuesta a una infección con bacterias Gram-negativas o en respuesta a endotoxinas (12). Con la finalidad de determinar si el EDLb protegía a los ratones de la letalidad inducida por el LPS, se formaron varios modelos de el shock endotóxico empleando la dosis letal de 17 mg/kg *vía i.p.* del LPS y se trataron con una dosis de el EDLb en diversos tiempos según el modelo (Tabla 9) de estos resultados se determinó que a pesar de la letalidad inducida por la aplicación de el LPS en los diferentes modelos del shock endotóxico, la administración de el EDLb es capaz de proteger de la muerte mas no de la morbilidad inducida por el LPS. Efectos similares han sido reportados en el tratamiento de pacientes con shock séptico y enfermedades relacionadas tratadas con el EDLb (83,113).

La administración de LPS *in vivo* induce la expresión y producción de citocinas pro y anti-inflamatorias

Nuestros resultados demuestran que la administración de el LPS en los ratones inducen una marcada sobre-expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 (Figura 10) y un incremento en suero de la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 (Figuras 6, 7 y 8 respectivamente). Estos hallazgos concuerdan con múltiples estudios que demuestran, que el LPS es un agente que induce la liberación de estas citocinas *in vivo* e *in vitro* (12, 26, 48, 53, 58, 72, 76, 90, 99, 106, 115, 125, 129, 130, 139). Los efectos patofisiológicos de sepsis severa, shock séptico y otros síndromes relacionados son una consecuencia de la producción descontrolada de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 entre otras (122, 134). Numerosos estudios de laboratorios en modelos animales demuestran que la inhibición de TNF- α o IL-1 β , protegen en contra de los efectos dañinos debido a la exagerada producción de citocinas mejorando significativamente la tasa de sobrevivencia (95).

La administración de EDLb disminuye la expresión y producción de citocinas proinflamatorias en ratones tratados con LPS

El tratamiento con EDLb después de el pretratamiento con LPS modula la expresión de los genes de citocinas pro-inflamatorias

(suprimiendo IL-6 e IL-10 y disminuyendo IL-1 β , IL-12 y TNF- α) (Figura 12) y disminuye en el suero la producción de citocinas de TNF- α , IL-6 e IL-10 (Figuras 13, 14 y 15 respectivamente). Estos datos se correlacionan con los estudios realizados por Ojeda, et al. 1996 (104), en donde el tratamiento con EDL disminuyó la producción de el TNF- α en leucocitos humanos estimulados con LPS *in vitro*. La IL-10 inhibe la producción de el TNF- α a nivel periférico y en el cerebro (cuando es inyectado sistémicamente) (33). La IL-6 inhibe la síntesis de el TNF *in vitro e in vivo*, se ha reportado que en ratones carentes de IL-6 cuando son inyectados con LPS, producen altos niveles en suero de el TNF- α , sugiriendo que la IL-6 endógena puede participar en la regulación negativa de la producción de el TNF- α (48). Por otra parte, el incremento en la morbilidad y mortalidad de sepsis neonatal no parece ser debida a una inadecuada respuesta de IL-10, debido a que los recién nacidos pueden producir IL-10 en altas cantidades durante la sepsis (21, 28).

En ratones, la IL-10 protege en contra de la letalidad inducida por la endotoxemia y el shock inducido por la enterotoxina B *staphylococco* (SEB)³ (76). Otros estudios sugieren que agentes no tóxicos tales como AS101, con la capacidad de inhibir IL-10 y estimular la función de macrófagos puede tener efecto en el tratamiento de sepsis cuando son administrados durante la fase de sepsis caracterizada por

inmunosupresión. En clínica, se ha observado que algunos pacientes con sepsis están inmunocomprometidos por la administración de esteroides, neutropenia y deficiencias inmunológicas genéticas o adquiridas y pueden tener una respuesta inflamatoria inadecuada a la infección. El aumentar los mecanismos de defensa del huésped puede favorecer la depuración de las bacterias y sus toxinas y reducir el daño tisular.

El LPS induce la producción de TNF- α , IL-6, IL-10 y NO en macrófagos peritoneales murinos *in vitro*.

Los macrófagos de tejidos participan en la generación de la respuesta endotóxica, la producción de el óxido nítrico y la secreción de el TNF- α producida por estas células han sido propuestos como los mediadores primarios de este evento. Pocos minutos de exposición al LPS son suficientes para iniciar la máxima unión y activación de los monocitos (83). Nuestros resultados demuestran que el LPS en macrófagos peritoneales murinos *in vitro* indujo un gran incremento en la producción de nitritos (Figura 16 y 17), TNF- α , IL-10 e IL-6 (Figuras 20, 21 y 22). El LPS activa la transcripción y la subsecuente liberación de citocinas incluyendo TNF- α , a través de una vía de señalización mediada por receptores (90). Durante una respuesta inflamatoria sistémica al LPS,

la liberación no regulada de TNF- α dentro de la circulación da como resultado disfunción circulatoria, incremento en la permeabilidad endotelial y disfunción de órganos múltiples (99). La liberación del NO inducida por el LPS es mediada a través del TNF- α o INF- γ (90).

EDLb disminuye la producción de TNF- α , IL-6 y NO en macrófagos peritoneales murinos in vitro estimulados con LPS.

En macrófagos peritoneales murinos incubados con EDLb durante 24 y 4 horas y luego estimuladas con LPS y en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS y tratados con EDLb (0.5 y 0.05 U/ml) a diferentes tiempos (0,4,8,12 y 24 h) y posteriormente incubados durante 72 horas. Se observó un incremento en la producción de la IL-10 (Figura 21) y una disminución en la producción de el TNF- α e IL-6 (Figuras 20 y 22 respectivamente) además de una disminución significativa en la producción de nitritos (Figura 18). Una citocina clave que parece restaurar este balance durante la sepsis es la IL-10 (24). Varios estudios demuestran que la IL-10 inhibe la producción de IL-1, TNF- α e IL-6 (141) y óxido nítrico (41) en macrófagos activados por LPS. Múltiples estudios apoyan que la IL-10 es una citocina pleiotrópica que controla los procesos inflamatorios, suprimiendo la producción de citocinas pro-inflamatorias, a nivel transcripcional por el NF- κ B (9). La IL-6 tiene actividad pro y anti-

inflamatoria (13). Esta citocina participa en el control de las citocinas pro-inflamatorias pero no anti-inflamatorias, además las actividades anti-inflamatorias de IL-6 no pueden ser sustituidas por la IL-10 u otras citocinas (59,128). Muchas condiciones inflamatorias están asociadas con la producción de grandes cantidades de NO, producidas por iNOS, con los subsecuentes efectos citotóxicos, iNOS, primero identificado en los macrófagos puede ser expresado en cualquier tipo de células (93, 122).

La inducción de la iNOS puede ser inhibida por numerosos agentes: glucocorticoides, trombina, factor de activación del macrófago, factor de crecimiento derivado del tumor β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-4, IL-8, IL-10 e IL-13. La inducción de la iNOS puede tener efectos protectores o tóxicos, los factores que dictan las consecuencias de la expresión de la iNOS dependen de el tipo de daño, de el tejido, de el nivel y de la duración de la expresión de la iNOS, y probablemente el estatus de óxido reducción de el tejido. La inducción de la iNOS en células endoteliales produce daño endotelial inhibiendo la respiración celular en macrófagos y células vasculares del músculo liso; este proceso conduce a disfunción y muerte celular (123).

Probablemenete la inducción en macrófagos peritoneales de una ligera producción de citocinas (Figuras 20, 21 y 22) y nitritos (Figura 18) mediante el EDLb encontrada en este estudio revele la participación de estas citocinas en funciones inmunológicas estimulatorias no

relacionadas a actividades. Se ha propuesto que una terapia efectiva en el síndrome séptico puede ser la manipulación de la respuesta inflamatoria y la restauración del balance entre las citocinas pro y anti-inflamatorias. Este estudio proyecta un nuevo papel de el EDLb en controlar la producción de el TNF- α , IL-6 y óxido nítrico posiblemente a través de la producción de IL-10 lo cual puede ser importante en el desarrollo terapéutico en contra de enfermedades mediadas por la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias y de el óxido nítrico tales como el shock endotóxico, diabetes entre otras.

LPS induce la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias en sangre total periférica humana.

Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en cuidados intensivos es la causa de morbilidad y mortalidad en la población hospitalaria post-quirúrgica, neonatal y geriátrica debida al síndrome séptico. Este síndrome ha demostrado ser resistente a los métodos clásicos de terapias. Las endotoxinas conducen a la activación de un sistema de amplificación que inicia la producción de mediadores, citocinas y quimioquinas especializados (1). El shock séptico es la consecuencia de una sobreactivación de las células inmunológicas de el huésped por productos bacterianos. En respuesta a estos compuestos, las células de el sistema inmune y en particular la línea monocítica,

producen cantidades copiosas de mediadores inflamatorias. La respuesta biológica de estos mediadores pro y anti-inflamatorios determinan el pronóstico de el proceso inflamatorio. El TNF- α e IL-1 son considerados como los mas importantes mediadores de la respuesta inflamatoria (12).

Ensayos experimentales demuestran que el bloqueo de estas citocinas en animales inoculados con LPS o con bacterias Gram-negativas han probado que el TNF e IL-1 contribuyen al desarrollo de hipotensión, daño en tejido y muerte en estos modelos. Por otra parte, se ha demostrado que el bloqueo de TNF- α o IL-1 en la clínica de sepsis tienen solo efectos marginales (14). Nosotros observamos que el estímulo con LPS en sangre total *in vitro*, indujo una fuerte expresión de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-12p40, IL-6 e IL-10 e incremento la expresión de el TNF- α e IL-8 (Figura 23 y 24 respectivamente), encontrando además un marcado aumento en la producción de el TNF- α , IL-6 e IL-10 (Figuras 25, 26 y 27 respectivamente). Los macrófagos humanos son mucho más sensibles al LPS que los macrófagos murinos, por eso cantidades pequeñas (picogramos) de endotoxina son suficientes para disparar la secreción de el TNF- α (25, 71), IL-1(75), IL-6 (133), IL-8 (71), IL-12 (138), intermediarios de el nitrógeno y oxígeno reactivos, precoagulantes, y moléculas de adhesión celular por estas células. El desencadenamiento incontrolado de estos factores en respuesta al LPS,

contribuyen al colapso de el sistema circulatorio, coagulación intravascular diseminada y a la muerte de el individuo. Un mecanismo común intracelular responsable de la expresión de los genes de el shock séptico en monocitos y macrófagos involucra la activación de el NF- κ B (101).

El tratamiento con EDLb en sangre total periférica humana estimulada con LPS disminuye la expresión y la producción de citocinas proinflamatorias.

