

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



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

POR
MOISES ARMIDES FRANCO MOLINA

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

Agosto, 2004

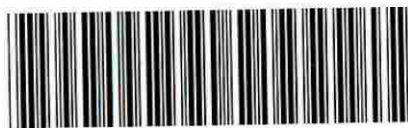
TD

Z5320

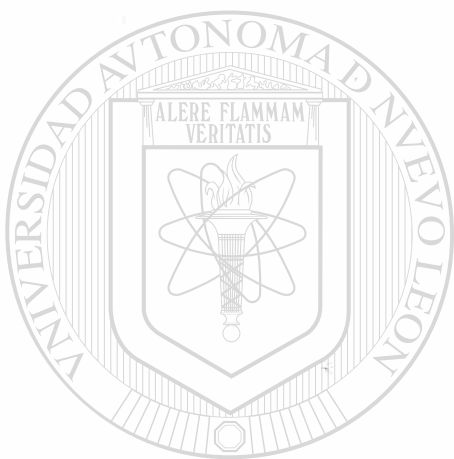
FCB

2004.

.F7



1020150218



UANL

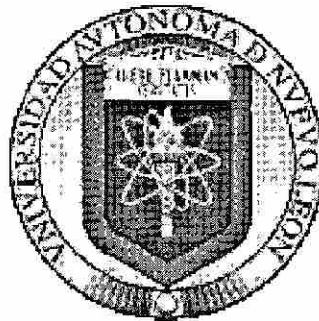
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**POR:
MOISES ARMIDES FRANCO MOLINA**

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

Agosto, 2004

988 284

TD
Z5330
FEB
2004
.F7



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

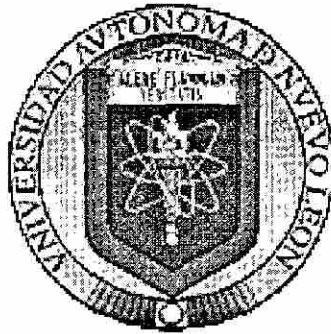
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS




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

POR:

MOISES ARMIDES FRANCO MOLINA

Comité de Tesis


Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente


Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Secretario


Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Vocal

Agosto, 2004



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

Dra. Cristina Rodríguez Padilla.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

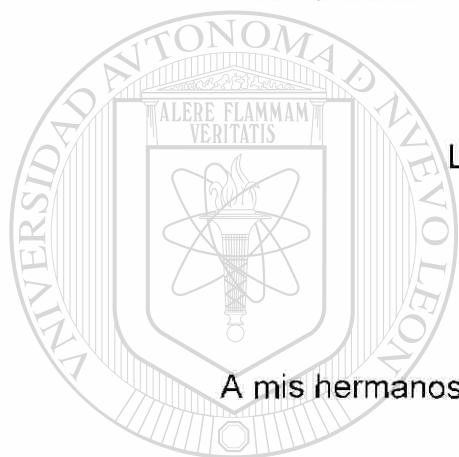


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A DIOS: Por ser parte de su voluntad

A mis padres:



Lic. Armides Franco Lastra

Lic. Martha Evangelina Molina Ramos

Con amor y agradecimiento

A mis hermanos:

Ana María de la Luz Franco Molina

Alan Guadalupe Franco Molina

Rosa Elena Franco Lastra

Por su cariño y apoyo que siempre me han brindado

A Laura Elisa Córtes Gónzales: Con todo mi amor

A mis familiares y amigos.

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

TABLA DE CONTENIDO

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

Capítulo	Página
2.4.2	Administración de el EDLb en el shock endotóxico murino inducido por LPS.....56
2.4.3	Obtención, tratamiento y cultivo de macrófagos peritoneales murinos.....57
2.4.4	Determinación de TNF- α , IL-6 e IL-10 en macrófagos peritoneales murinos mediante ELISA.....58
2.4.5	Determinación de la producción de citocinas pro-inflamatorias, TNF- α , IL-6 e IL-10 en sangre periférica humana <i>in vitro</i>59
2.4.6	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana (CMNPH) para la determinación de la expresión del RNAm de citocinas pro-inflamatorias mediante RT-PCR.....59
2.4.7	Determinación de la Viabilidad Celular.....60
2.5	ELISA.....61
2.6	RT-PCR.....65
2.7	Determinación de óxido nítrico basado en la reacción de Greiss.....72
3.	Resultados

3.1	Efecto dosis-respuesta de la administración de el LPS.....73
3.2	Efecto protector de el EDLb en el shock endotóxico murino inducido por LPS.....73
3.3	Efecto de el EDLb en la expresión de IL-10 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>74
3.4	Efecto de el EDLb sobre la expresión de IL-6 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>75
3.5	Efecto de el EDLb en la expresión de TNF- α en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>75
3.6	Efecto de el EDLb en la expresión de IL-1 β en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>76
3.7	Efecto de el EDLb en la expresión de IL-12 p40 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>77
3.8	Efecto de el EDLb en la producción de IL-10, TNF- α , e IL-6 en el shock endotóxico murino <i>in vivo</i>77

Capítulo

Página

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

Bibliografía.....	118
-------------------	-----

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

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

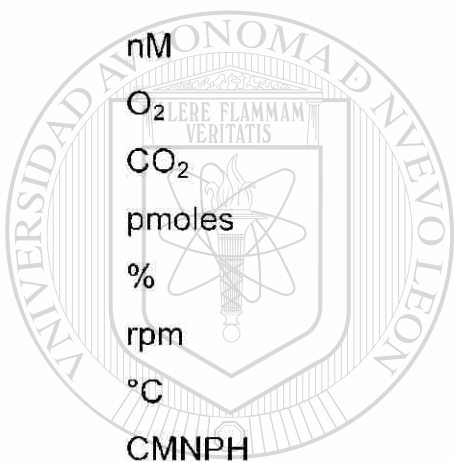
ABREVIATURAS

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

SAPK	Proteínas quinasas activadas por estrés
MAPKAPK1	Proteínas quinasas 1 activadas por MAPK
MAPKAPK3	Proteínas quinasas 3 activadas por MAPK
MNK1/2	Quinasas 1 y 2 interactuando con MAPK
ATF-2	Factor activador de la transcripción-2
TCF	Factor del complejo ternario
PKC	Proteínas quinasas C
RNAm	Acido ribunucleico mensajero
NOS	Sintetasa del óxido nítrico
iNOS	Sintetasa del óxido nítrico inducible
eNOS	Sintetasa del óxido nítrico endotelial
cNOS	Sintetasa del óxido nítrico constitutivo
COX-2	Ciclooxigenasa-2
INF-β2	Interferón-beta 2
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
OSM	Oncostatina M
<hr/>	
CNTF	Factor Ciliar Neurotrópico
CT-1	Cardiotropina-1
IL-11	Interleucina- 11
IL-6Rs	Receptor de interleucina- 6 soluble
SP	Sustancia P
GM-CSF	Factor estimulante de colonia monocito- granulocito
NK	Células asesinas naturales
T-BP-1	Proteínas de unión al TNF-1
T-BP-2	Proteínas de unión al TNF-2
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
CTAP-3	Proteína-3 activadora del tejido conectivo

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

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

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

en sangre total humana estimulada con LPS. Nuestros resultados claramente indican que el EDLb incrementa la sobrevivencia en el shock endotóxico murino, modulando la expresión de los genes de las citocinas pro-inflamatorias, y disminuye la producción de el óxido nítrico *in vitro*; sugiriendo su potencial terapéutico en el shock endotóxico.

ABSTRACT

The pathophysiology of septic shock is characterized by the induction of multiple pro-inflammatory genes and their products which initiates the inflammatory process. Septic shock is a serious condition with a high mortality. The bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE), is a dialyzate of a heterogeneous mixture of low-molecular-weight substances released from desintegrated leukocytes of the blood or tissue lymphoid obtained from homogenized spleen bovine, and provide clinical effectiveness in a broad spectrum diseases. To determine whether bDLE improves survival and modulates the expression of pro-inflammatory cytokines genes in LPS-induced endotoxic shock murine, Balb/C mice were treated with

bDLE (1U) after pretreatment with LPS (17mg/kg). The bDLE improved survival (90%), suppressed IL-10 and IL-6; and decreased IL-1 β , TNF- α , and IL-12p40 mRNA expression; and also decreased the cytokine production of TNF- α , IL-10, and IL-6 in LPS-induced endotoxic shock murine. Human monocytes or mouse macrophages produce many of the mediators found in septic patients. Targeting of these mediators, specifically Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and Nitric Oxide (NO) has been pursued as a means of reducing mortality in sepsis. To determine whether bDLE modulates the NO and the cytokine pro-

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

survival in LPS-induced endotoxic shock murine, modulating the expression of pro-inflammatory cytokine genes. This may offer a therapeutic potential in clinical septic shock. ®

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 El Shock endotóxico

La inflamación es el resultado de la activación de los componentes celulares (neutrófilos, macrófagos, células T y células NK) y humorales (complemento, proteínas de coagulación e inmunoglobulinas). La cual conduce a la activación de un sistema de amplificación que inicia la producción de una diversidad de mediadores celulares especializados (citocinas, quimioquinas, metabolitos de el oxigeno intermediario). Estos mediadores alteran el flujo sanguíneo y permeabilidad vascular e

incrementan la adherencia de fagocitos en circulación a células endoteliales, promoviendo la migración de leucocitos dentro de el tejido para eliminar la infección. En muchos casos este proceso conduce a la eliminación del microorganismo, sin producir signos de inflamación clínicos aparentes. En otras condiciones el proceso inflamatorio puede contribuir a procesos patológicos que pueden culminar en fallo múltiple de órganos, shock y muerte. Los mismos mediadores son producidos en infecciones severas y moderadas pero la cantidad de mediadores producidos y su diseminación dentro de la circulación discrimina entre estos dos tipos de infecciones (52).

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

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

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

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

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

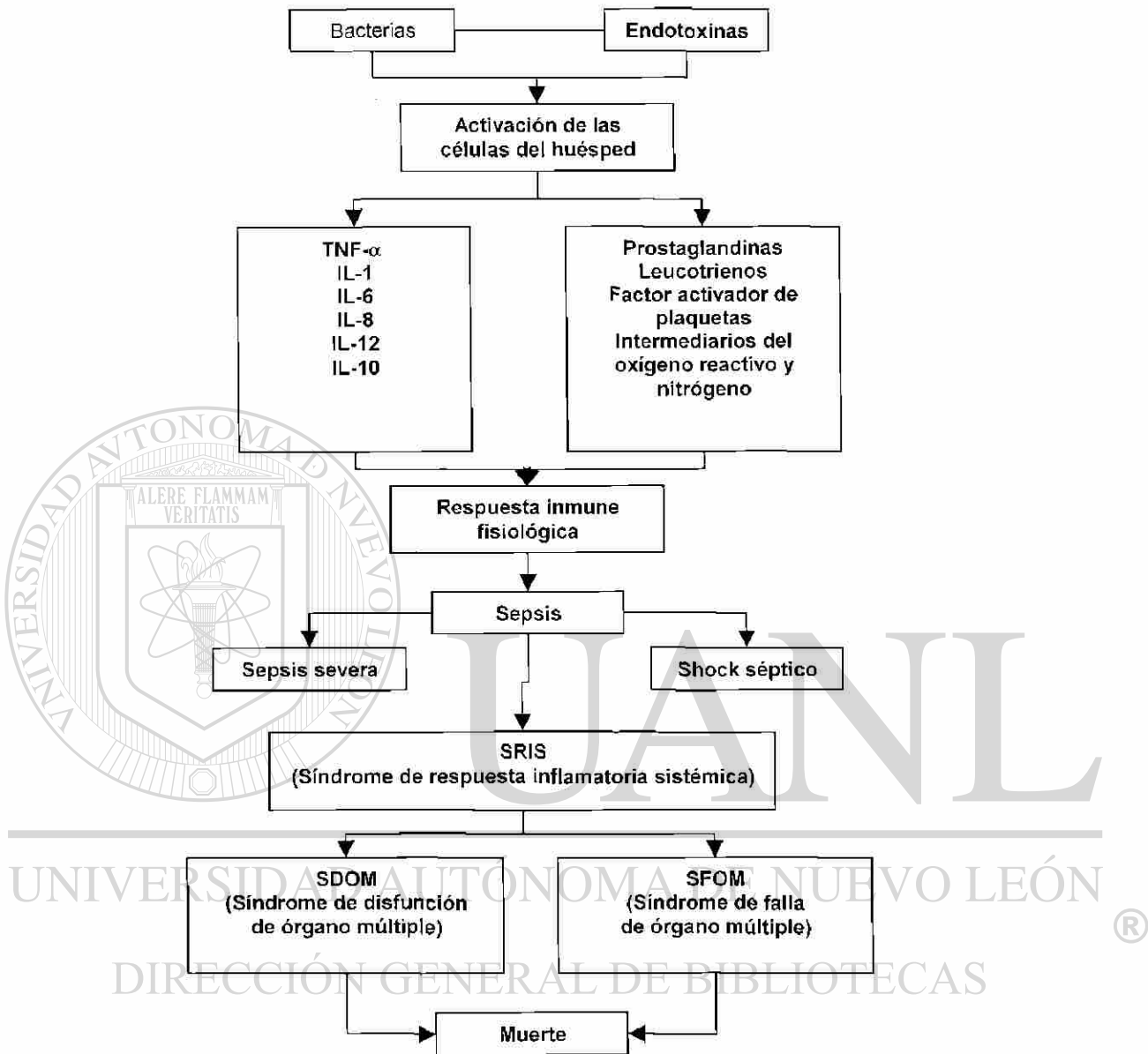


Figura 1.- Desarrollo de Sepsis (6, 107).

1.2 Lipopolisacáridos

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

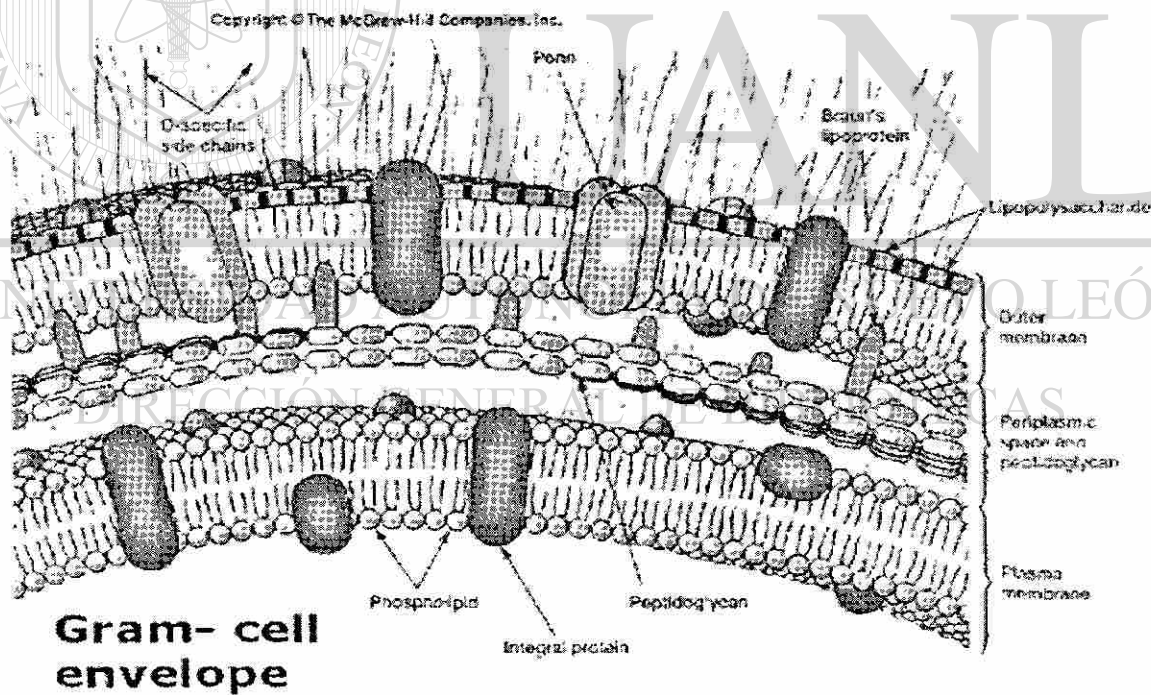


Figura 2.- Estructura de la superficie de una bacteria Gram-negativa.

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

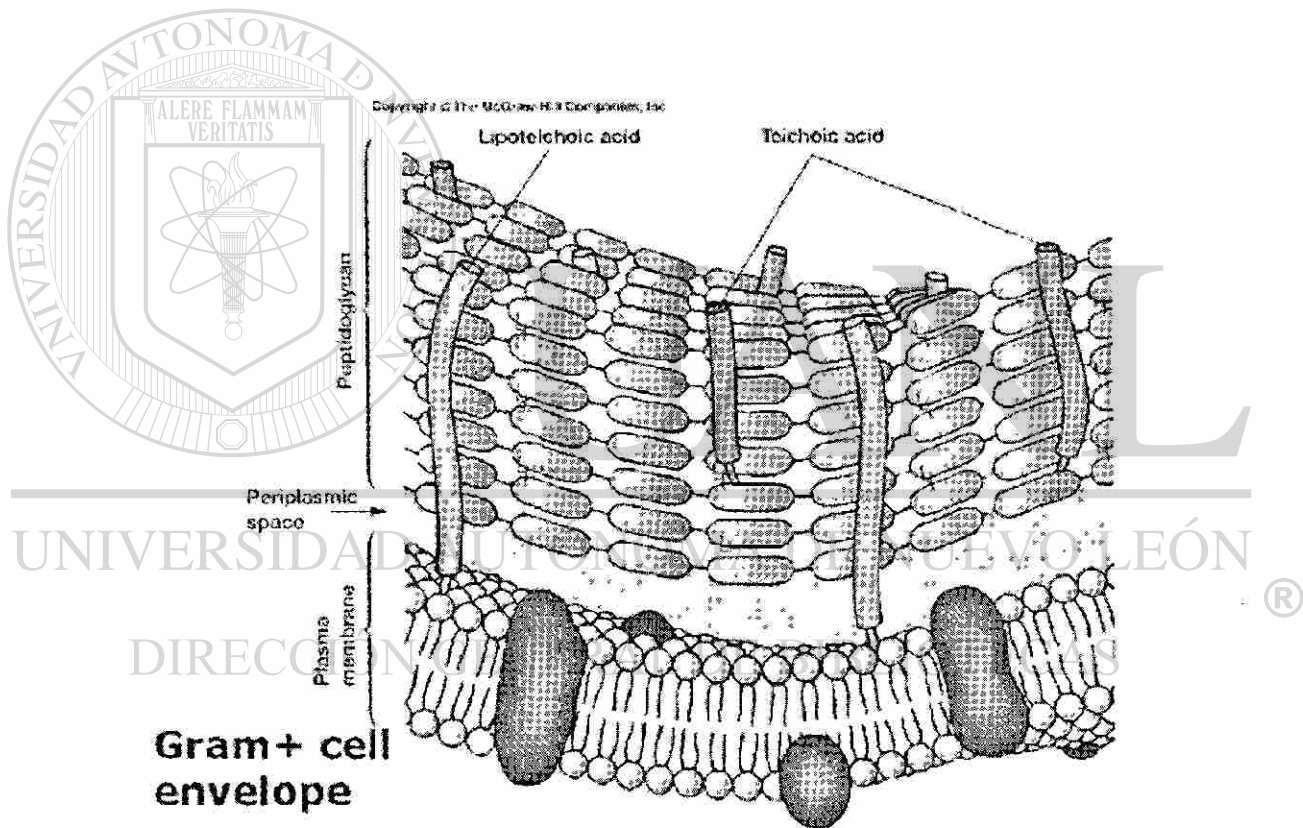
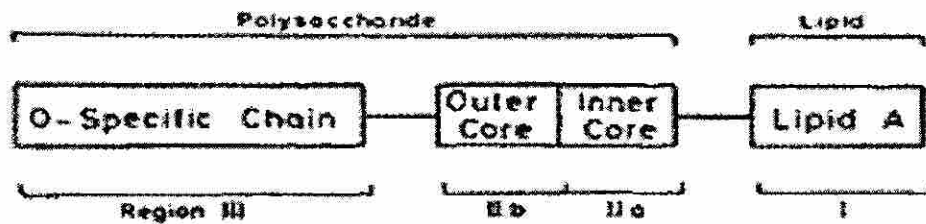


Figura 3.- Estructura de la superficie de la célula de una bacteria Gram-positiva.

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



(115)

Figura 4.- Arquitectura general del lipopolisacárido.

El LPS muestra una variedad de actividades que están asociadas con la porción de el lípido A, el cual es reconocido por el sistema inmune y está relacionado a la patogénesis de sepsis por bacterias Gram-negativas y shock séptico. Muchos de los fenómenos patofisiológicos sistémicos y

locales producidos por el LPS en el huésped expuesto es el resultado de la

habilidad de el LPS para activar las células inflamatorias de el huésped (células de la línea mieloide: monocitos, macrófagos y leucocitos

polimorfonucleares) (52).

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

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

(52)

1.3 Receptores de Lipopolisacáridos

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

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

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

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

(52)

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

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

1.4 Vías de transmisión de señales asociadas a lipopolisacáridos

Un número de cascadas de fosforilación incluyendo la vía de el MAPK (Proteínas quinasas activadas por mitógenos) y la vía de activación de el

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

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

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

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

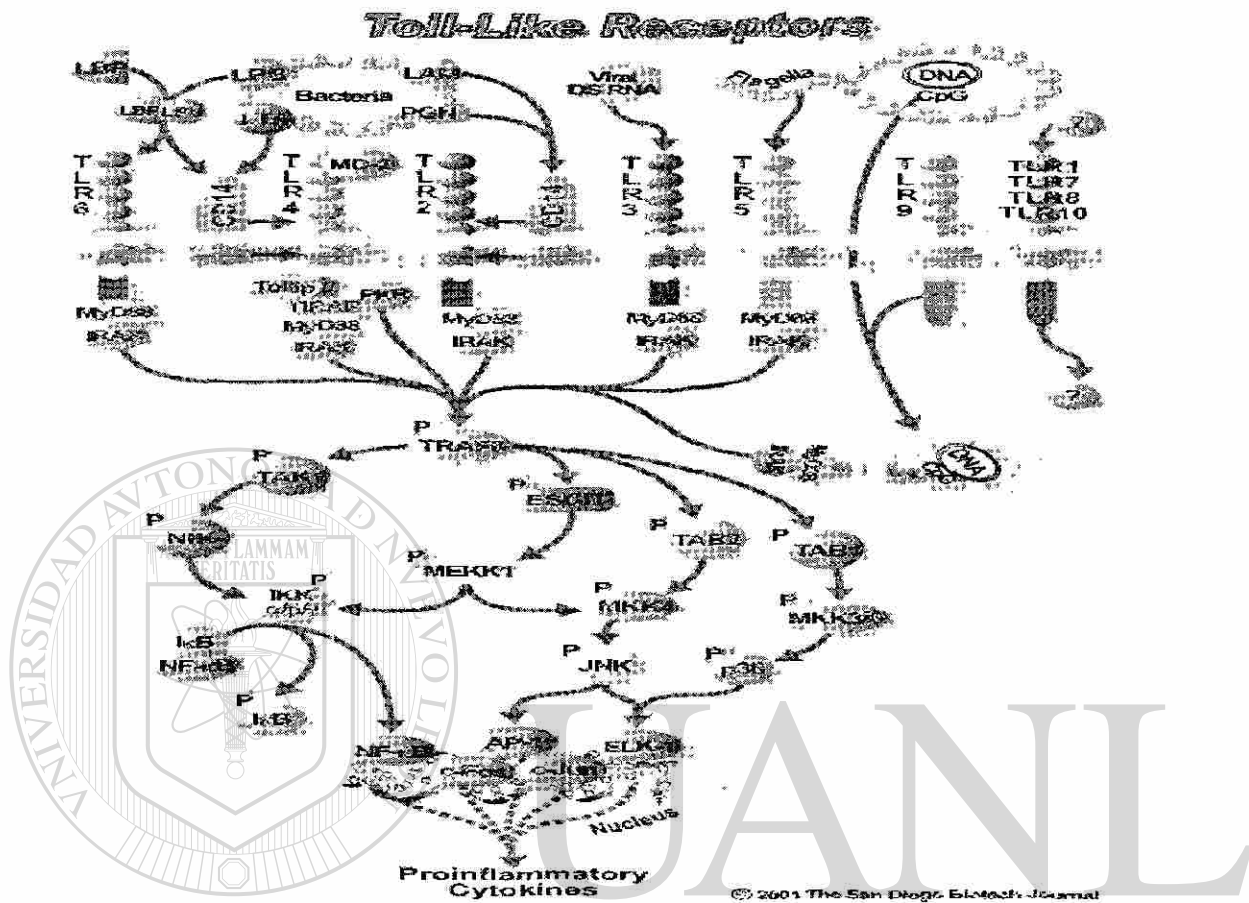
Las PKC se refieren a una familia de quinasas dependientes de fosfolípidos y calcio que catalizan la fosforilación de residuos de serina y

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

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

El NF- κ B es activado en respuesta a varios estímulos incluyendo LPS y TNF- α . Después de el estímulo con LPS el NF- κ B es activado en todos los tejidos de el organismo. La inhibición selectiva de el NF- κ B *in vivo*, ha mostrado reducir la síntesis de óxido nítrico inducible logrando prevenir la hipotensión sistémica asociada con shock séptico. Sin embargo, todos los

genes centrales involucrados en la patogénesis de el shock séptico contienen elementos promotores para NF- κ B tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Interleucina-6), IL-8 (Interleucina-8), sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), que regulan la síntesis de prostaglandinas de el ácido araquídico. Los macrófagos de ratones C3H/HeJ, no producen TNF- α , pero activan los niveles normales de NF- κ B en respuesta a LPS, indicando que los efectos celulares mediados por LPS no pueden ser solamente atribuidos al NF- κ B (59).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 5.- Vías de transmisión de señales

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.5 Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

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

autorregularse este proceso causa un desequilibrio entre los factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios y la muerte del enfermo por disfunción de órgano múltiple. La inducción de genes por diferentes factores de transcripción juega un papel fundamental en la expresión, intensidad y amplificación de la SRIS, debido a que estos factores incrementan la síntesis y expresión de el RNAm de los diferentes mediadores. De los factores de transcripción, el NF- κ B es el que más se ha estudiado como mediador de la respuesta inmune e inflamación en la sepsis, SRIS y shock. Este se identificó por primera vez como regulador de el gen de la cadena ligera kappa en linfocitos B y posteriormente en células endoteliales, macrófagos, hepatocitos, leucocitos y células epiteliales que son fundamentales como activadores de el SRIS ante el estímulo infeccioso. El

NF- κ B es un heterodímero citosólico, que consta de dos subunidades proteicas denominadas p65 y p50, también se han descrito otras como son Rel, RelB, vRel y p52. Habitualmente se encuentra inactivado por su inhibidor específico que incluye al complejo proteico I κ B que esta constituido por las proteínas I κ B alfa, I κ B beta, I κ B gamma, p105 y bcl3.