Nosotros encontramos que el tratamiento con el EDLb, a sangre total estimulada con el LPS, disminuyó la expresión de el mRNA de el TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 p40 e inhibió el RNAm de IL-10 (Figuras 23 y 24). La producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-10, TNF- α e IL-6 también fue inhibida (Figuras 25, 26 y 27 respectivamente). Estos efectos de disminución de la expresión y producción de las citocinas pro-inflamatorias probablemente pueda explicarse debido a que el EDLb es un extracto biológico con amplio efecto sobre el sistema inmune. Otros estudios han demostrado que la producción de el TNF- α disminuyo con el tratamiento de el EDL en leucocitos humanos estimulados con el LPS (104). Hemos demostrado su efecto terapéutico en el tratamiento de pacientes neonatos con shock septico (113). El TNF- α , posee

propiedades pro-inflamatorias e inmunoregulatorias; es la primera citocina que aparece en el plasma después de una endotoxemia o infección e induce la síntesis y liberación de otros mediadores, tales como IL-1 e IL-6, generando una cascada de citocinas (133). La IL-6 es una citocina pleiotrópica que es comúnmente producida en los tejidos y liberada dentro de la circulación en todas las disfunciones homeostáticas incluyendo endotoxemia, trauma, e infecciones agudas; la IL-6 endógena juega un papel anti-inflamatorio crucial en respuestas inflamatorias sistémicas y locales por controlar el nivel de citocinas inflamatorias pero no el de las citocinas anti-inflamatorias (120). La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria (94), la cual participa en la regulación de la cascada inflamatoria vía regulación negativa de la producción de las moléculas pro-inflamatorias (23, 24, 101)

Los recién nacidos pueden producir IL-10 en grandes cantidades durante un cuadro séptico incrementando la morbilidad y mortalidad, debido a que esta citocina liberada en exceso conduce a inmunosupresión sistémica (28, 89). En este estudio el estímulo por el LPS y el tratamiento con el EDLb, así como el tratamiento con LPS + EDLb, incrementaron la expresión de la IL-8 (Figuras 23 y 24). Datos similares fueron encontrados por Leenen et al., (1993), en donde el tratamiento con pentoxifilina a chimpances inoculados con LPS (shock endotóxico) inhibió la liberación de el TNF- α e IL-6 inducidas por la

endotoxina, la liberación de la IL-8 no fue inhibida de manera significativa por este tratamiento (79). Se ha demostrado que la administración de la IL-8 recombinante humana a primates sanos en una sola inyección *i.v.* o mediante infusión *i.v.* continua, no indujo daños metabólicos y hemodinámicos o el daño múltiple en órganos observado durante el síndrome séptico (142).

Efecto de el tratamiento con EDLb a sangre total periférica humana

Observamos que el tratamiento con el EDLb en sangre humana, indujo la expresión de la IL-1 β e IL-6, e incremento la expresión de el RNAm de la IL-8, sin afectar la expresión de el RNAm de el TNF- α , IL-12 e IL-10 (Figuras 23 y 24). Además, incremento ligeramente la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-10, TNF- α e IL-6 (Figuras 25, 26 y 27).

Nosotros proponemos que la aplicación en pacientes de el EDLb restablece la homeostasis de el organismo actuando como un inmunomodulador debido al funcionamiento biológico que ejercen estas citocinas sobre el sistema inmune. Los efectos de la IL-1 son múltiples (inmunomodulación, inflamación, cicatrización, hematopoyesis, metabolismo y el sistema endocrino). La IL-1 tiene efecto en el tratamiento de el cáncer, incluyendo actividad antiproliferativa directa en contra de ciertas líneas celulares tumorales humanas y varias líneas de

tumores murinos, en la activación de células efectoras *in vitro*, induce necrosis hemorrágica y en la inhibición de la angiogénesis de el tumor y en la inducción de citocinas secundarias que pueden tener actividades antiproliferativas e inmunoestimuladoras. La IL-1 protege y restaura la médula ósea del daño inducido por la radiación o quimioterapia; puede estimular la proliferación de progenitores multipotenciales de células madre de la médula ósea en presencia de otros factores estimuladores de la colonia. (161,112). La IL-6 es un factor de diferenciación de células B *in vivo* e *in vitro* y puede funcionar como un factor de diferenciación de células T, también induce la proliferación de timocitos y probablemente participa en el desarrollo de células T tímicas (118). La IL-10 regula el crecimiento y/o diferenciación de las células B, NK, células T cooperadoras y citotóxicas, células dendríticas, granulocitos, keratinocitos y células endoteliales. La IL-10 también participa en la diferenciación y funcionamiento de las células T, y en el control de las respuestas inmunes y tolerancia *in vivo*, es también un coestimulador para el crecimiento de timocitos maduros e inmaduros y funciona como un factor de diferenciación de células T citotóxicas (89, 91). Se ha demostrado que el TNF- α , participa en la hematopoyesis, reproducción, inflamación y protección en contra de infecciones del organismo (1). Una dinámica y un balance deben de existir entre las citocinas pro-inflamatorias y los componentes anti-inflamatorios de el sistema inmunológico. El efecto

neto de cualquier citocina depende de el tiempo de su liberación, de el medio ambiente local en el cual actúan, de la presencia de elementos sinérgicos o competitivos, de la densidad de el receptor de citocinas, y de la respuesta de el tejido a cada citocina, los disturbios de esta red regulatoria de citocinas por el medio ambiente, genética o gérmenes microbianos pueden dar como resultado consecuencias perjudiciales al organismo (105). Aunque $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12p40 , IL-8 e IL-10 son requeridas para una respuesta inmune normal, la sobreexpresión de estas citocinas tiene severas consecuencias patológicas (56). La intensa activación de la respuesta sistémica normal, como sucede en sepsis y traumas puede inducir una inmunosupresión inmunológica (94). Debido a las propiedades de el EDLb de modular los niveles de el $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 , IL-1 ,e IL-10 , nosotros proponemos su empleo como inmunomodulador el cual puede ser de beneficio clínico en enfermedades que cursen con desbalance de estas citocinas tales como síndrome séptico, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria de intestino y diabetes.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1.- El extracto dializable de leucocitos bovino (EDLb) incrementa la sobrevivencia de los modelos experimentales de el shock endotóxico murino inducidos por LPS *in vivo*, modulando la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias: suprimiendo la IL-10 e IL-6 y disminuyendo IL-10, TNF- α e IL-12p40; y también disminuyendo la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-10, TNF- α e IL-6.

2.- El extracto dializable de leucocitos bovino (EDLb) modula la producción de las citocinas pro-inflamatorias: disminuyendo la producción de el TNF- α e IL-6, incrementando la producción de la IL-10; y disminuye la producción del óxido nítrico en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*.

3.- El extracto dializable de leucocitos bovino (EDLb) modula la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias: disminuyendo TNF- α IL-1 β e IL-6, suprimiendo la IL-10 e IL-12p40, sin afectar IL-8; y también disminuyendo la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-10, TNF- α e IL-6 en sangre total humana estimulada con LPS *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal B. B. and Natarajan, K. Tumor necrosis factors: Developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.* 7: 93-124. (1996).
2. Aggarwal, B.B. and Vilcek, J. (eds) Tumor necrosis factor: structure, function, and mechanism of action. Marcel Dekker Inc. (1992).
3. Ahuja, S.K. and Murphy, P.M. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 271: 20545-20550. (1996).
4. Akashi, K., Tanaka, S., Okubo, Y., Yamaguchi, H. and Tanaka, M. Clinical use of leukocyte dialysate (Transfer Factor), in Osaka area of Japan. *Immunobiology of Transfer Factor.* 12: 279-291. (1983).
5. Ameredes, B.T., Zamora, R., Gibson, K.F., Billiar, T.R., Dixon-McCarthy, B., Watkins, S. and Calhoun, W.J. Increased nitric oxide production by airway cells of sensitized and challenged IL-10 knockout mice. *J. Leukoc. Biol.* 70: 730 - 736. (2001).
6. Amura, R. C., Silverstein, R. and Morrison, D.C. Mechanisms involved in the pathogenesis of sepsis are not necessarily reflected by in vitro cell activation studies. *Infection and Immunity.* 11: 5372-5378. (1998).
- Anguita, J., Persing, D. H., Rincón, M., Barthold, S. W. and Fikrig, E. Effect of Anti-Interleukin 12 Treatment on Murine Lyme Borreliosis. *J. Clin. Invest.* 97: 1028-1034. (1996).
8. Apella, E. Determination of the primary structure of NAP-1/IL8 and a monocyte chemoattractant protein, MCP-1/MCAF. *Progress in Clinical and Biological Research.* 349: 405-17. (1990).
9. Arndt, J. G., Schottelius, M. W., Sartor, M.R.B. and Baldwin, A.S. Interleukin-10 Signaling Blocks Inhibitor of B Kinase Activity and Nuclear Factor B DNA Binding. *J. Biol. Chem.* 274: 31868 - 31874. (1999).

10. Ashorn, R.G.I. and Krohn, K.J.E. The effects of immune and nonimmune dialyzable leucocyte extracts on KLH and HCH reactivity in unprimed human recipients: A double blind study. *Immunobiology of Transfer Factor*. 7:311-327. (1981).
11. Banner, D.W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNFbeta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73: 431-45. (1993).
12. Baron, R. Pathophysiology of septic shock and implications for therapy. *Clin.Pharmacol.* 12: 8298-8306. (1993).
13. Barton, E., Beverly and Jackson V. J. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide -galactosamine septic shock model. *Infection and Immunity*. . 4:1496-1499. (1993).
14. Beutler, B., Milsark, I.W. and Cerami, A.C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science (Wash. DC)*. 229: 869-871. (1985).
15. Bonavida, B. and Granger, G. (eds) Tumor necrosis factor: structure, mechanisms of action, role in disease and therapy. *Biotherapy* 3: 103-11. (1991).
16. Borkowsky, W. and Lawrence, H.S. Effects of human leucocyte dialysates containing transfer factor in the direct leucocyte migration inhibition (LMI) assay. *Journal of Immunology*. 123 :1741-47. (1979).
17. Borkowsky, W. and Lawrence, H.S. Effects of human leucocyte dialysates containing transfer factor in the direct leucocyte migration inhibition (LMI) assay. *Journal of Immunology*. 123: 1741-47. (1979).
18. Borowsky, W., Suleski, P., Bhardwaj, N. and Lawrence, H.S. Antigen-specific activity of murine leucocyte dialysates containing transfer factor on human leukocytes in the leukocyte migration inhibition (LMI) assay. *The journal of Immunology*. 126: 80-82. (1981).

19. Burger, D.R., Vanderbark, A.A., Daves, D., Anderson, W.A., Vetto R.M., Finke, P. Human transfer factor: fractionation and biologic activity. *The Journal of Immunology*. 117: 789-796. (1976).
20. Camussi, G. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Biochemistry*. 202: 3-14. (1991).
21. Cassatella, M.A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M. and Constantin, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 β in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* . 178:2207. (1993).
22. Clore, GM and Gronenborn AM NMR and X-ray analysis of the three-dimensional structure of interleukin-8. *Cytokines*. 4: 18-40. (1992).
23. Cory M. H.M.L., Steinhauser, H. S. and Kunkel, S.L. Therapeutic Effects of Nitric Oxide Inhibition during Experimental Fecal Peritonitis: Role of Interleukin-10 and Monocyte Chemoattractant Protein . *INFECTION AND IMMUNITY*. 66: 650-655. (1998).
24. Daftarian, P.M., Kumar, A., Kryworuchko, M. and Diaz-Mitoma, F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol*. 157: 12 - 20. (1996).
25. Dankesreiter, S., Hoess, A. and Miethke, T. Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF- α production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J. Immunol*. 164: 4804 - 4811. (2000).
26. Davenpeck, K. L., Zagorski, J., Schleimer, R.P. and Bochner, B.S. Lipopolysaccharide-induced leucocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *The Journal of Immunology*, 1998. 161: 6861-6870.