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

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

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

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

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

1.7 Interleucina-1 (IL-1)

La IL-1 tiene una amplia variedad de efectos biológicos a muy bajas concentraciones, algunas veces aún en concentraciones fentomolares. Es una molécula potente que es capaz de inducir su efecto a través de uno o dos receptores por célula. Los primeros efectos adjudicados a la IL-1 fueron

la inducción de fiebre, aumento de la respuesta de linfocitos y estimulación de la respuesta de fase aguda. Anteriormente la IL-1 era conocida como factor activador de linfocitos, pirógeno endógeno, entre otros. En humanos y ratones la IL-1 presenta dos formas funcionalmente activas: IL-1 α , e IL-1 β . La IL1- α , se encuentra predominantemente unida a membrana y la IL-1 β es secretada. La IL-1 parece funcionar como un mensajero con acción local y sistémica en los tejidos. La IL-1 es una citocina con efectos pleiotrópicos incluyendo actividad citostática y citotóxica en algunas líneas de células tumorales, activación de la función de células efectoras inmunológicas, aumento de resistencia a la infección, supresión de el rechazo de aloinjertos

de piel, protección de la radiación, aceleración de la recuperación de médula ósea después de altas dosis de quimioterapias. La IL-1 α estimula la producción de los macrófagos, granulocitos y factores estimulantes de colonias macrófago-granulocitos así como TNF- α , interferón- γ , IL-2, IL-6 e IL-8. Las propiedades inhibitorias de el crecimiento de IL-1 α han sido documentadas en melanoma, osteosarcoma y líneas celulares de carcinoma, así como estudios de xenoinjertos *in vivo* usando transplantes de líneas celulares de cáncer en ratones desnudos. Esta citocina se ha estudiado durante años debido a que juega un papel en la inflamación y patogénesis de enfermedades inflamatorias (98). En el sistema inmune la producción de IL-1 es inducida como resultado de la inflamación. La IL-1 β y el TNF- α , son prototipos de citocinas pro-inflamatorias. La IL-1 β es inducida

por productos y subproductos bacterianos (LPS) y actúa directa e indirectamente (vía inducción de otras citocinas) en las células presentadoras de antígeno y linfocitos T y B (98). Los efectos de la IL-1 no son limitados a la inflamación, esta citocina ha sido asociada con formación y remodelación del hueso, secreción de insulina, regulación del apetito e inducción de fiebre. La IL-1 es expresada en muchas células, como astrocitos, fibroblastos, hepatocitos, keratinocitos, células alveolares grandes tipo II, adipocitos, células tímicas, células T y eosinófilos, células dendríticas, macrófagos, monocitos, y oligodendrocitos. El TNF- α e IL-1 son

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.8 Interleucina-6 (IL-6)

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

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

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

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

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

Estos estudios parecen contradecir las propiedades anti-inflamatorias asignadas a la IL-6 y acentúan la necesidad para comprender la regulación de eventos mediados por la IL-6 y el efecto del IL-6Rs en lesiones artríticas. La IL-6 actúa como citocina pro y anti-inflamatoria, en ratones que no producen la IL-6 la ausencia de esta citocina se ha correlacionado con un incremento en la expresión de el TNF- α , INF- γ , GM-CSF, y MIP-2 (homóloga a IL-8 murina) y por una elevada neutrofilia. La IL-6 tiene la capacidad de limitar el reclutamiento de neutrófilos y suprimir la actividad de mediadores pro-inflamatorios (57). La IL-6 posee un papel anti-inflamatorio tanto en respuestas sistémicas y locales, interviniendo en el control de el

nivel de citocinas pro-inflamatorias pero no anti-inflamatorias, además las actividades anti-inflamatorias de la IL-6 no pueden ser compensadas por la IL-10 u otra familia de la IL-6 (141). El efecto patológico de esta citocina ha sido probado en varios modelos de artritis *in vivo* e inflamación intestinal crónica, esto puede parecer que la asignación de propiedades inflamatorias a la IL-6 depende de las condiciones clínicas en la cual esta participe (57). Las células que expresan IL-6 incluyen células T CD8⁺, fibroblastos, sinoviocitos, adipocitos, osteoblastos, megacariocitos, células endoteliales (bajo la influencia de endotelinas), neuronas de la corteza cerebral, células cromafinas de la médula adrenal, células del pigmento de la retina, células

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

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

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

1.9 Factor Necrótico Tumoral (TNF)

El TNF esta presente en dos formas α y β , con un 50% de homología. El TNF- β , (linfotoxina) es producido por linfocitos activados.

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

de líneas celulares transformadas, células de la musculatura lisa, microglia, astrocitos y fibroblastos también secretan TNF- α . La síntesis de el TNF- α , es inducida por diversos estímulos incluyendo interferones, IL-2, GM-CSF, SP (sustancia P), bradiquininas, complejos inmunes, inhibidores de ciclooxigenasas y factor activador de plaquetas (15). La producción de el TNF- α es inhibida por la IL-6, TGF-beta, vitamina D3, prostaglandina E2, dexametasona, ciclosporina A y antagonistas de el factor activador de plaquetas (6). El TNF- α humano es una proteína no-glicosilada de 17 kDa con 157 aminoácidos. El TNF- α murino es N-glicosilado. La homología con TNF- β es de aproximadamente 50 %. El TNF- α forma dímeros y trímeros. La forma de 17 kDa de el TNF- α es producida por procesamiento de una proteína precursora de 233 aminoácidos, se ha demostrado que una enzima

convertidora de TNF- α participa en esta conversión. También una forma transmembranal de 26 kDa ha sido descrita (27). La estructura de el gen de el TNF tiene un tamaño de aproximadamente de 3.6 kb y contiene 4 exones.

El transcrito primario es de 2762 nucleótidos y codifica para una proteína precursora de 233 aminoácidos. Aproximadamente hay 500-10000 receptores de alta afinidad ($K_a = 2.5 \times 10^{-9}$ M) para el TNF- α , expresados en todos los tipos de células somáticas con excepción de los eritrocitos. Se han descrito dos receptores; uno de 55 kDa (TNF-R1, nueva designación: CD120a, también llamado superfamilia de el receptor de TNF miembro 1A;

TNF-RSF1A) y otro de 75 kDa (TNF-R2; nueva designación: CD120b, también referido como miembro de la superfamilia de el receptor de TNF- β 1B; TNF-RSF1B). El análisis de delección en la región intracelular C-terminal de el receptor de 55 kDa, TNF-R1 ha revelado la existencia de el llamado dominio de muerte celular que esta involucrado en el proceso de señalización conduciendo a muerte celular programada (11). El dominio de muerte de TNF-R1 interactúa con una variedad de otras moléculas adaptadoras de señales, incluyendo TRAF y RIP. Los dos receptores conocidos unen a TNF- α y TNF- β . El receptor p55 es expresado particularmente en células susceptibles a la acción citotóxica de el TNF. El receptor p75 esta presente en muchos tipos de células, especialmente en aquellas de origen mieloide. Este es expresado fuertemente en linfocitos B y

células T. Las actividades de el TNF: inhibición del crecimiento y promoción de el crecimiento son probablemente mediados por la expresión diferencial y/o regulación de los receptores múltiples en combinación con otras proteínas distintas asociadas al receptor p55 parece jugar un papel crítico en las defensas del huésped en contra de microorganismos y sus factores patogénicos. (51, 84). Aparte de los receptores de membrana, varias proteínas solubles que unen al TNF han sido descritas, estas proteínas de aproximadamente 30kDa llamadas T-BP-1 y T-BP-2 (proteínas de unión al TNF), son derivadas de el receptor de membrana de el dominio de unión al TNF, pueden ser aisladas de orina y suero, y probablemente funcionan

como reguladores fisiológicos de actividades de el TNF al inhibir la unión de el TNF a su receptor. Las densidades de el receptor de TNF- α , son reducidas por IL-1 y promotores de tumor (esteres de forbol). La expresión de la densidad de el receptor de el TNF- α es inducida por INF- α , INF- β e INF- γ (20). La expresión de el TNF- α es dependiente de la activación de el factor de transcripción NF- κ B. Las regiones de unión al NF- κ B han sido identificadas en la región promotora de el gen de el TNF- α . El NF- κ B se une fisiológicamente a su proteína inhibitoria específica I κ B, en el citosol, cuando es activado, este complejo se disocia y el NF- κ B entra al núcleo. La activación de el NF- κ B puede ser inhibida por antioxidantes y la inhibición de interacción con su motivo es llevada a cabo por pentoxifilina. Entre los inhibidores de fosfodiesterasas empleados clínicamente, la pentoxifilina ha

sido la más extensamente estudiada en relación a la actividad supresora de el TNF (36). El TNF- α es un mediador clave de el síndrome de el shock séptico inducido por LPS o superantígenos bacterianos. Muchas de las respuestas celulares de el TNF- α han sido atribuidas a la activación de el receptor TNF α -R tipo I p55. En contraste poco es conocido acerca de la función de el receptor de TNF- α R tipo p75. Aunque ratones TNF α -R -/- parecen ser resistentes al shock endotóxico ellos son susceptibles a la muerte por infecciones bacterianas (140). El TNF- α se ha visto involucrado en la patogenia de múltiples enfermedades infecciosas (síndrome séptico,

meningitis bacteriana, malaria cerebral, SIDA), enfermedades autoinmunes (Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn's, sarcoidosis, esclerosis múltiple, síndrome de Kaeasaki, enfermedad de el huésped contra injerto, rechazo de transplantes), falla de órganos (síndrome diestres respiratorio de el adulto, falla congestiva de el corazón, infarto al miocardio, falla aguda de el hígado) (36). Por otra parte, se mencionan algunos agentes que inhiben el TNF- α :

IL-4, IL-10 (32, 36), factor de crecimiento transformante- β , factor neurotrópico ciliar; mediadores endógenos (corticosteroides, prostanoïdes, adenosina, histamina, óxido nítrico, ácido retinoico, ácidos grasos poli-insaturados n-3); drogas sintéticas (pentoxifilina, rolipram, ciclosporina A, clorpromazina, talidomida, ditiocarbamato-pirridolina, taurolidina, oligonucleótidos antisentido, guanilidrazona tetravalente, imidazoles

bicíclicos), inhibición de el procesamiento de el TNF- α , (inhibidores de metaloproteasas: compuesto 2, GI 12471), inhibición de los efectos de el TNF- α , (anticuerpos anti-TNF- α , receptores solubles de el TNF) (36).

1.10 Interleucina-8 (IL-8)

La IL-8 es un miembro de la subfamilia de quimiosinas CXC, descrita principalmente como un factor quimiotáctico de neutrófilos, producida por monocitos estimulados, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, keratinocitos, melanocitos, hepatocitos, condrocitos y un diverso número de líneas tumorales (127). En muchos tipos de células la síntesis de IL-8 es suprimida por la IL-1 y el TNF- α . La síntesis de IL-8 es inducida también por zimozan, fitohemaglutininas, concavalina A, RNA de doble hebra, esteroides de forbol, cristales de urato de sodio, virus y lipopolisacáridos bacterianos (31). Los glucocorticoides, IL-4, TGF- β , inhibidores de 5' lipoxigenasa y 1,25(OH) $_2$ vitamina D $_3$ inhiben la síntesis de IL-8 (92). El gen de la IL-8 humana, es de 5.1 kb y contiene cuatro exones. La región 5' de el gen de

IL-8 contiene sitios de uniones para varios factores nucleares incluyendo factor-1 y factor-2 de activación, factor-1 regulatorio de INF, factor-1 nuclear de hepatocitos, un elemento de respuesta a glucocorticoides y un elemento de shock térmico (8). El receptor de la IL-8 es una glicoproteína dimérica (59 kDa y 67 kDa) conocida como CD128, es expresado en diferentes tipos de células incluyendo aquellos en los que no responden a IL-8. La densidad de el receptor es de aproximadamente 20000 X célula en neutrófilos y aproximadamente 300 X célula en linfocitos T. El receptor de IL-8 es un miembro de una familia de receptores unidos a la proteína G, existen al

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

La IL-8 incrementa el metabolismo de las especies de oxígeno reactivos e incrementa la quimiotaxis y la expresión aumentada de moléculas de adhesión. La IL-8 por sí misma no libera histamina,

actualmente se sabe que esta citocina inhibe la liberación de histamina de basófilos humanos inducidos por factores liberadores de histamina, proteína-3 activadora de el tejido conectivo (CTAP-3) e IL-3 (73). La IL-8 es quimiotáctica para todos los tipos de células inmunes migratorias, la IL-8 inhibe la adhesión de leucocitos a células endoteliales activadas y además posee actividades anti-inflamatorias. La forma de 72 aminoácidos de IL-8 es diez veces más potente en inhibir la adhesión de neutrófilos que la variante de 77 aminoácidos (74). La IL-8 derivada de macrófagos participa en los desórdenes dependientes de angiogénesis tales como artritis reumatoide,

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

1.11 Interleucina-12 (IL-12)

La IL-12 conocida anteriormente como Factor de maduración de linfocitos citotóxicos (CLMF), Factor estimulante de células natural killer (NKSF), Factor de maduración de linfocitos T citotóxicos (TcMF) y Factor estimulante de células T (TSF), es una citocina compuesta de dos subunidades (p40 y p35), producida por macrófagos-monocitos, células B y

otros tipos de células accesorias (7). Los más potentes inductores de IL-12 son bacterias, productos bacterianos y parásitos. La IL-12 es producida después de la estimulación con esteres de forbol o ionoforo de calcio por células linfoblastoides B humanas. Esta citocina heterodimérica es una reguladora central de la respuesta inmune, producida por células mielomonocíticas, induce fuertemente la respuesta inmune Th1 especialmente debida a su habilidad para inducir la secreción de INF- γ por las células NK y células T. En ausencia de IL-12 una respuesta Th2 puede emerger conduciendo a la secreción de citocinas tales como IL-4, IL-10 e IL-

13. Estas citocinas Th2, especialmente IL-10, disminuye la regulación de la producción de INF- γ derivado de Th1 y de IL-12 derivadas de células presentadoras de antígeno (116). La subunidad p40 muestra alguna homología con el dominio extracelular de el receptor para la IL-6 y p35 parece ser homólogo de IL-6 (44). El receptor de IL-12 parece ser una sola proteína de aproximadamente 110 kDa. Más de 1000 a 9000 receptores de alta afinidad por célula de IL-12 son expresados en células mononucleares de sangre periférica activadas por varios mitógenos de célula T o por IL-12. Los receptores de IL-12 están presentes en células T activadas que expresan CD4, CD8 y en células asesinas naturales CD56 positivas. Las células mononucleares de sangre periférica sin estimular y células B de ganglios, no expresan el receptor de IL-12. Los híbridos heterodímeros de

las subunidades p40 humana y p35 murino retienen su bioactividad en células murinas. La IL-12 murina es activa en linfocitos humanos y murinos.

La subunidad p40 de la IL-12 murina (IL-12p40) ha demostrado específicamente antagonizar los efectos de el heterodímero de IL-12 en diversas pruebas funcionando como un inhibidor específico endógeno para el heterodímero de IL-12 (85).

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

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

El STAT4 es el factor de transcripción empleado por IL-12. La IL-12 es crítica en peritonitis séptica debido a que promueve la respuesta inflamatoria durante la endotoxemia (80). La IL-12 participa en los procesos inflamatorios tempranos debido a que aumenta la producción de INF- γ . La IL-12 parece ser un componente vital en la defensa de el huésped en contra de organismos gram-negativos y positivos, debido a la resistencia de el

huésped conferida por la administración de IL-12 en varios modelos de infección bacteriana. Sin embargo, los efectos pro- inflamatorios de IL-12 pueden ser mortales durante el proceso de sepsis.

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

1.12 Interleucina-10 (IL-10)

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

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

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

de colitis en ratones deficientes de IL-10, junto con las conocidas propiedades inmunomodulatorias y anti-inflamatorias de esta citocina han tomado en consideración a la IL-10 como un tratamiento para la enfermedad inflamatoria del intestino (60).

1.13 Oxido nítrico

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

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

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

Una vez expresada la iNOS produce grandes cantidades de NO por largos períodos de tiempo, es de hacer notar que en la nomenclatura inicial de las isoformas tanto de eNOS y nNOS fueron caracterizadas como constitutivas contrastando con el carácter inducible de iNOS. Sin embargo,

esta distinción ha sido abandonada, desde que se conoce que los niveles de la expresión de el gen tanto de eNOS y nNOS pueden ser inducidos también bajo diferentes condiciones fisiológicas y que iNOS puede funcionar como una enzima constitutiva bajo condiciones fisiológicas en algunas células. Las diferentes isoformas de NOS catalizan la oxidación 5-electrón de uno de los nitrógenos de L-arginina, produciendo NO y citrulina. La reacción involucra oxígeno molecular y difosfonucleótido de nicotinamida (NADPH) como sustrato y requiere varios cofactores incluyendo un grupo hemo conteniendo hierro (protoporfirina IX-hierro), flavin-adenin-mononucleótido (FAD) y tetrahidrobiopterina. Los electrones derivados de

NADPH son almacenados por las flavinas y entonces transferidas al grupo prostético hemo permitiendo la reducción de el hierro y la subsecuente activación y ruptura de el oxígeno molecular. Un átomo de oxígeno es liberado como agua y el otro es incorporado a la L-arginina dando como resultado el producto intermediario N-hidroxi-L-arginina (NOHA). La incorporación de un átomo más de oxígeno a NOHA produce NO y su co-producto L-citrulina. La biosíntesis de el NO depende de la unión a la enzima de la calmodulina que es una proteína regulatoria de el calcio que controla la transferencia de electrones de el dominio reductasa de NOS (que une NADPH y las flavinas) al dominio catalítico oxigenasa de la enzima (que une hemo, BH4 y L-arginina). La unión de calmodulina a eNOS y nNOS es promovida por calcio, mientras que calmodulina es levemente unida a iNOS

como un grupo prostético. Así la actividad de eNOS y nNOS es regulada por calcio intracelular, mientras iNOS es mantenida en un estado activado independientemente de el calcio (79). En los últimos años se ha demostrado que un aumento en la producción de el NO esta relacionado con un incremento en la expresión de iNOS el cual esta implicado en la patogénesis de un número de enfermedades incluyendo shock circulatorio de varias etiologías, en particular shock séptico. Varios estudios han reportado un incremento en nitritos y nitratos, los cuales son productos estables de la oxidación de el NO y marcadores de la biosíntesis de el NO en pacientes sépticos. Las concentraciones de nitritos y nitratos, en el

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

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

Debido al importante papel de el NO como un importante mediador de el shock séptico, se han implementado estrategias terapéuticas principalmente encaminadas a interferir con la vía L-arginina/NO. Se han propuesto 5 estrategias diferentes para llevar a cabo este propósito e incluyen: 1).- prevenir la expresión de iNOS, 2).- inhibición de la actividad

catalítica de NOS, 3).- reducción de la disponibilidad de la L-arginina, 4).- modulación de mensajeros secundarios, principalmente la vía guanilato-ciclasa-GMPc y 5).- el empleo de moléculas capaces de disociar al NO mismo. Entre todas estas modalidades terapéuticas la inhibición de la actividad catalítica de la NOS es considerada la más factible. Varias estructuras análogas de la L-arginina, que sustituyen al nitrógeno guanidino terminal, han demostrado actuar como inhibidores competitivo de NOS, N^G-monomethyl-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NA) y su methylester (L-NAME). Una importante característica de estas moléculas es

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

1.14 Definición de el Factor de Transferencia

La respuesta de inmunidad mediada por células de donadores inmunes a recipientes no inmunes fue primero descrita por Landsteiner y Chase en los inicios de 1940 (63). El Factor de Transferencia (FT) es el término empleado para definir a una variedad de sustancias presentes en los extractos dializables de leucocitos que pueden ser extraídos de células linfoides de humanos y de otros mamíferos (16, 68), que han demostrado

transferir hipersensibilidad de tipo retardado e inmunidad protectora de el huésped a un animal o humano inmunodeficiente o inmunocomprometido (111). La presencia en los linfocitos de una sustancia comúnmente llamada FT y el papel de esta sustancia como portador de la memoria inmune celular fue primero demostrada por H.S. Lawrence (78). Se ha demostrado que la sustancia referida como FT es una mezcla de sustancias las cuales pueden ser definidas por sus propiedades químicas, perfil espectrofotométrico y principalmente por las propiedades biológicas de transferir inmunidad celular contra uno o una variedad de antígenos (64). El componente activo

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

1.15 Obtención de el Factor de Transferencia

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

1.16 Caracterización de el Factor de Transferencia.

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 3.- Actividades de el FT independientes de antígeno

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

Tabla 4.- Actividades de el FT dependientes de antígenos

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

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

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

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

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

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

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

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

Se han encontrado en el dializado de leucocitos ocho moléculas con actividades moduladoras, de las cuales seis moléculas tienen actividad amplificadora y dos tienen actividad supresora. Se considera usar el

material amplificador en el tratamiento de condiciones anérgicas y condiciones de hiposensitividad inmune, tanto local y sistémica. Mientras el

material supresor es empleado para la preparación y tratamiento de condiciones de hipersensibilidad local tales como veneno de hiedra y otros.

Los factores inductores y supresores específicos de antígeno se pueden encontrar en la fracción de el dializado $< 12,000$ Da, con una mezcla de moléculas con actividades semejantes a adyuvantes no específicas como serotonina, bradikinina, ascorbato, nicotinamida, prostaglandinas, nucleótidos cíclicos y timosina α -1. Cuando los dializados son preparados de linfocitos purificados por Ficoll-Hypaq todos estos materiales y

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

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

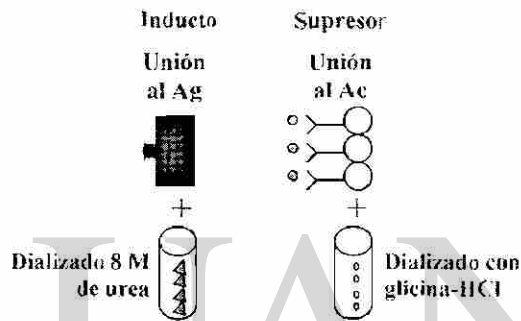
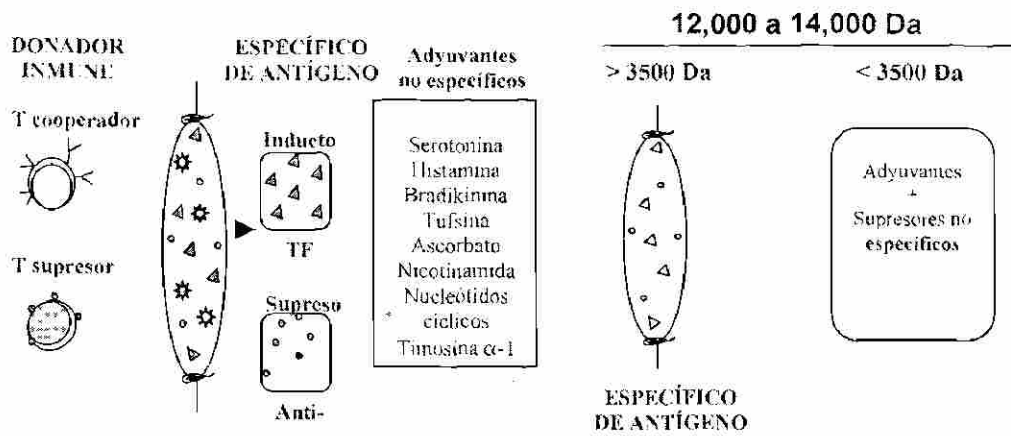


Figura 6.- Análisis cualitativo de el dializado de leucocitos conteniendo factores supresores y factores inductores de varias especificidades, aislamiento y purificación por diálisis diferencial e inmunoabsorción de afinidad.

Tabla 6.- Propiedades inductoras-cooperadoras de el FT

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

Tabla 7.- Propiedades supresoras del FT

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

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

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

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

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

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

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

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

1.17 Hipótesis

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

1.18 Objetivos

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 2

Materiales y Métodos

2.1 Animales

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

2.2 Elaboración del Extracto Dializable de Leucocitos bovino (EDLb)

El Extracto Dializable de Leucocitos Bovino, (Producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias

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

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

2.3 Lipopolisacáridos

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

2.4 Tratamientos

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

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

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

El EDLb (1U) fue disuelto en 0.2 ml de agua inyectable libre de pirógenos e inyectado vía intramuscular a diferentes tiempos (30 min, 4, 8 y 12 h) después de el tratamiento con LPS (17 mg/kg). Los animales control recibieron como tratamiento 0.2 ml de agua inyectable libre de pirógenos vía i.m. o EDLb (1U) vía i.m. Para cada uno de los tratamientos se formaron grupos de 10 ratones y se monitorearon morbilidad, mortalidad y sobrevivencia por un período mayor de 72 horas. Posteriormente, los animales se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente fue colectado el bazo mediante esplenectomía radical y la sangre mediante punción cardíaca a intervalos regulares de tiempos

una vez que recibieron el tratamiento con LPS, EDLb, o LPS + EDLb (30 minutos, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas). El RNA total fue aislado de los bazos para el análisis de el RNAm de citocinas pro-inflamatorias mediante RT-PCR y el suero fue conservado a -70°C para la determinación de citocinas por ELISA.

2.4.3 Obtención, tratamiento y cultivo de macrófagos peritoneales murinos.

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

Una vez obtenidas las células, se centrifugaron a 1200 RPM por 10 minutos, se lavaron 2 veces con medio de cultivo RPMI-1640 estéril. Los macrófagos peritoneales fueron cultivados en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA) a una concentración de 1.6×10^6 células

/ ml en medio de cultivo RPMI-1640 completo (conteniendo 10% de SFB inactivado y 1% de una solución penicilina estreptomocina), se incubaron durante 2 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%CO₂, para permitir la adherencia de los macrófagos al plástico, después se decanto el medio y se estimularon con LPS (Lipopolysaccharide from E. coli 026:B6 Sigma Chemical. St.) en un rango de dosis de 1 a 100 µg/ml para determinar la dosis que inducía una mayor producción de LPS durante un período de incubación de 72 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y 5%O₂. Todos los tratamientos se ajustaron a un volumen final de 200 µl.

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

2.4.4 Determinación de la producción de citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-10 en macrófagos peritoneales murinos mediante ELISA

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

2.4.5 Determinación de la producción de citocinas pro-inflamatorias

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

2.4.7 Determinación de la Viabilidad Celular

Al final de todos los experimentos se determino la viabilidad celular empleando el colorante azul trypan (Sigma Chemical ST.

Louis MO). El empleo de el azul trypan permite determinar la diferenciación entre una célula viva de una muerta mediante exclusión celular.

2.5 ELISA

(Enzyme-linked immunosorbent assay)

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

Procedimiento:

1.- Se determina el número de tiras a usar

2.- Se adicionan 100 μ l del buffer diluyente standard al pozo cero

3.- Se adicionan 100 μ l de cada uno de los standard a los pozos apropiados

4.- Se adicionan 50 μ l del buffer diluyente standard por pozo + 50 μ l de la muestra problema

6.- Se adicionan 50 μ l del anticuerpo Anti-TNF- α biotinilado (Conjugado de biotina) en cada pozo excepto en el blanco del cromógeno.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Preparación de reactivos

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

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

Buffer Diluyente Estandar: se emplea sin diluir.