27. Davis, J.M. Structure of human tumor necrosis factor alpha derived from recombinant DNA. *Biochemistry*. 26: 1322-1326 (1987).
28. De Bont, S.J.M., Kimpen, J.L.L., Limburg, P.C., Okken, J.B.A. and De Leij, L.F.M.H. Increased interleukin-10 plasma concentrations during neonatal sepsis. *Immunology & Infectious Diseases*. 6: 49-52. (1996).
29. De Hass, C. J.C., Zee, R. V. D., Trouw-Benaissa, B., Kessel, K. P. M., Kok, V. J. and Strijp, J.A.G. Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Synthetic peptides derived from serum amyloid P component neutralize LPS. *Infection and Immunity*. 6: 2790-2796. (1999).
30. Deis, B., Voisin, L., Contrepolis, M., Arnal, M., Rose, F. and Obled, C. A Sustained Rat Model For Studing The Long-Lasting Catabolic State Of Sepsis. *Infection and Immunity*. 3:1079-1085. (1999).
31. Dennis, D. T., Miriam, A., Joost, J. O., Dan, L. L. and William, J. M. T Lymphocyte Recruitment by Interleukin-8 (IL-8) . IL-8-induced Degranulation of Neutrophils Releases Potent Chemoattractants for Human T Lymphocytes Both In Vitro and In Vivo. *J. Clin. Invest*. 97: 1931-1941. (1996).
32. Di Santo, E., Alonzi, T., Poli, V., Fattori, E., Toniatti, C., Sironi, M., Castagnoli-Ricciardi, P. and Ghezzi, P. Differential effects of IL-6 on systemic and central production of TNF: A study with IL-6 deficient mice. *Cytokine*. 9: 300-306. (1997).
33. Di Santo, E., Sironi, M., Pozzi, P., Gnocchi, P., Isetta, A.M., Delvaux, A., Goldman, M. and Ghezzi, P. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1 β production in the brain without affecting the activation of the hypothalamus-pituitary adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 2:149-154. (1995).
34. Downey, J. S., Han, J. Celular activation mechanisms in septic shock. *Frontiers in Bioscience*. 3: d468-476. (1998).

35. Educating the immune system. Transfer Factor . Chilsom Biological Laboratory. www.alternativemedicine.com.
36. Eigler, A., Sinha, B., Hartmann and Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunology today*. 18 :487-92. (1997).
37. Eskild, A.P. and Kirkpatrick, C.H. Nature and activities of Transfer Factor. *Annals New York Academy of Sciences*. 23:216-227. (1979).
38. Esper, C. R. Modulación genética de la respuesta inflamatoria sistémica en sepsis. *Revista para la asociación Mexicana de Medicina Critica y Terapia Intensiva*. 3: 92-95. (2001).
39. Estrada-Parra, S., Cabezas-Q. R. Actividad terapéutica e inmunoreguladora del factor de transferencia. 2^{do} Simposium de Inmunoestimulación e Inmunomodulación. México. (1986).
40. Fadenko, N.P., Davidovska T.L., Lyubchenko T.A, Goleva, E.G., Ka, L.S., Shuba, M.F. Transfer factor role in signal transduction. XIth international congress on transfer factor, Monterrey, Nuevo León, México. 1-4 Marzo. (1999).
41. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M. and O'garra, A. IL-10 Inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology*. 147:3815-3822. (1991).
42. Flohé, S., Domínguez, F. E., Ackermann, M., Hirsch, T., Borgermann and Schade F.U. Endotoxin tolerance in rats: Expression of TNF- α , IL-6, IL-10, VCAM-1, and HSP70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine*. 11:796-804.(1999).
43. Gallay, P., Jongeneel, C.V. and Heumann, D. Short time exposure to lipopolysaccharide is sufficient to activate human monocytes *J. Immunol*. 150: 5086 - 5093. (1993).
44. Gearing, D. The cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *Journal of Immunology*. 153(1): 128-36. (1994).
45. Gerard, C., Bruyns, C., Marchant, A., Abramowicz, D. and Velu, T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor

- and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* 177:547-550. (1993).
46. Gilchrist, S. G., Ivins, C. J., Ritts, E. R., Pritchard, J. D., Taylor, F. W. and Edmonson, M. J. Adjuvant therapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: An evaluation of transfer factor versus combination chemotherapy. *Cancer Treatments reports.* 62: 110- 116. (1978).
 47. Goust, J. M., Moulias, R. L. Production of immunological materials. United States Patent. 4,001,080. (1977).
 48. Haimovitz-Friedman, A., Cordon, C., Bayoumy, S., Garzotto, M., McLoughlin, I., Gallily, R., Carls, E., Schuchman, E.H., Zvi, F. and Kolesnick, R. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J. Exp. Med.* 186:1831–1841. (1997).
 49. Hanna, R. V. Servicio de anestesiología, hospital de urgencia asistencia pública. Santiago, Chile. 1999.
 50. Heinzl, F.P. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine.* 177: 1505-1509. (1993).
 51. Heller, R.A. The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* 70: 47-56. (1992).
 52. Heumann, D. and Glauser, P. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. *Current Opinion in Microbiology.* 1:49-55. (1998).
 53. Howe, L.M. Novel agents in the therapy of endotoxic shock. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 9 (6):1363-72. (2000).
 54. Hun-Taeg, C., Hyun-Ock, P., Byung-Min, C., Billiar, T.R., Young-Myeong, K. Nitric Oxide as a Bioregulator of Apoptosis *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 282: 1075-1079. (2001).
 55. Iwagaki, A., Porro, M. and Pollack, M. Influence of synthetic antiendotoxin peptides on lipopolisaccharide (LPS) recognition and LPS-induced proinflammatory cytokine responses by cells

- expressing membrane-bound CD-14. *Infection and Immunity*. 3: 1655-1663. (2000).
56. Jessica, C.A., Ter, S., Van de Ven, M.W.C.M. and Buurman, W.A. The role of endogenous $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 in LPS-induced nitric oxide release in a mouse model. *CYTOKINE*. 10:115-123. (1998).
 57. Jones, A. S., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N. and Fuller, M. G. The soluble interleukin 6 receptor: mechanism of production and implications in disease. *The FASEB journal*. 15: 43-58. (2001).
 58. Kakutani, M., Takeuchi, K., Waga, I., Iwamura, H. and Wakitani, K. JTE-607, a novel inflammatory cytokine synthesis inhibitor without immunosuppression, protects from endotoxin shock mice. *Inflamm. res.* 48 : 461-468. (1999).
 59. Karima, R., Matsumoto, S., Higashi, H. and Matsushima, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*. 3: 123-132. (1999).
 60. Keel, M., Ungethüm, U., Steckholzer, U., Niederer, E., Hartung, T., Trentz, O. and Ertel, W. Interleukin-10 Counterregulates Proinflammatory Cytokine-Induced Inhibition of Neutrophil Apoptosis During Severe Sepsis. *Blood*. 90: 3356 - 3363. (1997).
 61. Kimata, H. Interleukin 8 (IL8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL4 in human B cells. *Journal of Experimental Medicine* 176: 1227-31. (1992).
 62. Kirckpatrick, H. C., Hamad, R. A. and Morton C. L. Murine transfer factors: Dose-response relationships and routes of administration. *Cellular Immunology*. 164: 203-206. (1995).
 63. Kirkpatrick, C. H. Structural nature and functions of transfer factors. *Annals of the New York of Sciences*. 685:362-368. (1987).
 64. Kirkpatrick, C. H., Burger, D. R., Lawrence, S. H. "Immunobiology Of Transfer Factor". Academic Press, New York. 10: 33-63. (1983).

65. Kirkpatrick, C. H., McDermott, M. J., Eisenberg, S. P. Characterization of transfer factors and methods of use. United States Patent No. 5,883,224. (1999).
66. Kirkpatrick, C. H., Rozzo, S. J. Transfer Factor and Methods of Use. United States Patent 5,470,835. (1995).
67. Kirkpatrick, C.H. Methods of producing transfer factor. United States Patent. 5,840,700. (1998).
68. Kirkpatrick, H. C. Transfer Factor. *J Allergy Clin Immunol.* 81:803-13. (1988).
69. Kirsh, M. M., Orringer, B. M., McAuliffe, S. S., Katz, B. and Silva, J. Transfer Factor in the treatment of carcinoma of the lung. *The Annals of Thoracic Surgery.* 38: 140-145. (1984).
70. Klesius, P. H., Fudenberg, H. H. Process for in vitro transfer of cell-mediated immunity in mammals with alcoholic precipitates of bovine transfer factor. United States Patent 4,180,627. (1979).
71. Kornbluth, R.S. and Edgington, T.S. Tumor necrosis factor production by human monocytes is a regulated event: induction of TNF-alpha-mediated cellular cytotoxicity by endotoxin. *J. Immunol.* 137: 2585 - 2591. (1986).
72. Krakauer, T. and Bradley, G. S. Pentoxifyline inhibits superantigen-induced toxic shock and cytokine release. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 32:594-598. (1999).
73. Kuna, P. IL8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL3. *Journal of Immunology.* 147: 1920-1924. (1991).
74. Larsen, C.G. Production of interleukin 8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin IL1 or tumor necrosis factor. *Immunology.* 68: 31-36. (1989).
75. Lasfargues, A. and Chaby, R. Induction by lipopolysaccharide of intracellular and extracellular interleukin 1 production: analysis with synthetic models. *The Journal of Immunology.* 139: 429-436. (1987).

76. Lauw, F.N., Pajkrt, D., Hack, C.E., Kurimoto, M., Van Deventer, S.J.H. and van der Poll, T. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *The Journal of Immunology*. 165:2783-2789. (2000).
77. Lawrence, H.S. and Borkowsky W. A new basis for the immunoregulatory activities of Transfer Factor-An arcane dialect in the language of cells. *Cellular Immunology*. 82: 102-116. (1983).
78. Lawrence, H.S. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with tuberculin with disrupted leucocytes. *J.Clin. Invest.* 34: 219-30. (1955).
79. Leenen, D.V., Van Der Poll, T. and Ten, J.W. Pentoxifylline attenuates neutrophil activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J. Immunol.* 151: 2318 - 2325. (1993).
80. Lentsch, A. B., Atsushi, K., Brian, D., Warner, W., Chao, C. and Edwards M.J. STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia. *J. Clin. Invest.* 108: 1475-1482. (2001).
81. Liaudet, L., Schaller, M.D. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase: A promising strategy in the therapy of septic shock?. *Intensivmed* 37: 166-175. (2000).
82. Liu, S., Khemlani, S., Lajwanti and Billiar R. T. Expression of CD-14 by hepatocytes: Upregulation by cytokines during endotoxemia. *Infection and Immunity*. 11: 5089-5098. (1998).
83. Lokaj, J. Pekarek, J. and Kuklinek, P. Dialysable leukocyte extract in the therapy of sepsis. *Leukocyte dialysates and transfer factor*. Bratislava: Slovak Academy of Science. 56:516-25. (1987).
84. Mackey, F. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *Journal of Experimental Medicine*. 177: 1277-86. (1993).
85. Mattner, F. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *European Journal of Immunology*. 23: 2202-2208. (1993).