Reconstitución de el estandar:

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

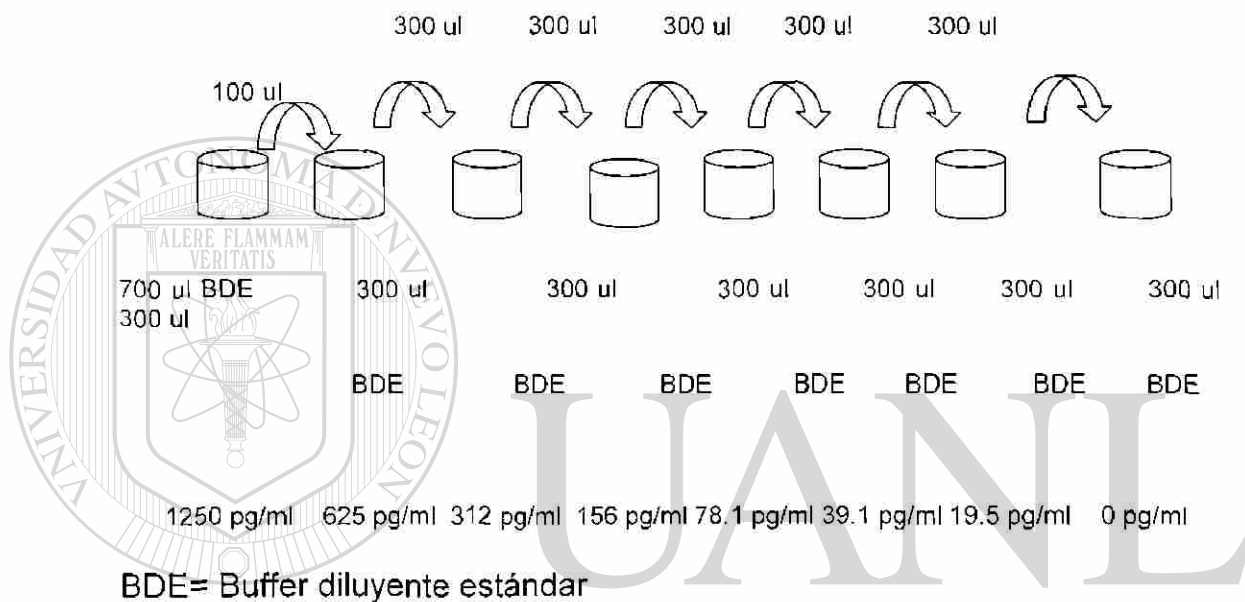


Figura 7.- Dilución de el buffer diluyente estándar

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

Almacenaje y Reconstitución de Estreptavidina-HRP 100X:

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

2.6 RT-PCR

(reverse transcription-polymerase chain reaction)

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

Aislamiento de el RNA total (TRIZOL Reagent)

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

Hígado y Bazo: 6-10 μg

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Células epiteliales: 8-15 μg

Fibroblastos: 5-7 μg

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

Homogenización:

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

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

Fase de Separación

2.- Se incuba la muestra por 5 minutos a $15-30^{\circ}\text{C}$

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

4.- Se agita la muestra durante 15 segundos

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.- Se centrifugan las muestras a $12,000 \times g$ / 15 minutos a $2-8^{\circ}\text{C}$

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

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

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

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

Precipitación

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

10.- Se incuba a 15-30°C / 10 minutos

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

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

Lavado de el RNA

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

13.- Se mezcla mediante agitación en vortex

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

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

Disolviendo el RNA

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

17.- Se calcula la concentración de el RNA total, haciendo una dilución de las muestras de el RNA: 1.1000 = 1 µl RNA + 999 µl de agua o 1.500 = 2 µl de RNA + 998 µl de agua. Se lee la absorbancia a 260 nm y se

hacen los siguientes cálculos $RNA(ug/ul) = (DO_{260nm})(dilución)(.05ug/µl)$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

- 1 μ l de Oligo (dt)12-18 (500 μ g/ml)
- 2 μ l de RNA total (1ng a 5 μ g de RNA total)
- 1 μ l del stock de 10 mM dNTP Mix
- 8 μ l de agua destilada estéril
- 4 μ l de 5X First-Strand Buffer

2 μ l de 0.1 M DTT

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

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

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

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

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

Se obtiene un volumen total de : 16.372 µl

La reacción de el PCR para determinar los genes de las citocinas pro-inflamatorias de ratón se llevo a cabo en un termociclador PTC-200,

Peltier Thermal Cycler. (MJ RESEARCH INC. Masachussetts, USA).

involucrando un periodo de desnaturalización de 4 min a 94°C; además de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 2 min y 72°C por 2 min seguido por una extensión final a 72°C por 7 min. El tamaño del DNA amplificado fue de 658 pb para GAPDH, 538 pb para IL-10, 453 pb para IL-6, 351 pb para TNF- α , 294 pb para IL-1 β , 237 pb para IL-12 p40 (MPCR Kits for Mouse Sepsis Cytokines Set-2 Cat.#: SEP-M152G, SEP-M112G& SEP-M554 G, Instruction Manual, Maxim Biotech, Inc.) El tamaño y la cantidad

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

La reacción de PCR para determinar los genes de las citocinas pro-inflamatorias de humano llevo a cabo en un termociclador PTC-200, Peltier Thermal Cycler (MJ RESEARCH INC. Masachussetts, USA) empleando un multikit conteniendo primers específicos (MPCR Kits For Human Sepsis Cytokines Set-2. Cat. #: SEP-M052G & SEP-M012G Maxim Biotech, Inc. SAN FRANCISCO, CA.). El Kit fue usado de acuerdo a las especificaciones de el fabricante. Involucrando un período de desnaturalización de 4 min a 94°C; además de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 2 min y 72°C por 2 min seguidos de una extensión final a 72°C por 7 min. El tamaño de el DNA amplificado fue de 922 pb para

GAPDH, 682 pb para TNF- α , 528 pb para IL-1 β , 433 pb para IL-12 p40, 358 pb para IL-6, 300 pb para IL-8 y 228 pb para IL-10. Una vez concluida la reacción de PCR, se toman 8 – 10 μ l de esta reacción y se combina con 1.5 μ l de jugo azul, para determinar la expresión de los genes, en un gel de agarosa al 2%, con un voltaje de 90 volts, y un buffer de corrida al 1X. El tamaño y la cantidad de los productos de PCR fueron analizados por electrofóresis en geles de agarosa al 2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

2.7 Determinación de óxido nítrico basado en la reacción de Greiss

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

de nitritos en las muestras fueron determinadas como μM de NO_2^- / ml empleando una curva estándar para nitritos la cual fue incluida en cada prueba.

CAPITULO 3

Resultados

3.1 Efecto dosis-respuesta de la administración de el LPS

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

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

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

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

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 incrementó 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 determinó 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 observó un incremento en la expresión de citocinas (TNF- α e IL-8) y la

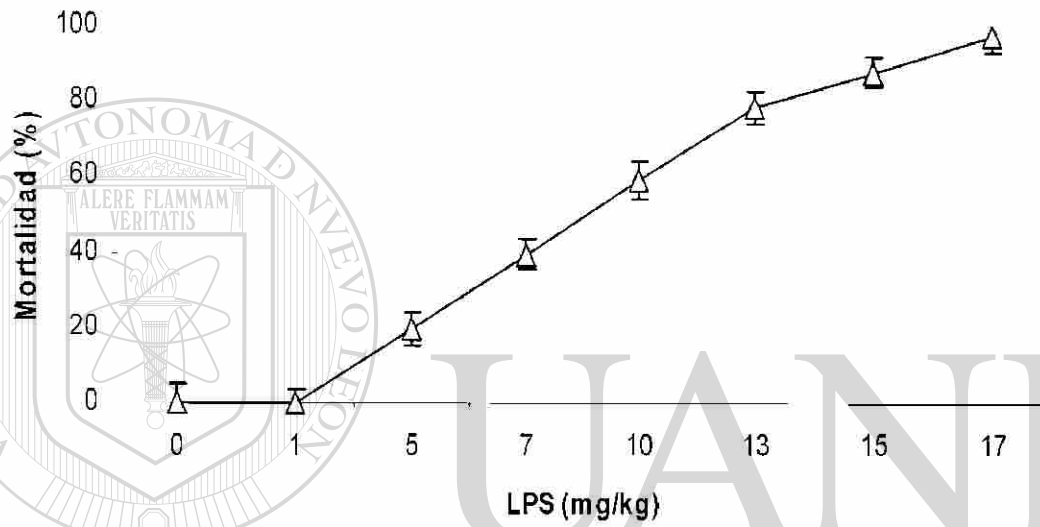
inducción de la expresión de el RNAm de IL-1 β , IL-12p40, IL-6 e IL-10. El tratamiento con EDLb (1 U) en CMNPH estimulada con LPS (50 ng/ml) disminuyó la expresión de el RNAm de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y suprimió la expresión de el RNAm de IL-12 p40 e IL-10, sin afectar la expresión de el RNAm de IL-8.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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

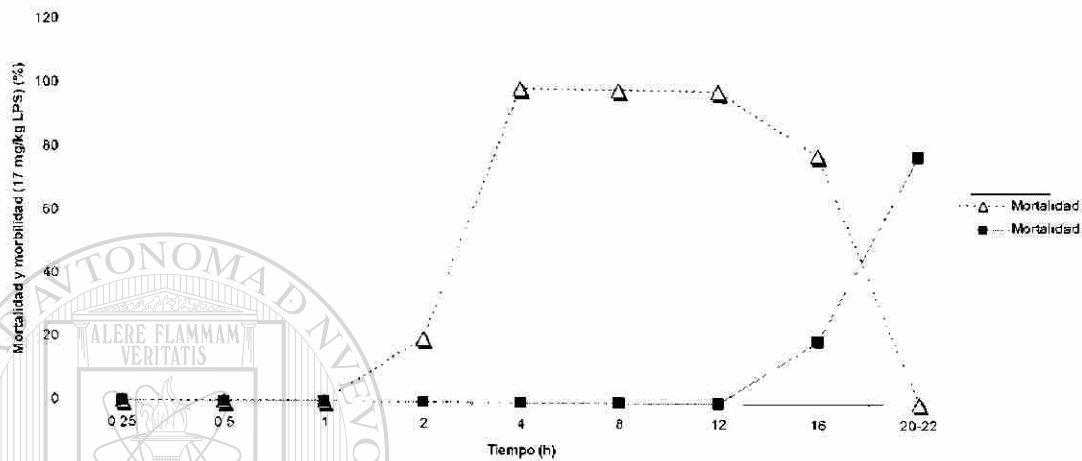
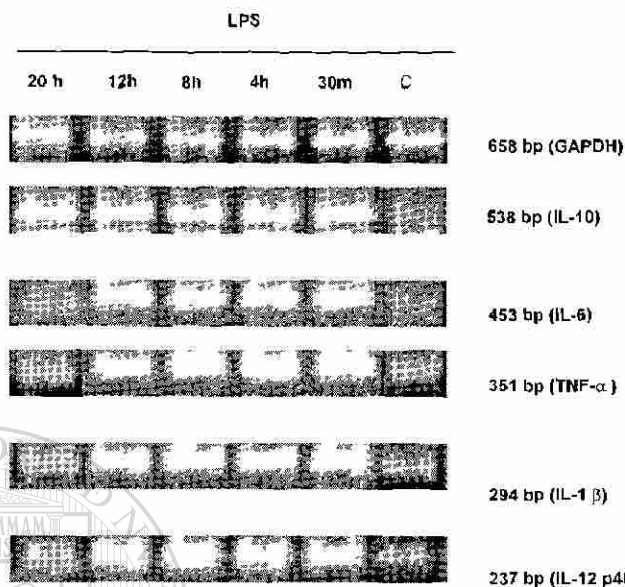


Figura 9. Curva de Mortalidad y Morbilidad inducida por la dosis letal de LPS (17 mg/kg). Ratonés Balb/C (n=30) fueron inyectados i.p. con una dosis de 17 mg/kg de LPS y su morbilidad y mortalidad fue monitoreada durante 24 horas. Los resultados son presentados como porcentajes de morbilidad y mortalidad.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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



A

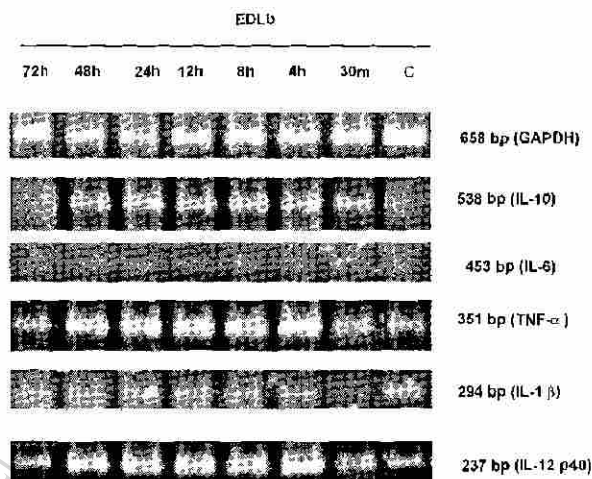
Citocinas	Control	30 min	4 h	8 h	12 h	20 h
IL-10	0 ± 0	8.2 ± 0.3**	8.1 ± 0.2**	8.1 ± 0.4**	8.1 ± 0.3**	8.2 ± 0.5*
IL-6	0 ± 0.5	11 ± 0.6**	10 ± 0.3**	9.5 ± 0.2**	10 ± 0.5**	0 ± 0.4
TNF-α	0.7 ± 0.2	17.4 ± 0.3**	18.2 ± 0.3**	16.8 ± 0.2**	9.5 ± 0.5**	0.8 ± 0.5
IL-1β	0.7 ± 0.4	18 ± 0.2**	17.7 ± 0.4**	17.7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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



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.



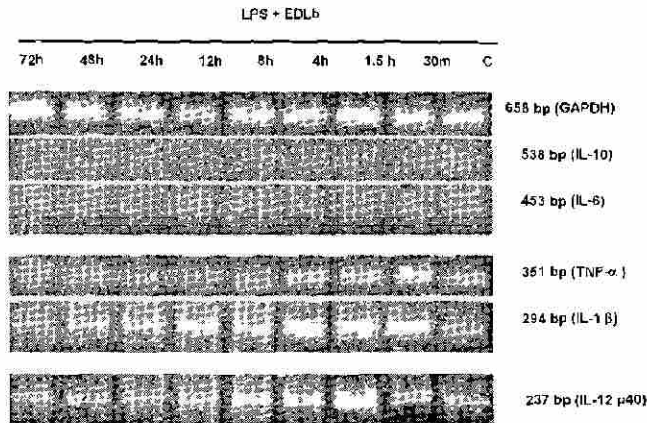
A

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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.



A

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-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

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 bazos 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-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.

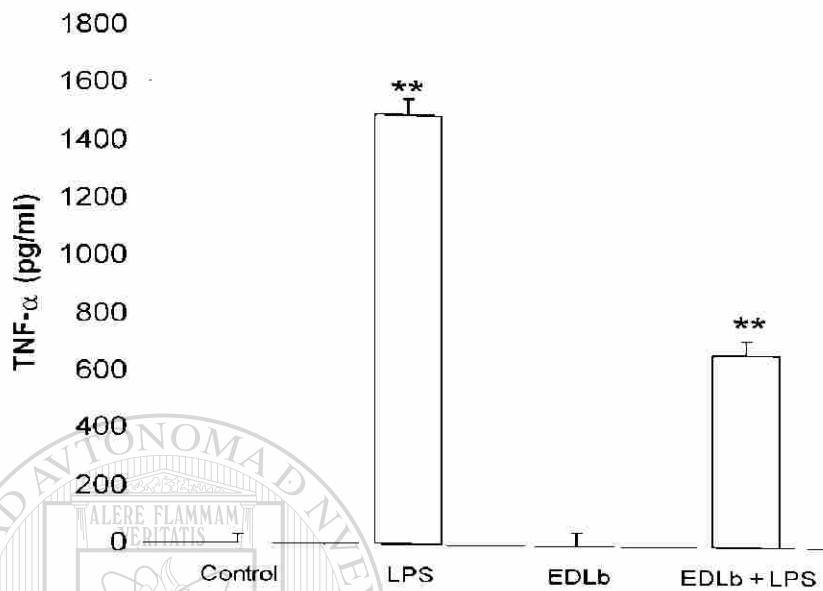


Figura 13. Efecto de el EDLb en la producción de el TNF- α en el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS. Grupos de animales (n=10) control, bDLE, y LPS fueron inyectados i.m. o i.p. con agua libre de pirogenos, EDLb (1 U), o LPS (17 mg/kg), respectivamente. Ratones Balb/C (n=10) fueron inyectados 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.

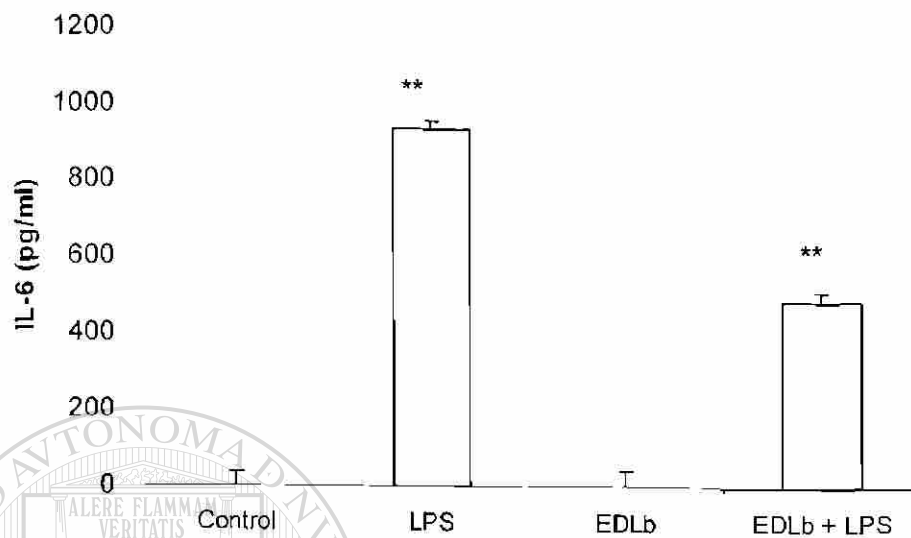


Figura 14. Efecto de el EDLb en la producción de IL-6 en el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS. Grupos de animales (n=10) control, bDLE, y LPS fueron inyectados i.m. o i.p. con agua libre de pirogenos, EDLb (1 U), o LPS (17 mg/kg), respectivamente, Ratonas Balb/C (n=10) fueron inyectados 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.

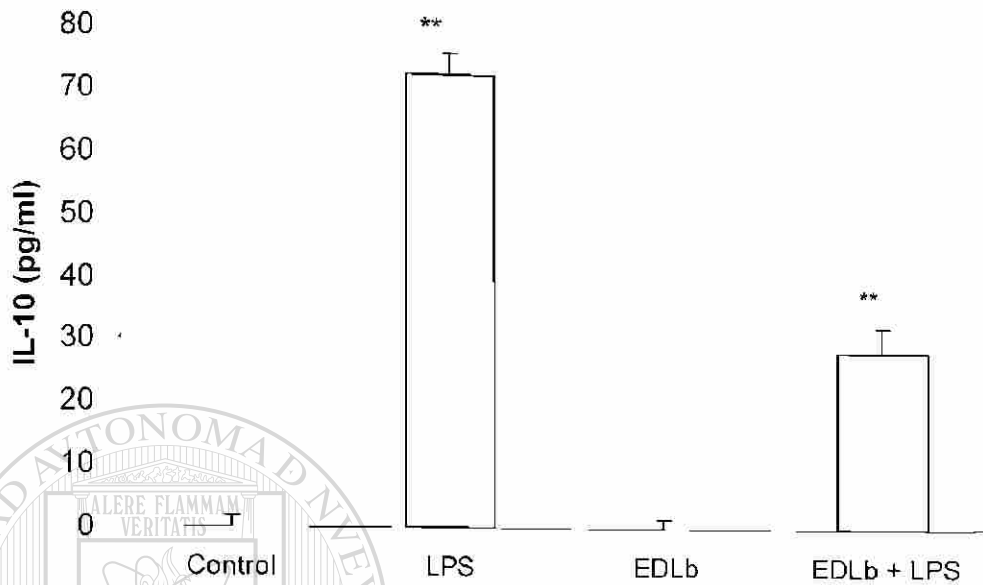


Figura 15. Efecto de el EDLb en la producción de IL-10 en el shock endotóxico en ratones inducido por el LPS. Grupos de animales (n=10) control, bDLE, y LPS fueron inyectados i.m. o i.p. con agua libre de pirogenos, EDLb (1 U), o LPS (17 mg/kg), respectivamente. Ratones Balb/C (n=10) fueron inyectados 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 líbre 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.

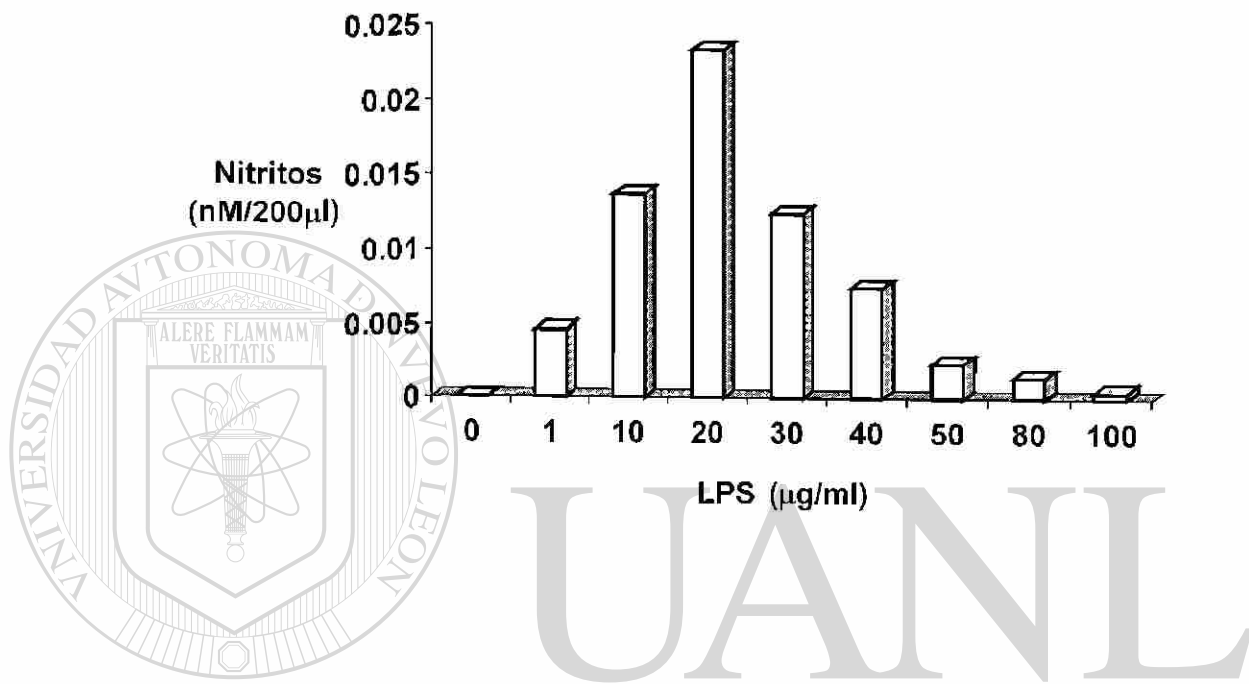
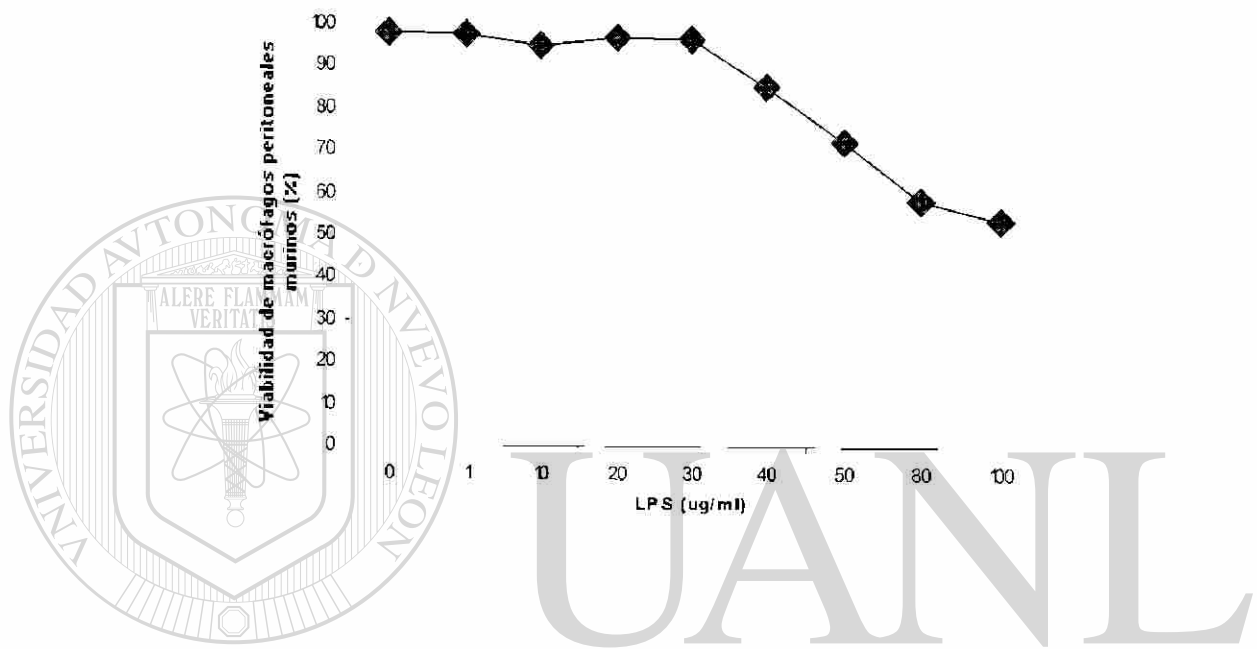


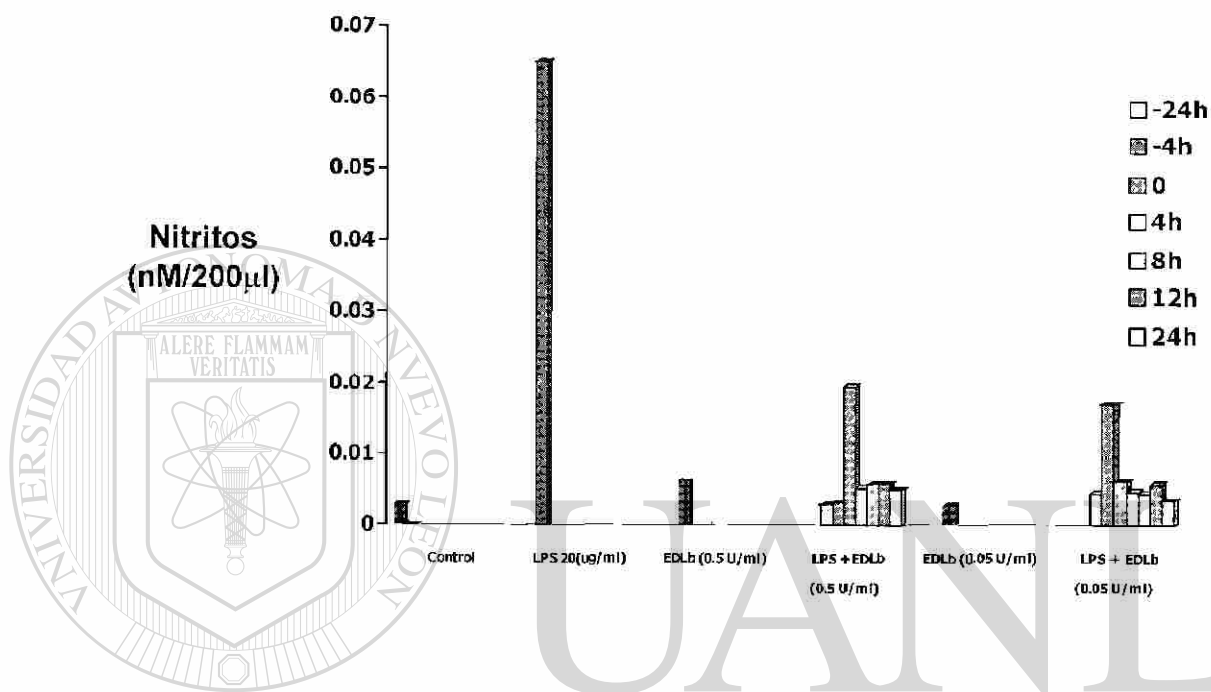
Figura 16. Efecto de el LPS sobre la producción de el óxido nítrico en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una densidad celular de 1.6×10^6 cells/ml en placas de 96 pozos y tratados con LPS (0, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, y 100 mg/ml) e incubados en una atmósfera a 37°C con 95% O_2 y 5% CO_2 durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron colectados para determinar la producción de ON empleando el reactivo de Greiss.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