86. McMeeking, A., Borkowsky, W., Klesius, P.H., Bonk S., Holzman R.S. and Lawrence, H.S. A controlled trial of bovine dialyzable leucocyte extract for cryptosporidiosis in patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*. 161: 108-112. (1990).
87. McNamara, J.M., Norton, A.J., Nauta, J.R. and Alexander, R. Interleukin-1 receptor antibody (IL-1rab) protection and treatment against lethal endotoxemia in mice. *Journal of Surgical, Research*. 54: 316-321. (1993).
88. Moore, K. W., O'Garra, A., Waal Malefyt, R., Vieira, P. and Mosmann, T.R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11:165-190. (1993).
89. Moore, K.W., Malefyt, R.W., Coffman, R.L. and O'Garra, A. International-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683 - 765. (2001).
90. Moreira, A.L., Wang, J., Sarno, E.N. and Kaplan, G. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30: 1199-1207. (1997).
91. Mosmann, T.R. Role of a new cytokine, interleukin-10, in the cross-regulation of T helper cells. *Annals of the New York Academy of Science*. 628: 337-44. (1991).
92. Mukaida, N. Regulation of human interleukin 8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for interleukin-8. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 305: 31-8 (1991).
93. Mukundan, H., Kanagy, N. L. Ca²⁺ influx mediates enhanced alpha 2-adrenergic contraction in aortas from rats treated with NOS inhibitor. *Am. J. Physiol.* 281: H2233-2240. (2001).
94. Munford, R.S. and Pugin, J. Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163: 316 - 321. (2001).
95. Natanson, C., Eichenholz, P.W., Danner, R.L., Eichacker, P.Q. and Parrillo, J.E. Endotoxin and tumor necrosis factor

- challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J. Exp. Med.* 169:823-830. (1986).
96. Navarro-Cruz, D. and Miranda, S. E. Transfer Factor as a good therapeutic agent in moderate and severe atopic dermatitis. XIth. International Congress on Transfer Factor. Monterrey, N.L. México. (1999).
 97. Néequaye, J., Viza, D., Pizza, G., Levine, H. P., De Vinci, C., Ablashi, V. D., Biggar, J. R. and Nkrumah K. F. Specific transfer factor with activity against Epstein-Barr Virus reduces late relapse in endemic Burkitt's Lymphoma. *Anticancer research.* 10: 1183-1188. (1990).
 98. Neill, O. L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for infalamation and host defence. Department of Biochemistry, Trinity College Dublin, Ireland. *Biochemical Society Transaction.* Volume28,part 5.(2000).
 99. Netea, M.G., Kullberg, B.J., Joosten, L.A.B., Verschueren, T.S.I., Boerman, O.C., Amiot, F., Van den Berg, W.V. and Van der Meer, J.W.M. Lethal Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxemia is mediated through different pathways.. *Eur. J. Immunol.* 31:2529-2538. (2001).
 100. Nicoletti, F., Mancuso, G., Cusumano, V., Di marco, R., Zacccone, P., Bendtzen, K. and Teti, G. Prevention of endotoxin-induced lethality in neonatal mice by interleukin-13. *Eur. J. Inmmunol.* 27: 1580-1583. (1997).
 101. Niho, Y., Niuro, H. and Otsuka, T. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol.* 99(3): 165-70. (1998).
 102. Nkrumah, F., Pizza, G., Viza, D., Phillips, J., De Vinci, C., and Levine, P. Regression of progressive lymphadenopathy in a young child with acute citomegalovirus (CMV) infection following the administration of Transfer Factor with Specific Anti-CMV activity. *Lymphokine Research.* 4: 237-241. (1985).
 103. Oberholzer, C., Oberholzer, A., Clare-Salzler, M., MOLDAWER, L. L. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J.* 15: 879-892.(2001).

104. Ojeda, O. M., Fernandez, C.B.O and Araña R. M. Dialysable leucocyte extract (DLE) reduces lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor secretion in human leucocytes. *Biotherapy*. 9: 163-170. (1996).
105. Opal, S.M. and DePalo, V.A. Anti-Inflammatory Cytokines. *CHEST*. 117:1162-1172. (2000).
106. Parrillo, J.E. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*. 113:227-242. (1990).
107. Periti, P., Mazzei, T. New criteria for selecting the proper antimicrobial chemotherapy for severe sepsis and septic shock. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 12 : 97-105. (1999).
108. Pizza, G., Viza, D. Transfer Factor for the treatment of chronic active Hepatitis. *The New England Journal Of Medicine*. 4:1332-1337. (1979).
109. Ploemacher, R.E. Interleukin-12 enhances interleukin-3 dependent multilineage hematopoietic colony formation stimulated by interleukin-11 or steel factor. *Leukemia*. 7: 1374-1380. (1993).
110. Quiroz, Y., Pons, H., Gordon, K. L., Rincon, J., Chavez, M., Parra, G., Herrera-Acosta, J., Gomez-Garre, D., Largo, R., Egido, J., Johnson, R. J., Rodriguez-Iturbe, B. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am. J. Physiol*. 281: F38-47. (2001).
111. Randall, S.A. and Ahmed, E. In vitro effect of murine-derived transfer factor on salmonella-specific cross reformation. *Infection and Immunity*. 12:588-599.(1982).
112. Reiko, H., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H. and Iwakura, Y. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 α/β , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 β is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J. Exp. Med*. 187: 1463 - 1475. (1988).
113. Rodríguez, B.I., Pérez, M.P.I., Jiménez, G.G.A. Factor de transferencia bovino en el choque séptico neonatal. *Rev Mex Pediatr*. 66 (6): 240-245. (1999).

114. Rozzo, S.J. and Kirkpatrick, C. H. Purification of transfer factors. *Molecular Immunology*. 29: 167-182. (1992).
115. Ryan, J. A. Endotoxins and Cell Culture, Technical Bulletin, Corning Costar Corporation. (1995).
116. Saemann, D. M., Bohmig, A. G., Osterreicher, H. C. and Zlabinger, J. G. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *The FASEB Journal* . 10:6. (1998).
117. Schulkind, L. Martin, H.R., Lyle, S. A., Wayburn, J.S. and Small, A. P. A case report of the successful treatment of recurrent aphthous stomatitis with some preparations of orally administered transfer factor. *Cellular Immunology*. 84: 415-421. (1984).
118. Simpson, R.J. and Ward, L.D. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Sci*. 6: 929 - 955. (1997).
119. Steele, W. R., Myers, G. M. and Vincent, M. M. Transfer factor for the prevention of Varicella-Zooster infection in childhood leukemia. *The New England Journal Of Medicine*. 303: 355-359. (1980).
120. Steinhauser, M. L., Hogaboam, C.M., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., Strieter, R.M. and Standiford, T.J. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J. Immunol*. 162:392-399. (1999).
121. Steinhauser, M.L., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W., Strieter, R.M. and Kunkel, S.L. Multiple Roles for IL-12 in a Model of Acute Septic Peritonitis. *J. Immunol*. 162: 5437 - 5443. (1999).
122. Stuehr, D.J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 37: 339-359. (1997).
123. Szabó, C. Alterations in the production of nitric oxide in various forms of circulatory shock. *New Horizons*. 3: 3-32. (1995).
124. Tabary, O., Zahm, J. M., Hinrasky, J., Couetil, J. P., Cornillet, P., Guenounou, M., Gaillard, D., Puchelle, E., Jacquot, J. Selective Up-Regulation of Chemokine IL-8 Expression in Cystic

- Fibrosis Bronchial Gland Cells in Vivo and in Vitro. *Am J Pathol* . 153: 921-930. (1998).
125. Tanamoto, K. Chemically detoxified lipid A precursor derivatives antagonize the TNF- α -inducing activity of LPS in both murine macrophages and a human macrophages cell line. *The Journal of Immunology*. 155:5391-5396. (1995).
 126. Tapping, R. I., Orr, S. L., Tobias, P. S. LBP does not substitute for CD14 as a signaling membrane bound LPS receptor. *Journal of Endotoxin Research*. 5: 3. (1999).
 127. Taylor-Meddows, S., Martin, J. D. and Tiemessen, T. C.. Dysregulated production of interleukin-8 in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 and micobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*. 3: 251-1260.(1999).
 128. Tetsuya, T., Tadimitsu, K. GP130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual Review Immunol*. 15:797-819. (1997).
 129. Tollner, B., Roth, R., Storr, B., Martin, B., Voigt, K. and Zeisberger, E. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. *Eur. J. Physiol*. 440: 925-932. (2000).
 130. Víctor, V.M. and De la Fuente, M. Comparative study of peritoneal macrophage functions in mice receiving lethal and non-lethal doses of LPS. *Journal of Endotoxin Research*. 6:123-131. (2000).
 131. Viza, D., Vich, J.M., Minarro A., Ablashi, D.V. and Salahuddin, S.Z. Soluble extracts from a lymphoblastoid cell line modulate simian immunodeficiency syndrome (SAIDS) evolution.. *Journal of Virological Methods*. 21 :241-253. (1988).
 132. Viza, D.J.M., Phillips, J. and Rosenfield F. Orally administered specific Transfer Factor for the treatment of herpes infections. *Lymphokine Research*. 4: 1-13. (1985).
 133. Voisin, L., Breuillé, D. and Obled, C. Cytokine modulation by PX differently affects specific acute phase proteins during sepsis in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 275: 1412 - 1419. (1998).

134. Walley, K. R., Lukacs, N.W., Standiford, T.J., Strieter, R.M. and Kunkel, S.L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect. Immun.* 64:4733. (1996).
135. Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I., Egan, R.W. and Billah, M.M. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270:9558-9563. (1995).
136. Wilson, G. B. and Fudenberg, H. H. Use in vitro assay techniques to measure parameters related to clinical applications of transfer factor therapy. United States Patent. 4,610,878. (1986).
137. Wilson, G. B., Paddock, G. V. Process for obtaining transfer factor from colostrum, transfer factor so obtained and use thereof. United State Patent. 4,816,563. (1989).
138. Wittmann, M. and Werfel, T. Suppression of Interleukin-12 Production by Human Monocytes After Preincubation With Lipopolysaccharide. *Blood.* 21:1717-1726. (1999).
139. Wright, S. D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. and Mathison, J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPSbinding protein. *Science.* 249:1431. (1990).
140. Xaus, J., Comalada, M., Valledor, F. A., Lloberas, J., Soriano-López, F., Argilés, M. J., Bogdan, C. and Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood.* 95: 12-21. (2000).
141. Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X. and Achong, M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or sistemic acute inflammatory responses. *J.Clin.Invest.* 101: 311-320. (1998).
142. Zee, V.K.J. and Moldawer, L.L. Effects of intravenous IL-8 administration in nonhuman primates *J. Immunol.* 148: 1746 - 1752. (1992).

143. Zhang, H., Rogiers, P., Smail, N., Cabral, A., Preiser, J-C., Peny, M-O and Vincent, J-L. Effects of nitric oxide on blood flow distribution and O₂ extraction capabilities during endotoxic shock. *J Appl Physiol.* 83:1164 -1173.(1997).



<input checked="" type="checkbox"/>	Solicitud de Patente	<input type="checkbox"/>	Modelo Industrial
<input type="checkbox"/>	Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad	<input type="checkbox"/>	Dibujo Industrial
<input type="checkbox"/>	Solicitud de Registro de Diseño Industrial		

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisiva de Patentes

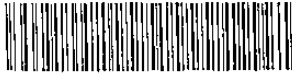
Expediente: NL/a/2004/00058
Fecha: 16/JUL/2004 Hora: 15:42
Folio: NL/E/2004/000376

Uso exclusivo del IMPI

No. de expediente

No. de folio de entrada

Fecha y hora de presentación



10. E. 3004-000376

Los datos de llenar los formulan las contestaciones generadas al reverse

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): Universidad Autónoma de Nuevo León	
2) Nacionalidad (es): Mexicana	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Pedro de Alba s/n Torre de Rectoría, 4to piso, Oficina del Abogado General, Cd. Universitaria, CP. 65451.	
Población, Estado y País: Monterrey, Nuevo León, México.	
4) Teléfono (clave): (81) 83-29-40-21	5) Fax (clave): (81) 83-29-40-21 Ext. 5099

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): a) Dra. Maria Cristina Rodríguez Padilla, b) Dr. Reyes S. Tamez Guerra, c) Dr. Moisés Armides Franco Molina y d) Dr. Leonardo Castillo León	
7) Nacionalidad (es): Mexicana	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: a) Loma Larga No. 2302 Esquina con cerro de la silla, Colonia Obispado, CP. 64060 b) Loma Larga No. 2302 Esquina con cerro de la silla, Colonia Obispado CP. 64060, c) Alfonso Junco No. 126, Colonia Colinas de San Jerónimo CP. 66450 y d) Corola No. 404 Tres caminos Norte CP. 67190	
Población, Estado y País: a) b) y c) Monterrey, N. L. México y d) Guadalupe, Nuevo León	
9) Teléfono (clave): (81) 83-76-43-19	10) Fax (clave): (81) 83-52-42-12

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): Lic. Jaime Javier Gutiérrez Argüelles	12) R G P:
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Pedro de Alba s/n Torre de Rectoría, 4to piso, Oficina del Abogado General, Cd. Universitaria, CP. 65451	
Población, Estado y País: San Nicolás del los Garza, Nuevo León, México	
14) Teléfono (clave): (81) 83-29-40-21	15) Fax (clave): (81) 83-29-40-21 Ext. 5099
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:	