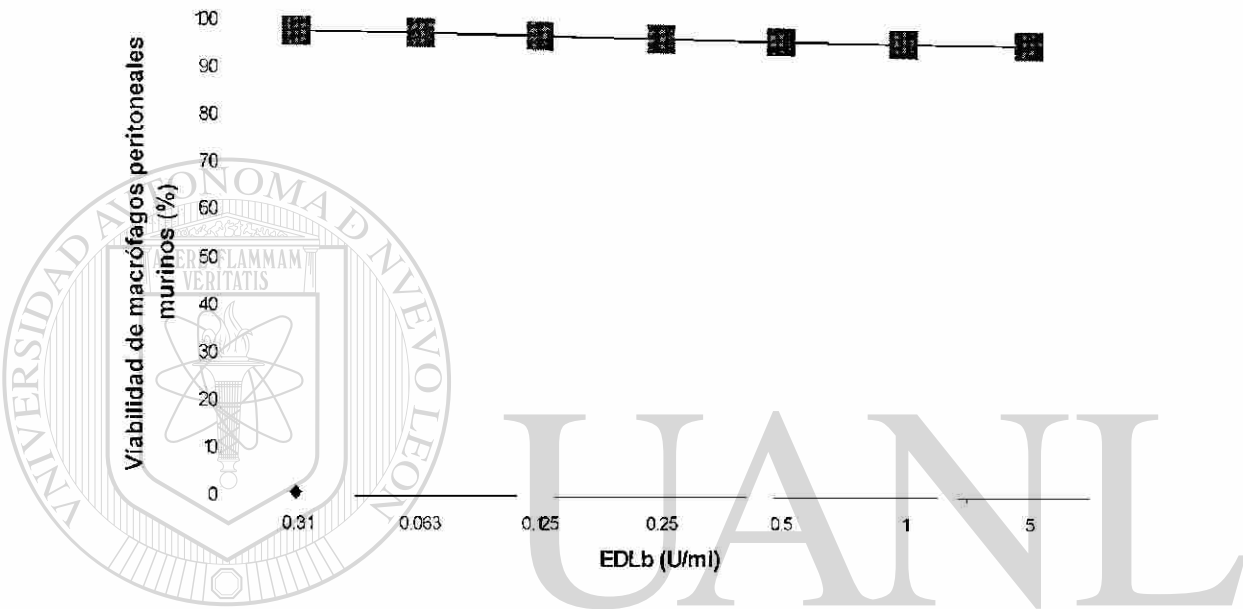


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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% O_2 y 5% CO_2 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% O_2 y 5% CO_2 durante 72 horas. Los sobrenadantes fueron colectados para la evaluación de el ON mediante el reactivo de Greiss.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

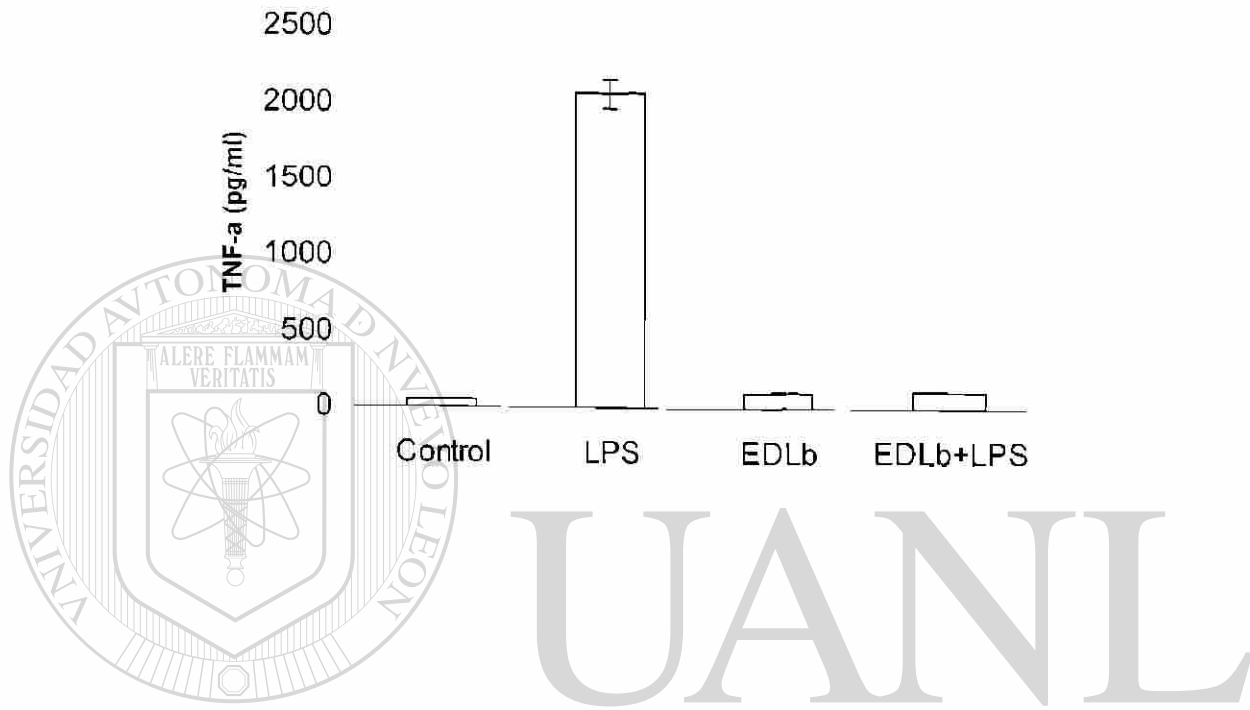
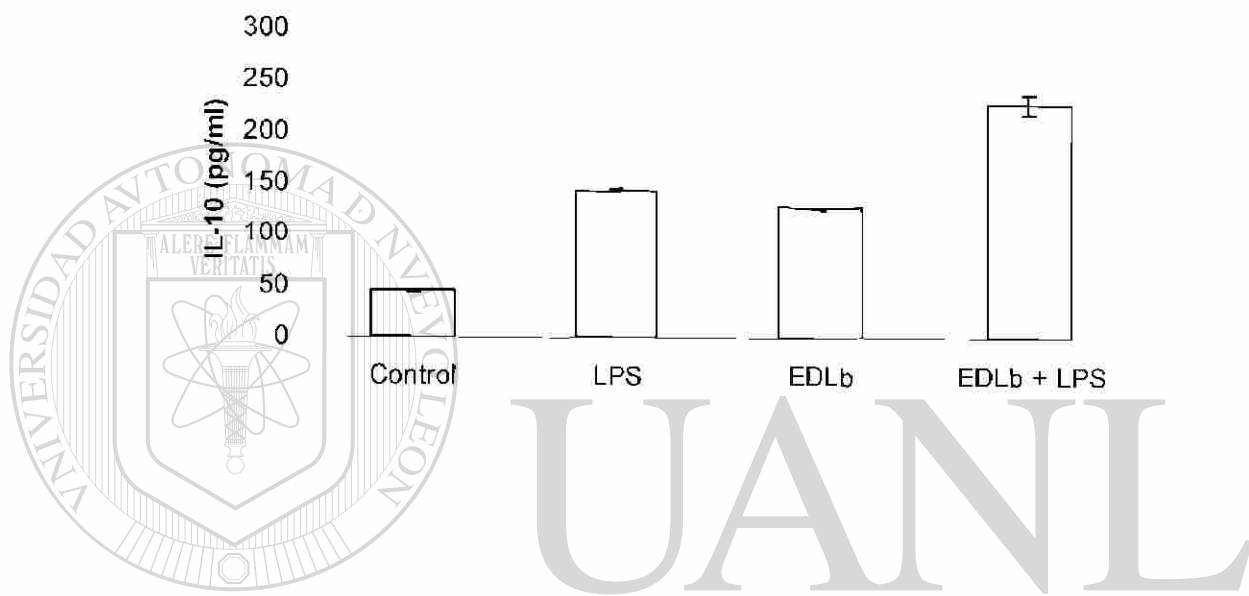


Figura 20. El EDLb modula la producción de el TNF-a en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una concentración celular de 5×10^6 células/pozo y estimulados con LPS (20 mg/ml) y tratados con EDLb (0.5 U/ml) e incubados en una 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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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% O_2 y 5% CO_2 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.

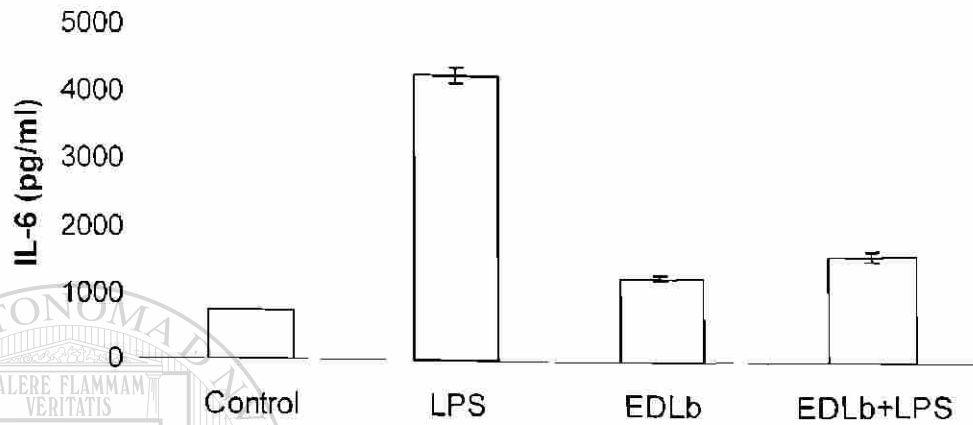


Figura 22. El EDLb modula la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS *in vitro*. Macrófagos peritoneales murinos fueron cultivados a una concentración celular de 5×10^6 células/pozo y estimulados con LPS (20 mg/ml) y tratados con EDLb (0.5 U/ml) e incubados en una atmósfera 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.

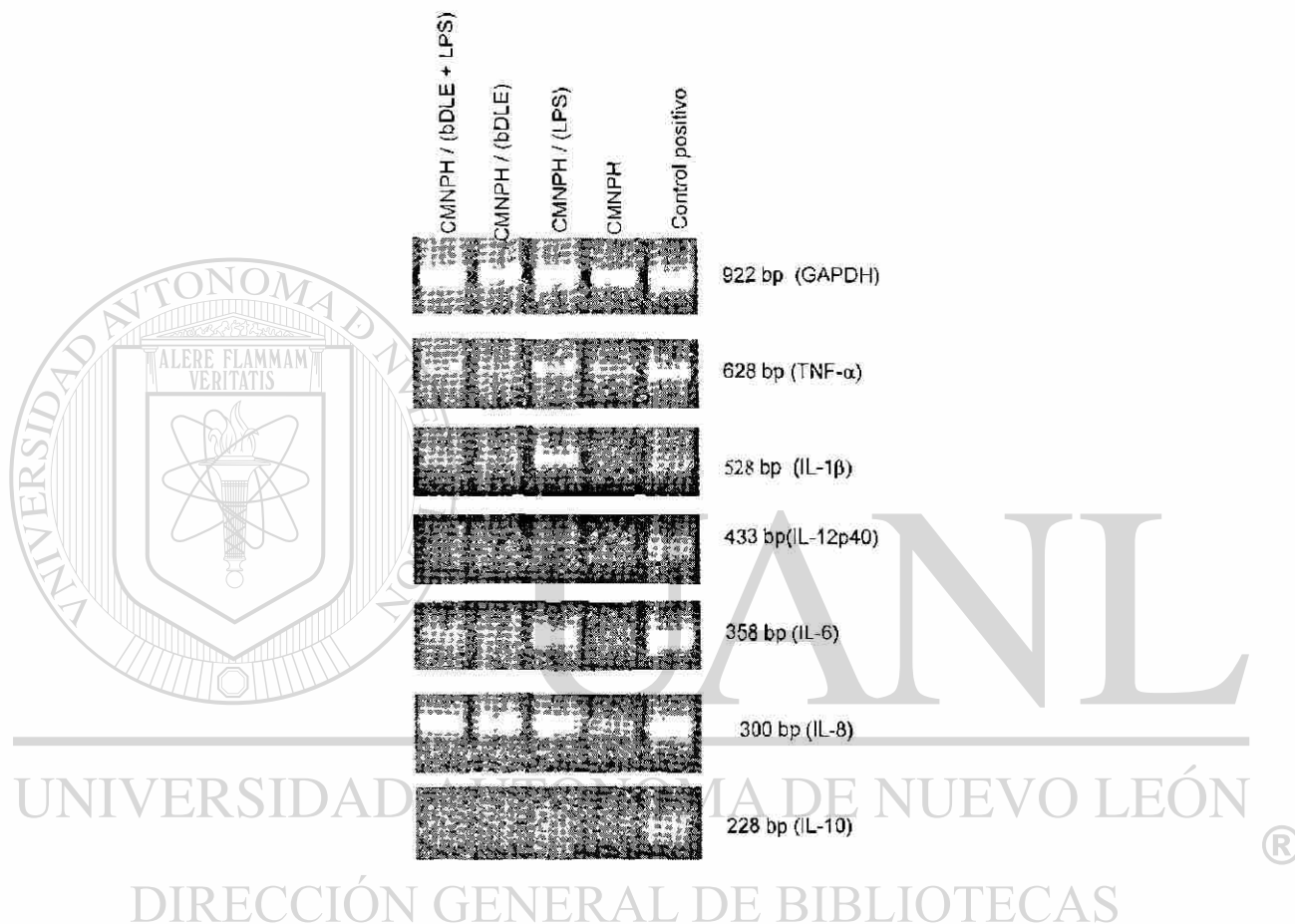


Figura 23. El EDLb modula la expresión de el RNAm de las citocinas pro-inflamatorias en células de sangre humana estimulada con LPS. El RNA total fue extraído de CMNPH de sangre humana sin tartar, estimuladas con LPS (50 ng), EDLb (1U), y LPS (50 ng) + EDLb (1U), incubadas durante 5 horas en una atmósfera a 37°C, 95%O₂ y de 5%CO₂. El RNA fue 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.