17) Denominación o Título de la invención:
"Producción de un Inmunomodulador obtenido de extractos celulares dializables de bazo y extractos dializables de leucocitos conteniendo factores de transferencia y métodos de uso"

18) Fecha de divulgación previa	19) Clasificación Internacional	uso-exclusivo del IMPI
Día Mes Año		

20) Divisiva de la solicitud	21) Fecha de presentación
Numero	Figura jurídica
	Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:	Fecha de presentación	No. de serie
País	Día Mes Año	

Lista de verificación (uso interno)	
No. Hojas	No. Hojas
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de la tarifa
<input type="checkbox"/>	Descripción y reivindicación (es) de la invención
<input type="checkbox"/>	Dibujo (s) en su caso
<input type="checkbox"/>	Resumen de la descripción de la invención
<input type="checkbox"/>	Documento que acredita la personalidad del apoderado
<input type="checkbox"/>	Documento de cesión de derechos
<input type="checkbox"/>	Constancia de depósito de material biológico
<input type="checkbox"/>	Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input type="checkbox"/>	Documento (s) de prioridad
<input type="checkbox"/>	Traducción
<input type="checkbox"/>	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

Lic. Jaime Javier Gutiérrez Argüelles
Nombre y firma del solicitante o su apoderado

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, a 15 de Julio /04
Lugar y fecha



Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock,

Moisés A. Franco-Molina, Edgar Mendoza-Gamboa, Leonardo Castillo-León, Reyes S. Tamez-Guerra, Cristina Rodríguez-Padilla*

Laboratorio de Inmunología y Virología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apartado Postal 46 "F", San Nicolás de los Garza, N.L., México

Received 2 December 2003; received in revised form 4 February 2004; accepted 29 June 2004

Abstract

The pathophysiology of endotoxic shock is characterized by the activation of multiple pro-inflammatory genes and their products which initiate the inflammatory process. Endotoxic shock is a serious condition with high mortality. Bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) is a dialyzate of a heterogeneous mixture of low molecular weight substances released from disintegrated leukocytes of the blood or lymphoid tissue obtained from homogenized bovine spleen. bDLE is clinically effective for a broad spectrum of diseases. To determine whether bDLE improves survival and modulates the expression of pro-inflammatory cytokine genes in LPS-induced, murine endotoxic shock, Balb/C mice were treated with bDLE (1 U) after pretreatment with LPS (17 mg/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 decreased the production of IL-10 ($P<0.01$), TNF- α ($P<0.01$), and IL-6 ($P<0.01$) in LPS-induced, murine endotoxic shock. Our results demonstrate that bDLE leads to improved survival in LPS-induced endotoxic shock in mice, modulating the pro-inflammatory cytokine gene expression, suggesting that bDLE is an effective therapeutic agent for inflammatory illnesses associated with an unbalanced expression of pro-inflammatory cytokine genes such as in endotoxic shock, rheumatic arthritis and other diseases.

© 2004 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Bovine dialyzable leukocyte extract; Endotoxic shock; LPS, pro-inflammatory cytokines

1. Introduction 26

Sepsis due to Gram-negative bacterial infection 27
remains a major cause of mortality [14]. Invasion of 28
the host with Gram-negative bacteria may lead to a 29
systemic inflammatory syndrome characterized by 30
hypotension, disseminated intravascular coagulation, 31
and renal, hepatic, and cerebral damage [19]. Most 32

216

* Corresponding author. Tel.: +52 81 83 76 43 19; fax: +52 81 83 52 42 12.

E-mail address: errodrig@ccr.dsi.uanl.mx (C. Rodríguez-Padilla).

- 33 of these deleterious effects can be mimicked by an
 34 infusion of endotoxin, the lipopolysaccharide (LPS)
 35 component of the cell wall of Gram-negative
 36 bacteria [17]. Lethal endotoxemia has been exten-
 37 sively used as an experimental model of Gram-
 38 negative septic shock [19]. LPS exerts its profound
 39 effect on the host by activating LPS-sensitive cells
 40 such as monocytes and endothelial cells to release
 41 various cytokines, lipid mediators, and free radicals
 42 [14]. The pro-inflammatory cytokines include tumor
 43 necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta
 44 (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-12
 45 (IL-12). These pro-inflammatory cytokines are
 46 known to be important mediators in the patho-
 47 genesis of lethal septic shock, systemic inflamma-
 48 tory response syndrome, tissue injury, cachexia,
 49 hemorrhagic shock, vascular leakage syndrome,
 50 transplant rejection and various inflammatory dis-
 51 eases. The anti-inflammatory cytokine, interleukin-
 52 10, inhibits pro-inflammatory cytokine production
 53 and suppresses their inflammatory reactions [8]. The
 54 development of therapies directed towards the
 55 inhibition of TNF- α production has been an
 56 important goal in improving the management of
 57 endotoxic shock and TNF- α -induced pathology.
 58 Drugs such as JTE-607 [8], pentoxifyline [11], 21-
 59 aminosteroids [7], thalidomide [18], and dexametha-
 60 sone [2] have been shown to inhibit TNF- α
 61 production in vivo and in vitro; this inhibition is
 62 associated with protection from lethal doses of LPS
 63 injected into experimental animals. However, inhib-
 64 itors of cytokines must be administered with caution
 65 because cytokine effects are complex. Removal of
 66 cytokines might be more harmful than beneficial
 67 because they often permit a compensatory response
 68 of the host, with salutary effects. Sublethal injec-
 69 tions of TNF- α induce a kind of endotoxin tolerance
 70 and protect animals against subsequent administra-
 71 tion of LPS. Furthermore, removal of TNF- α and
 72 IL-1 leaves the host immunocompromised. This
 73 might explain why clinical therapies directed against
 74 inflammatory cytokines have been so disappointing
 75 [2]. Dialyzable leukocyte extract (DLE) is a
 76 dialyzate of a heterogeneous mixture of low
 77 molecular weight substances released from disinte-
 78 grated leukocytes of the blood or lymphoid tissue
 79 [2]. DLE has ability to transfer specific cellular
 80 immunity from an immune donor to a nonimmune
 recipient [10]. Since the discovery of transfer factor 81
 by Lawrence over 40 years ago, many clinical 82
 reports have established its usefulness as an 83
 immuno-modulator in illnesses. Transfer factor con- 84
 tains many molecules; some act in an antigen- 85
 specific manner (>5000 Da), whereas smaller 86
 molecules (<3500 Da) have been shown to have 87
 immune modulating activities. DLE contains mole- 88
 cules with nonspecific adjuvant-like activities such 89
 as serotonin, histamine, bradykinin, ascorbate, nic- 90
 otinamide, cyclic nucleotides, and thymosin α 1 [13]. 91
 DLE is used clinically as a preventive or therapeutic 92
 agent in a variety of cases: immunity disorders, 93
 immunosuppressive pharmacological therapies and 94
 chronic infections [24,26]. 95
- In this paper, we determine whether or not bDLE 96
 improves survival and modulates the expression of 97
 pro-inflammatory cytokine genes in LPS-induced 98
 endotoxic shock in mice. 99
- 2. Materials and methods** 100
- 2.1. Animals** 101
- Male Balb/C mice, 6 weeks old, were obtained 102
 from the animal production facility of the Laboratorio 103
 de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias 104
 Biológicas de la UANL. The mice were maintained on 105
 pelleted food and water ad libitum. 106
- 2.2. Bovine dialyzable leukocyte extract** 107
- Bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) pro- 108
 duced by Laboratorio de Inmunología y Virología de 109
 la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (San 110
 Nicolás de los Garza, Nuevo León, México) is a low 111
 molecular weight product (10-12 kDa) from bovine 112
 spleen, dialyzed, lyophilized, and endogenous pyro- 113
 gen-free as determined by a *Limulus* amoebocyte 114
 lysate assay (Endotoxin-Kit-Timed Gel Formation; 115
 Sigma, St. Louis, MO, USA), and free of bacteria as 116
 determined by the culture of bDLE in different culture 117
 media and in vivo inoculation of mice. The bDLE 118
 obtained from 1×10^8 leukocytes is defined as one unit 119
 (1U) and was dissolved in 0.2 ml of pyrogen-free 120
 water and administered via intramuscular injection for 121
 each treatment. 122

5,

10,
21,
25,
27

123 2.3. Treatments

124 Lipopolysaccharide B from *E. coli* 026:B6 (Sigma)
125 was reconstituted in pyrogen-free water to give a
126 stock concentration of 1 mg/ml and stored at -20°C
127 until use. LPS at doses from 1 to 17 mg/kg weight per
128 mouse was injected intraperitoneally to demonstrate
129 the dose-response effect of LPS during a 72-h period.
130 Mice in the control group received intramuscular
131 injections of pyrogen-free water. Balb/C mice each
132 received intramuscular injections of bDLE (1 U) at the
133 following times: 30 min, and 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h
134 ($n=10$ each group); they were then injected intra-
135 peritoneally with LPS (17 mg/kg) and monitored for
136 72 h. The mice in the LPS group received a
137 pretreatment with LPS (17 mg/kg); thereafter (at 30
138 min, and at 4, 8, and 12 h), they received intra-
139 muscular injections of bDLE (1U) dissolved in 0.2-ml
140 pyrogen-free water and were then monitored for 72 h.
141 After the monitoring period, the animals were killed
142 by cervical dislocation. The spleen and blood were
143 collected. Total RNA was isolated from spleens for
144 RT-PCR of pro-inflammatory cytokines mRNA anal-
145 ysis, and serum was kept at -70°C for cytokine
146 determination by ELISA.

147 2.4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction 148 (RT-PCR)

149 Total RNA from mice spleen was prepared using
150 TRIzol reagent (Gibco, Grand Island, NY). Concen-
151 tration and integrity of RNA were determined by
152 measuring absorbance at 260 nm and analyzed by
153 electrophoresis on 1% agarose gels. For RT-PCR, 1 μg
154 of total RNA was reverse-transcribed using SUPER-
155 SCRIPT™ II RT (Gibco) and oligo (dT)_{12–18} primer
156 (Gibco). The cDNA (1 μl) obtained was amplified
157 using Taq DNA polymerase (Gibco), and specific
158 primers were used (MPCR: Multiplex PCR Kit for
159 Mouse Sepsis Cytokines Set-2, with GAPDH as
160 internal control, cat. no. MP-70132, Maxim Biotech,
161 San Francisco, CA). These procedures—involving 4
162 min of 94°C denaturation period, thereafter, 30 cycles
163 of 94°C for 1 min, 57°C for 2 min and 72°C for 2
164 min followed by final extension at 72°C for 7 min—
165 were performed using PTC-200, Peltier Thermal
166 Cycler (MJ Research, Massachusetts, USA) according
167 to the manufacturer's specifications. The amplified

DNA size was 658 bp for GAPDH, 538 bp for IL-10, 168
453 bp for IL-6, 351 bp for TNF- α , 294 bp for IL-1 β , 169
237 bp for IL-12 p40. The size and amount of PCR 170
products were analyzed by electrophoresis in 2% 171
agarose gels, visualized by ethidium bromide staining 172
with UV light, then photographed and OD quantified 173
using a scanning densitometer. All values were 174
normalized to the constitutive expression of the 175
control gene (GAPDH). 176

2.5. Cytokine determination 177

To determine whether bDLE modulates the pro- 178
duction of pro-inflammatory cytokines in LPS- 179
induced, murine endotoxic shock, Balb/C mice 180
($n=10$) were injected intramuscularly with bDLE (1 181
U) at 8 h after pretreatment with the LPS (17 mg/kg, 182
injected intraperitoneally). Twenty hours later, the 183
animals were killed by cervical dislocation, the blood 184
was collected, and the serum was kept at -70°C for 185
cytokine determination by ELISA. The TNF- α , IL-6, 186
and IL-10 levels were measured with commercial 187
ELISA kits for these cytokines (Biosource Interna- 188
tional, Camarillo, CA, USA). Kits were used accord- 189
ing to manufacturer's specifications. 190

2.6. Statistical analysis 191

The values are presented as mean \pm standard error 192
(S.D.). All experiments were done three times. 193
Statistical significance was evaluated by ANOVA. 194

3. Results 195

3.1. Dose-response effect of LPS on survival 196

LPS induced lethargy, piloerection, and diarrhea in 197
all the doses tested. The severity of the symptoms and 198
the survival rate were LPS dose-dependent (Fig. 1). 199
LPS at 17 mg/kg induced 100% mortality within 22 h, 200
and it was used to determine the effect of bDLE on the 201
survival and expression of pro-inflammatory cytokine 202
genes in LPS-induced, murine endotoxic shock. 203

The LPS (17 mg/kg) test resulted in 20% morbidity 204
beginning 2 h after its administration, reaching its 205
maximum effect between 4 and 12 h. Mortality was 206
20% by 16 h and reached 100% by 20–22 h after LPS 207

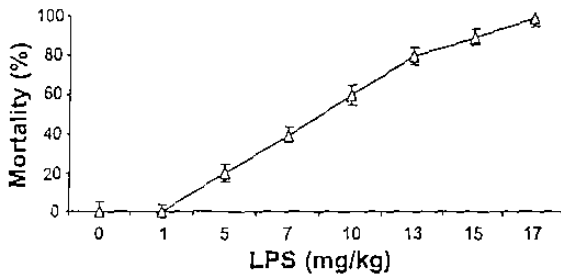


Fig. 1. Effect of LPS on mice mortality. Different groups of mice ($n=10$) were treated i.p. with one dose of LPS (0, 1, 5, 7, 10, 13, 15, and 17 mg/kg) and mortality was determined 72 h later. Results were presented as mortality percentages.

208 administration (Fig. 2). The LPS treatment signifi-
209 cantly ($P < 0.05$) induced morbidity and mortality,
210 respectively (Table 1).

211 3.2. Effect of bDLE on the survival of LPS-induced, 212 murine endotoxic shock

213 The pretreatment with bDLE at different times (30
214 min, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h) did not affect either the
215 morbidity or mortality induced by LPS administration.
216 However, the bDLE posttreatment at different times
217 (30 min, 4, 8, and 12 h) after the LPS injections
218 decreased the mortality to 20%, 20%, 10%, and 20%,
219 respectively. Because the bDLE treatment 8 h after
220 pretreatment with LPS resulted in the highest survival

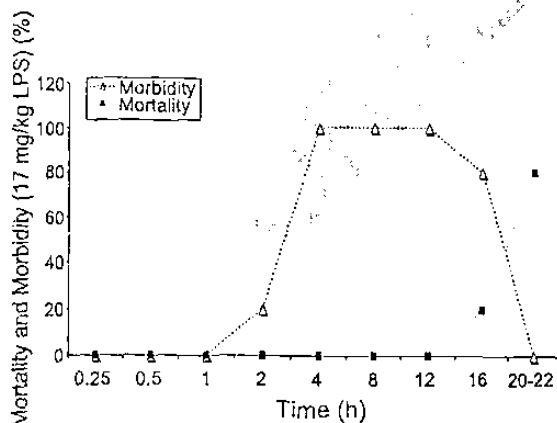


Fig. 2. Mortality and morbidity by LPS (17 mg/kg) lethal doses. Balb/C mice ($n=30$) were i.p. injected with one dose of 17 mg/kg LPS and their morbidity and mortality monitored for 24 h. Results are presented as morbidity and mortality percentages. (Morbidity was determined by the typical symptoms including lethargy, piloerection, and diarrhea).

Table 1

Effect of bDLE on the survival of LPS-induced endotoxic shock in mice

Murine treatment	Morbidity (%)	Mortality (%)
Untreated	0	0
LPS	100	100
bDLE	0	0
bDLE (72 h before)+LPS	100	100
bDLE (48 h before)+LPS	100	100
bDLE (24 h before)+LPS	100	100
bDLE (12 h before)+LPS	100	100
bDLE (8 h before)+LPS	100	100
bDLE (4 h before)+LPS	100	100
bDLE (30 min before)+LPS	100	100
LPS+bDLE (30 min after)	100	20
LPS+bDLE (4 h after)	100	20
LPS+bDLE (8 h after)	100	10
LPS+bDLE (12 h after)	100	20

Animals in control, bDLE, and LPS groups ($n=10$) were injected intramuscularly or intraperitoneally with either pyrogen-free water, bDLE (1 U), or LPS (17 mg/kg), respectively, and monitored for 72 h. Thereafter, the mortality and morbidity were monitored and expressed as percentages. (Untreated group: control animals ($n=10$) were monitored for 72 h. bDLE group: Balb/C mice ($n=10$) received i.m. injections of bDLE (1 U) and were monitored for 72 h. LPS group: Balb/C mice ($n=10$) received i.p. injections of LPS (17 mg/kg) and were monitored for 72 h. bDLE (pretreated)+LPS group: Balb/C mice were pretreated (i.m. injections) with bDLE (1 U) at 30 min, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h ($n=10$ each group); thereafter they received i.p. injections of LPS (17 mg/kg) and were monitored for 72 h. LPS (pretreated)+bDLE group: Balb/C mice were after pretreated with LPS (i.p. injections, 17 mg/kg) and then injected intramuscularly with bDLE (1 U) at the following times: 30 min, 4, 8, 12 h ($n=10$ each group), and monitored for 72 h.

rate (90%), this treatment was chosen for bDLE studies. The bDLE treatment alone did not induce morbidity or mortality (Table 1).

3.3. Effect of bDLE on the expression of pro-inflammatory cytokine genes in LPS-induced, murine endotoxic shock

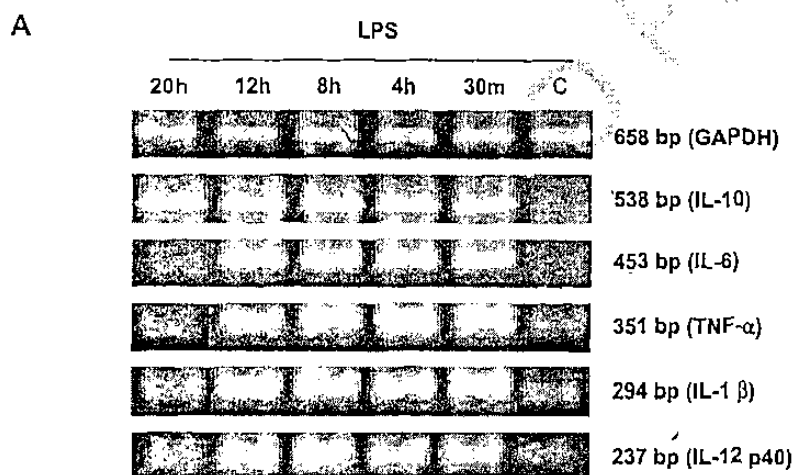
The bDLE modulated the mRNA expression of pro-inflammatory cytokine genes in LPS-induced endotoxic shock murine. The LPS treatment significantly ($P < 0.05$) induced the mRNA expression of the cytokine genes: IL-10 [30 min (8.2-fold), 4 h (8.1-fold), 8 h (8.1-fold), 12 h (8.1-fold), and 20 h (8.2 h)], IL-6 [30 min (11-fold), 4 h (10-fold), 8 h (9.5-fold), 12 h (10-fold)], and increased the mRNA expression of TNF- α [30 min (17.4-fold), 4 h (18.2-fold), 8 h (16.8-fold), and 12 h (9.5-fold)], IL-1 β [30 min (18-

267 fold), 4 h (17.7-fold), 8 h (17.7-fold), 12 h (17.2-fold),
 268 and 20 h (8.2-fold)], and IL-12p40 [30 min (15-fold),
 269 4 h (15.1-fold), 8 h (16.3-fold), 12 h (17-fold), and 20
 270 h (2.2-fold)] after the LPS challenge (Fig. 3). The
 271 bDLE treatment alone induced ($P<0.05$) the mRNA
 272 expression of IL-10 [30 min (2.2-fold), 4 h (2.8-fold),
 273 8 h (2.3-fold), 12 h (2.3-fold), 24 h (2.4-fold), and 48
 274 h (1.3-fold)] and increased ($P<0.05$) the mRNA
 275 expression of TNF- α [4 h (3.7-fold), 8 h (3.2-fold), 12
 276 h (3.2-fold), (24 h (3.2-fold), and 48 h (3.1-fold)] and
 277 IL-12p40 [4 h (3.7-fold), 8 h (3.2-fold), 12 h (3.3-
 278 fold), 24 h (3.3-fold), and 48 h (3.3-fold)]; IL-1 β
 279 mRNA expression was not affected ($P<0.05$) and the
 280 IL-6 mRNA expression was not detected ($P<0.05$)
 281 (Fig. 4). The bDLE treatment at 8 h after the
 282 pretreatment with LPS modulated the mRNA expres-
 283 sion of the pro-inflammatory cytokine genes; sup-

pressed ($P<0.05$) IL-10 and IL-6 mRNA expression 284
 and decreased ($P<0.05$) TNF- α [30 min (2.4-fold), 285
 1.5 h (2.1-fold), 4 h (2.2-fold), 8 h (0.2-fold), 12 h 286
 (0.2-fold), 24 h (0.2-fold), 48 h (0.3-fold), and 72 h 287
 (0.3-fold)], IL-1 β [30 min (3.8-fold), 1.5 h (3.9-fold), 288
 4 h (3.5-fold), 8 h (3.3-fold), 12 h (3.3-fold), 24 h 289
 (2.4-fold), 48 h (2.6-fold), and 72 h (0.7-fold)], and 290
 IL-12p40 [30 min (0.7-fold), 1.5 h (3.2-fold), 4 h (3.1-
 291 fold), 8 h (3.5-fold), 12 h (3.2-fold), 24 h (0.8-fold),
 292 48 h (0.7-fold), and 72 h (0.7-fold)] mRNA expres-
 293 sion in all the times evaluated (Fig. 5). 294

3.4. Effect of bDLE on the production of TNF- α , IL-6, and IL-10 in LPS-induced endotoxic shock in mice 295 296

bDLE modulated the production of pro-inflam- 297
 matory cytokines in LPS-induced, murine endotoxic 298

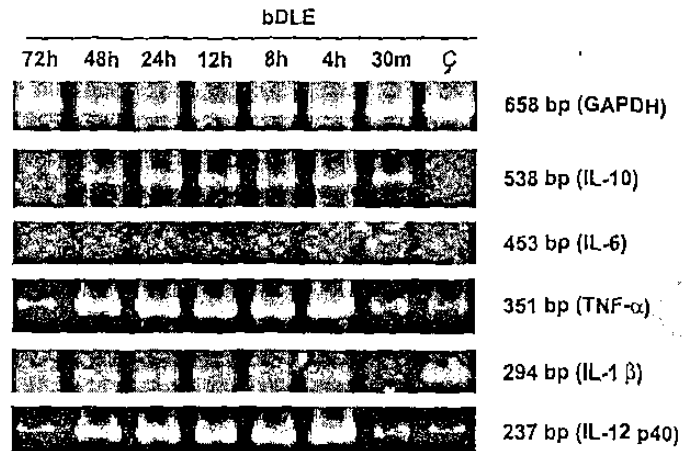


B

Cytokines	Control	30 min	4 h	8 h	12 h	20 h
IL-10	0 ± 0	8.2 ± 0.3**	8.1 ± 0.2**	8.1 ± 0.4**	8.1 ± 0.3**	8.2 ± 0.5*
IL-6	0 ± 0.5	11 ± 0.6**	10 ± 0.3**	9.5 ± 0.2**	10 ± 0.5**	0 ± 0.4
TNF- α	0.7 ± 0.2	17.4 ± 0.3**	18.2 ± 0.3**	16.8 ± 0.2**	9.5 ± 0.5**	0.8 ± 0.5
IL-1 β	0.7 ± 0.4	18 ± 0.2**	17.7 ± 0.4**	17.7 ± 0.3**	17.2 ± 0.7**	8.2 ± 0.2*
IL-12p40	0.8 ± 0.5	15 ± 0.2**	15.1 ± 0.3**	16.3 ± 0.4**	17.0 ± 0.2**	2.2 ± 0.1*
GAPDH	1 ± 0.2	1 ± 0.5	1 ± 0.5**	1 ± 0.4	1 ± 0.4	1 ± 0.1

Fig. 3. Cytokine gene expression in LPS-induced endotoxic shock. Total RNA was extracted from mouse spleens 30 min, and 4, 8, 12, and 20 h after LPS treatment (17 mg/kg). RNA was analyzed for the expression of cytokine mRNA (IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1 β , and IL-12p40) by RT-PCR, as described in Materials and methods. (A) The size and amount of PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining with UV light, and photographed. The data represent one of 10 independent experiments (spleens); the 10 experiments having shown similar results. (B) The level of mRNA in the cytokines was quantified by densitometry and normalized to the constitutive expression of the control gene (GAPDH). (C) Mean values of 10 independent experiments (spleens) \pm S.D. *** $P<0.01$, ** $P<0.05$ compared with untreated control mice (C=untreated mice).

A



B

Cytokines	Control	30 min	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
IL-10	0±0.2	2.2±0.4**	2.8±0.3**	2.3±0.3**	2.3±0.7**	2.4±0.3**	1.3±0.3**	0±0.5
IL-6	0±0.1	0±0.5	0±0.6	0±0.3	0±0.2	0±0.5	0±0.1	0±0.4
TNF-α	0.7±0.3	0.7±0.5	3.7±0.3*	3.2±0.3*	3.2±0.3*	3.2±0.2*	3.1±0.5*	0.8±0.5
IL-1β	1.2±0.5	0.9±0.4	1.1±0.2	1.1±0.4	1.1±0.3	1.1±0.3	1.1±0.7	1.0±0.2
IL-12p40	0.9±0.3	0.7±0.2	3.7±0.6*	3.2±0.3*	3.3±0.6*	3.3±0.1	3.2±0.4*	0.9±0.6
GAPDH	1±0.5	1±0.5	1±0.2	1±0.3	1±0.4	1±0.2	1±0.1	1±0.2

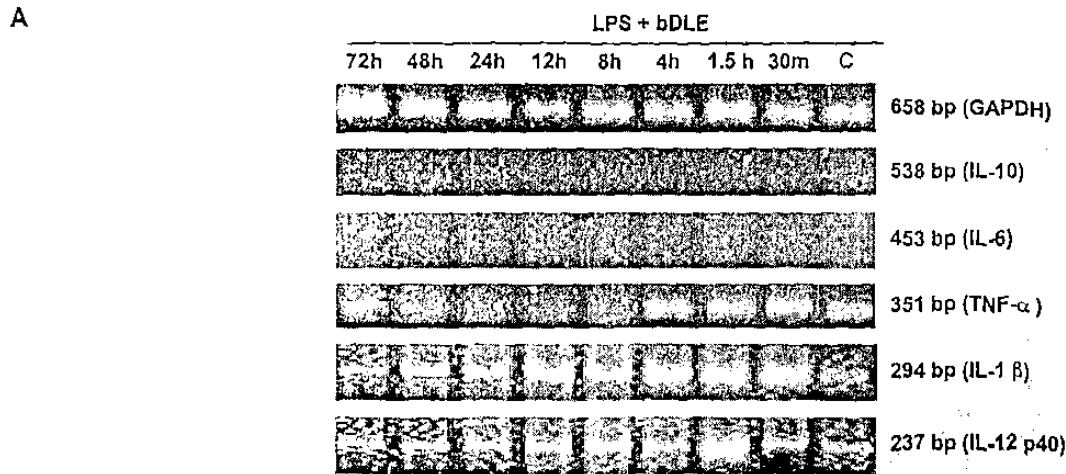
Fig. 4. Cytokine gene expression in bDLE treated mice. Total RNA was extracted from mouse spleens 30 min and 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h after bDLE (1U) treatment. RNA was analyzed for the expression of cytokine mRNA (IL-10, IL-6, TNF-α, IL-1β, and IL-12p40) by RT-PCR, as described in Materials and methods. (A) The size and amount of PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining with UV light, and photographed. The data represent one of 10 independent experiments (spleens); the 10 experiments having shown similar results. (B) The level of mRNA in the cytokines was quantified by densitometry and normalized to the constitutive expression of the control gene (GAPDH). (C) Mean values of 10 independent experiments (spleens)±S.D. ** $P<0.01$, * $P<0.05$ compared with untreated control mice. C=untreated mice.

299 shock. The cytokine production of TNF-α, IL-6,
 300 and IL-10 ($P<0.01$) was not detected in the control
 301 and the bDLE group. The LPS treatment signifi-
 302 cantly increased the production of IL-6, TNF-α, and
 303 IL-10 ($P<0.01$). The bDLE treatment at 8 h after
 304 pretreatment with LPS significantly decreased the
 305 cytokine production of IL-6, TNF-α, and IL-10
 306 ($P<0.01$) (Fig. 6).

307 4. Discussion

308 The injection of high doses of LPS induces a
 309 septic-shock-like state. Sepsis is a complex condition
 310 involving a wide variety of local and systemic
 311 inflammatory responses. All the LPS test dosages
 312 induced morbidity 2 h after being administered to the
 313 mice. The severity of the symptoms and rate of

mortality were LPS dose-dependent. LPS at 17 mg/kg 314
 induced 100% mortality within 22 h (Fig. 1, Table 1); 315
 it induced 20% morbidity beginning at 2 h, reaching 316
 its maximum effect between 4 and 12 h after its 317
 administration (Fig. 2). Victor [24] and Moreira et al. 318
 [18] similarly demonstrated that morbidity and mortality 319
 in mice were LPS dose-dependent. Pretreatment 320
 with bDLE did not affect the morbidity and mortality 321
 of the LPS tests, suggesting that bDLE does not 322
 prevent the induction of endotoxic shock (Table 1). 323
 Lokaj et al. [15] reported similar effects in endotoxic 324
 shock patients and other related diseases treated with 325
 dialyzable leukocyte extract. The pathophysiological 326
 effects of severe sepsis, endotoxic shock and other 327
 related syndromes are a consequence of uncontrolled 328
 production of inflammatory cytokines. Potential roles 329
 for TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12p40 330
 have been suggested by the results of in vivo studies 331

**B**

Cytokines	Control	30 min	1.5 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
IL-10	0 ± 0.2	0 ± 0.2	0 ± 0.1	0 ± 0.3	0 ± 0.2	0 ± 0.4	0 ± 0.3	0 ± 0.3	0 ± 0.5
IL-6	0 ± 0.2	0 ± 0.5	0 ± 0.3	0 ± 0.6	0 ± 0.3	0 ± 0.2	0 ± 0.5	0 ± 0.2	0 ± 0.2
TNF-α	0.8 ± 0.5	2.4 ± 0.4*	2.1 ± 0.6*	2.2 ± 0.4*	0.2 ± 0.5	0.2 ± 0.7	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.6
IL-1β	0.6 ± 0.5	3.8 ± 0.4*	3.9 ± 0.5*	3.5 ± 0.2*	3.3 ± 0.4**	3.3 ± 0.3**	2.4 ± 0.3**	2.6 ± 0.7**	0.7 ± 0.2
IL-12p40	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.5	3.2 ± 0.7**	3.1 ± 0.3*	3.5 ± 0.4*	3.2 ± 0.2**	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.5
GAPDH	1 ± 0.5	1 ± 0.5	1 ± 0.4	1 ± 0.2	1 ± 0.3	1 ± 0.4	1 ± 0.2	1 ± 0.1	1 ± 0.2

Fig. 5. Cytokine gene expression in LPS-induced endotoxic shock in mice treated with bDLE. Total RNA was extracted from mouse spleens at 30 min, and 1.5, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h after bDLE (1 U) treatment in LPS-induced endotoxic shock mice. RNA was analyzed for the expression of cytokine mRNA (IL-10, IL-6, TNF-α, IL-1β, and IL-12p40) by RT-PCR, as described in Materials and methods. (A) The size and amount of PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining with UV light, and photographed. The data represent one of 10 independent experiments (spleens); the 10 experiments having shown similar results. (B) The level of mRNA in the cytokines was quantified by densitometry and normalized to the constitutive expression of the control gene (GAPDH). (C) Mean values of 10 independent experiments (spleens) ± S.D. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ compared with untreated control mice. C=untreated mice.

332 of bacteremia and septic shock caused by both Gram-
 333 positive and Gram-negative bacteria [1,2]. We
 334 demonstrated that LPS administration in animal
 335 models induced the overexpression of inflammatory
 336 cytokines genes IL-10, IL-6, TNF-α, IL-1β, and IL-
 337 12p40 (Figs. 7 and 8). Similar results have demon-
 338 strated that the primary target cells for LPS are
 339 monocytes and macrophages; picogram amounts of
 340 endotoxin are sufficient to trigger a massive produc-
 341 tion of pro-inflammatory cytokines, TNF-α, IL-1β,
 342 IL-6, IL-8, IL-12, reactive oxygen and nitrogen
 343 intermediates, procoagulants, and cell adhesion mol-
 344 ecules. In turn, expression of these LPS-responsive
 345 factors contributes to collapse of the circulatory
 346 system, to disseminated intravascular coagulation,
 347 and to a 30% mortality rate. The ability to duplicate
 348 many of the pathophysiologic changes associated with
 349 septic shock by administration of IL-1β or TNF-α in
 350 mice, rabbits, and baboons suggests a central role for

these mediators in endotoxin shock [1,8]. Numerous 351
 laboratory studies with animal models demonstrate 352
 that inhibition of TNF-α or IL-1β protects against the 353
 deleterious effects of excessive cytokine activity and 354
 significantly improves the survival rate in cases of 355
 experimental endotoxic shock [17]. Our results 356
 showed that although the posttreatment with bDLE 357
 increased the survival of mice with LPS-induced 358
 endotoxic shock, the treatments did not affect the 359
 morbidity; however, 72 h after the treatment with 360
 bDLE, the signs and symptoms of endotoxic shock 361
 disappeared. Because the bDLE posttreatment 8 h 362
 after injection with LPS induced the highest survival 363
 rate (90%), this treatment was chosen for bDLE 364
 studies. These results suggest that bDLE decreases 365
 mortality induced by LPS (Table 1). The bDLE 366
 posttreatment (after the LPS injections) modulated 367
 the expression of inflammatory cytokine genes (sup- 368
 pressed IL-6 and IL-10; decreased IL-1β, IL-12p40, 369

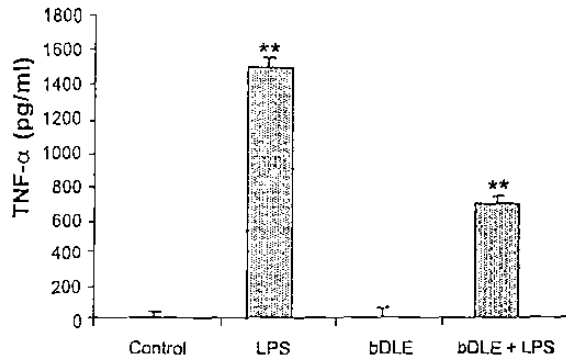


Fig. 6. Effect of bDLE on the production of TNF- α in LPS-induced endotoxic shock in mice. Animals in control, bDLE, and LPS groups ($n=10$) were injected intramuscularly or intraperitoneally with either pyrogen-free water, bDLE (1 U), or LPS (17 mg/kg), respectively. Balb/C mice ($n=10$) were injected intramuscularly with bDLE (1 U) at 8 h after pretreatment with LPS (17 mg/kg) injected intraperitoneally; 20 h later, the animals were killed by cervical dislocation, the blood was collected, and the serum was kept at -70°C for quantification of cytokines by ELISA. The TNF- α levels were measured with commercial ELISA kits for this cytokine (Biosource International). Kits were used according to manufacturer's specifications. (A) Mean values of 10 independent experiments (serum) \pm S.D. ** $P < 0.01$, compared with untreated control mice.

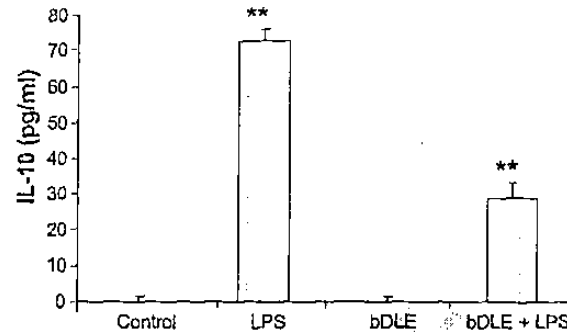


Fig. 8. Effect of bDLE on the production of IL-10 in LPS-induced endotoxic shock in mice. Animals in control, bDLE, and LPS groups ($n=10$) were injected intramuscularly or intraperitoneally with either pyrogen-free water, bDLE (1 U), or LPS (17 mg/kg), respectively. Balb/C mice ($n=10$) were injected intramuscularly with bDLE (1U) at 8 h after pretreatment with LPS (17 mg/kg) injected intraperitoneally; 20 h later, the animals were killed by cervical dislocation, the blood was collected, and the serum was kept at -70°C for quantification of cytokines by ELISA. The IL-10 levels were measured with commercial ELISA kits for this cytokine (Biosource International). Kits were used according to manufacturer's specifications. (A) Mean values of 10 independent experiments (splens) \pm S.D. ** $P < 0.01$, compared with untreated control mice.

370 and TNF- α) and decreased the serum cytokine,
 371 production of IL-6, IL-10, and TNF- α . These results
 372 suggest that bDLE modulated the expression and

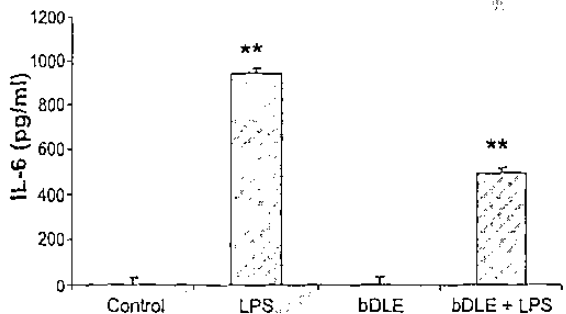


Fig. 7. Effect of bDLE on the production of IL-6 in LPS-induced endotoxic shock in mice. Animals in control, bDLE, and LPS groups ($n=10$) were injected intramuscularly or intraperitoneally with either pyrogen-free water, bDLE (1 U), or LPS (17 mg/kg), respectively. Balb/C mice ($n=10$) were injected intramuscularly with bDLE (1 U) at 8 h after pretreatment with LPS (17 mg/kg) injected intraperitoneally; 20 h later, the animals were killed by cervical dislocation, the blood was collected, and the serum was kept at -70°C for quantification of cytokines by ELISA. The IL-6 levels were measured with commercial ELISA kits for this cytokine (Biosource International). Kits were used according to manufacturer's specifications. (A) Mean values of 10 independent experiments (splens) \pm S.D. ** $P < 0.01$, compared with untreated control mice.

production of pro-inflammatory cytokine genes associated with murine endotoxic shock. These results correlate with the studies reported by Ojeda et al., 1996, where bDLE treatment decreased the TNF- α production in LPS-stimulated human leukocytes in vitro. Various cytokines have been found to inhibit LPS-induced TNF- α production. For instance, IL-10 inhibited TNF- α production both peripherally (when injected systemically) and in the brain (when injected locally) [3]. IL-6 is known to inhibit the synthesis of TNF- α in vivo and in vitro; furthermore, IL-6-deficient mice produced higher serum TNF- α levels when injected with LPS, suggesting that endogenous IL-6 may play a role in down-regulating TNF- α production. The increased morbidity and mortality of neonatal sepsis does not seem to be due to an inadequate IL-10 response, because newborns can produce IL-10 in high quantities during sepsis [2]. IL-10 has many anti-inflammatory and immunosuppressive activities. In mice, IL-10 protects against death during endotoxemia and staphylococcal enterotoxin B (SEB)³-induced shock [12]. However, other studies suggest that nontoxic agents such as AS101, with the capacity to inhibit IL-10 and stimulate macrophage functions, may have clinical potential in

396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420

[20]

(4)

2

421 the treatment of sepsis, provided they are administered
 422 during the phase of sepsis characterized by immune
 423 suppression. Septic patients have shown immunosup-
 424 pression by steroid administration, neutropenia, and
 425 genetic and acquired immunologic deficiencies with
 426 an inadequate inflammatory response to infection.
 427 Regulation of host defense mechanisms may accel-
 428 erate the elimination of the bacteria and their toxins,
 429 decreasing tissue injury. Although we found that the
 430 treatment with only bDLE was able to induce the
 431 expression of IL-10 and increase the expression of
 432 TNF- α and IL-12p40 cytokine, this did not induce
 433 any symptomatology associated with disease in the
 434 treated mice. Our results demonstrate that bDLE leads
 435 to improved survival in LPS-induced endotoxic shock
 436 in mice, modulating the expression of pro-inflamma-
 437 tory cytokine genes, and suggesting that bDLE is an
 438 effective therapeutic agent for inflammatory illnesses
 439 associated with an unbalanced expression of pro-
 440 inflammatory cytokine genes such as endotoxic
 441 shock, rheumatic arthritis and other diseases.

442 5. Uncited references

- 443 [4]
 444 [5]
 445 [6]
 446 [9]
 447 [16]
 448 [20]

449 Acknowledgements

450 This work was supported by research grants I-
 451 32914-N from Consejo Nacional de Ciencia y
 452 Tecnología and CN-285-00 from Universidad Autón-
 453 oma de Nuevo León, México.

454 References

- 455
 456 [1] Amura CR, Amura R, Silverstein R, Morrison DC. Mecha-
 457 nism involved in the pathogenesis of sepsis are not necessarily
 458 reflected by in vitro cell activation studies. *Infection and*
 459 *Immunity* 1988;3:5372–8.
 460 [2] Davenpeck KL, Zagorski J, Schleimer RP, Bochner BS.
 461 Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion
 in the rat mesenteric microcirculation: regulation by gluco-
 corticoids and role of cytokines. *Journal of Immunology* 1988;
 161:6861–70.
 [3] Di Santo E, Sironi M, Pozzi P, Gnocchi P, Ghezzi P, et al.
 Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor
 necrosis factor and interleukin-1 β production in the brain
 without affecting the activation of the hypothalamus–
 pituitary adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 1988;2:
 149–154.
 [4] Di Santo E, Alfonzi T, Poli V, Fattori E, Ghezzi P, et al.
 Differential effects of IL-6 on systemic and central production
 of TNF: A study with IL-6-deficient mice. *Cytokine* 1997;9:
 300–6.
 [5] Estrada PS, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Estrada IG,
 et al. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the
 treatment of herpes zoster. *International Journal of Immuno-*
pharmacology 1988;20:521–35.
 [6] Haimovitz FA, Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, Kolesnick
 R, et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial
 apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997;186:
 1831–1841.
 [7] Howe LM. Novel agents in the therapy of endotoxic shock.
Expert Opin Investig Drugs 2000;9:1363–72.
 [8] Kakutani MK, Waga TI, Iwamura H, Wakitani K. JTE-607, a
 novel inflammatory cytokine synthesis inhibitor without
 immunosuppression, protects from endotoxin shock mice.
Inflamm Res 1999;48:461–8.
 [9] Kalechman Y, Gafar U, Gal R, Yan D, Sredni B, et al. Anti-
 IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101
 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on
 timing of immunomodulating intervention. *J Immunol* 2002;
 169:384–92.
 [10] Kirkpatrick CH. Transfer factors: identification of conserved
 sequences in transfer factor molecules. *Mol Med* 2000;6:
 332–341.
 [11] Krakauer T, Stijles BG. Pentoxifylline inhibits superantigen-
 induced toxic shock and cytokine release. *Clin Diag Lab*
Immunol 1999;1993:594–8.
 [12] Lauw FN, Pajkrt D, Hack EC, Kurimoto M, Van der Poll T,
 et al. Proinflammatory effects of IL-10 during human
 endotoxemia. *J Immunol* 2000;165:2783–9.
 [13] Lawrence HS, Borkowsky W. A new basis for the immuno-
 regulatory activities of transfer factor—an arcane dialect in the
 language of cells. *Cell Immunol* 1983;82:102–16.
 [14] Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Billar TR,
 et al. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by
 cytokines during endotoxemia. *Infection and Immunity* 1998;
 5:5089–98.
 [15] Lokaj J, Pekarek J, Kuklinek P. Dialyzable leukocyte extract in
 the therapy of sepsis. *Leukocyte dialyzates and transfer factor*.
 Bratislava: Slovak Academy of Science 1987;5:516–25.
 [16] Lynn AW, Golenbock TD. Lipopolysaccharide antagonists.
Immunology Today 1992;13:563–72.
 [17] McNamara MJ, Norton JA, Nauta RJ, Alexander HR.
 Interleukin-1 receptor antibody (IL-1rab) protection and treat-
 ment against lethal endotoxemia in mice. *Journal of Surgical*
Research 1992;54:316–21.

519	[18]	Moreira AL, Wang J, Sarno EN, Kaplan G. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1997;30:1199-207.	
520			
521			
522	[19]	Netea MG, Kullberg BJ, Joosten LA, Sprong T, Van der Meer JV, et al. Lethal <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella typhimurium</i> endotoxemia is mediated through different pathways. Eur J Immunol 2001;31:2529-38.	
523			
524			
525			
526	[20]	Rodríguez BI, Pérez MP, Jiménez GG. Factor de transferencia bovino en el choque séptico neonatal. Rev Mex Pediatr 1999; 66:240-5.	
527			
528			
529	[21]	de Bont SJM, Kimpfen JL, Limburg PC, Bijzet J, De Leij JF, et al. Increased interleukin-10 plasma concentrations during neonatal sepsis. Immunology and Infectious Diseases 1996; 6:49-52.	
530			
531			
532			
533	[22]	Steinhauser ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. J Immunol 1999;162:5437-43.	
534			
535			
553			
	[23]	Tollner B, Roth J, Storr B, Martin D, Zeisberger E, et al. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. Eur J Physiol 2000;440: 925-32.	536 537 538 539 540
	[24]	Vacek A, Hofer M, Barnet K, Cech K, Schneiderová H, et al. Positive effects of dialyzable leukocyte extract (DLE) on recovery of mouse haemopoiesis suppressed by ionizing radiation and on proliferation of haemopoietic progenitor cells in vitro. International Journal of Immunopharmacology 2000; 22:623-34.	541 542 543 544 545 546
	[25]	Victor VM. Comparative study of peritoneal macrophage functions in mice receiving lethal and non-lethal doses of LPS. Journal of Endotoxin Research 2000;6:1125-36.	547 548 549
	[26]	Viza D, Vich JM, Phillips J. Orally administered specific transfer factor for the treatment of herpes infections. Lymphokine Research 1985;4:112-23.	550 551 552

2207
 Ojeda OM, Fernandez CB, Rosainz MJ ~~et al~~ Dialyzable leukocyte extract (DLE) reduces lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor secretion in human leukocytes. *Biotherapy* 9: 163-70.
 1996;