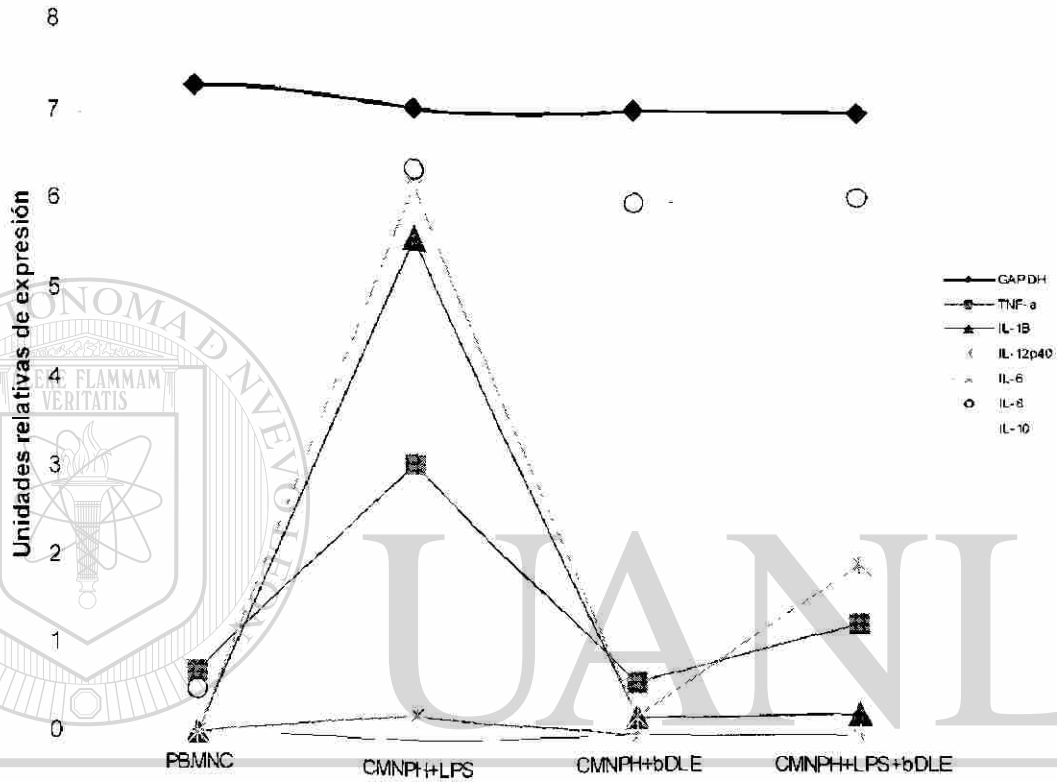


Figura 24. Niveles de expresión de los genes de citocinas en células de sangre humana estimulada con LPS y tratada con EDLb. Total RNA was extracted from untreated, LPS (50 ng), bDLE (1U), and LPS (50 ng) + bDLE (1U) PBMC, El RNA total fue extraído de CMNPH de sangre humana sin tartar, estimuladas con 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 fue 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.

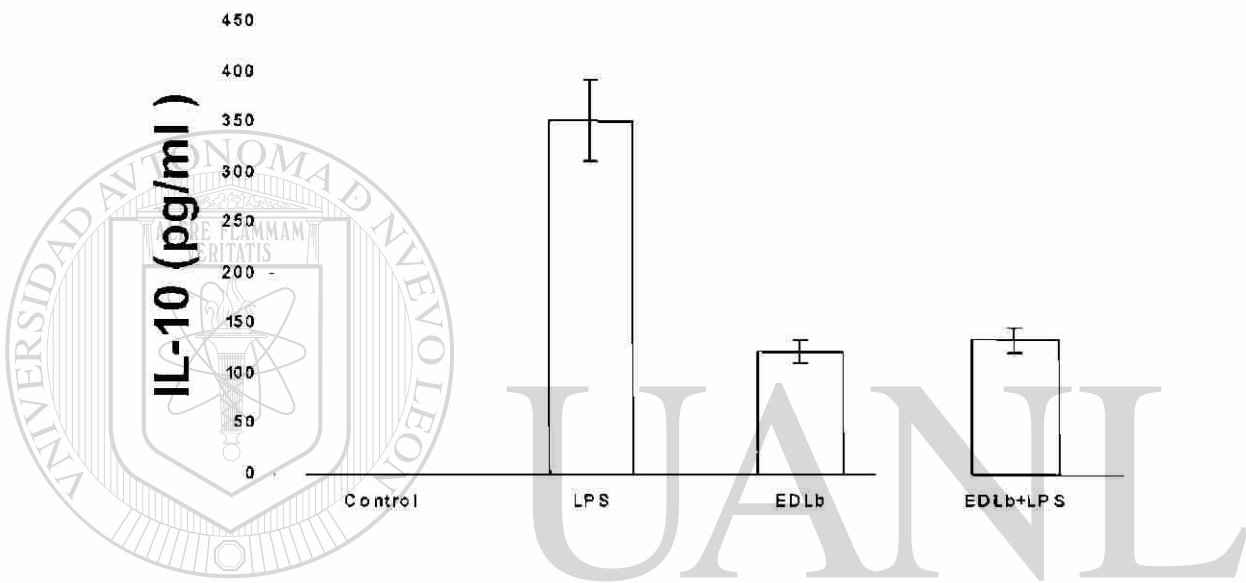
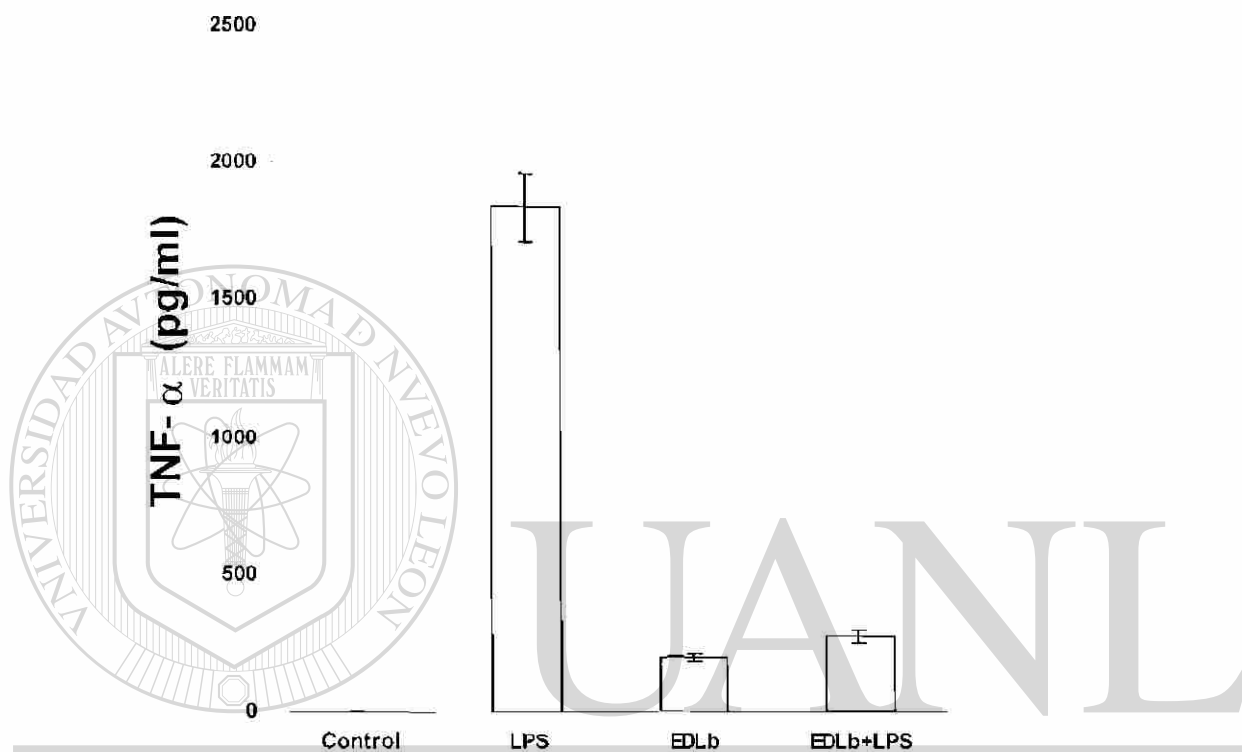


Figura 25. El EDLb modula la producción de IL-10 en células de sangre humana estimuladas con LPS. Las muestras de sangre humana fueron estimuladas con LPS (50 ng), EDLb (1U), and LPS (50 ng) + EDLb (1U). Las muestras de sangre contenidas en tubos fueron colocadas en un rotor e incubadas en una atmósfera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

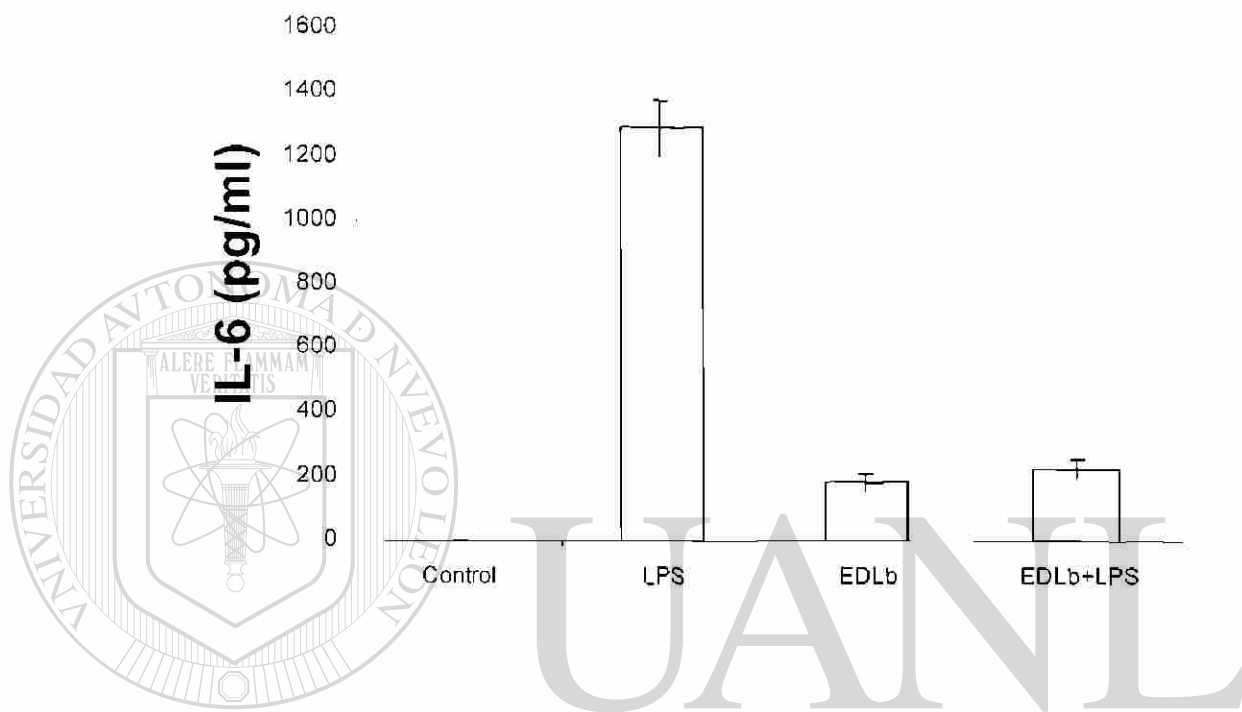


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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).

Probablemente 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 estimuladoras 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 endotóxicas 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 TNF- α , IL-1 β , 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 TNF- α , 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., Steinhäuser, 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 Crítica 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. Neequaye, 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., Verschuieren, 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., Niiro, 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., Egado, J., Johnson, R. J., Rodriguez-Isturbe, 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).

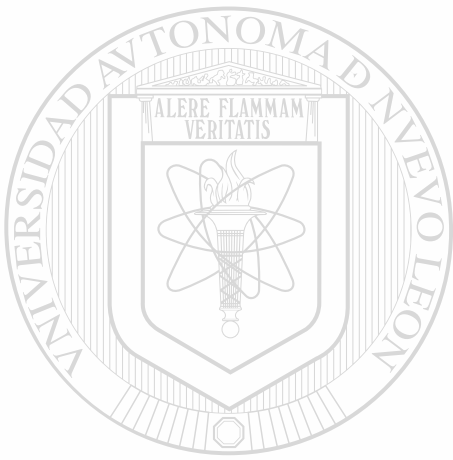
114. Rozzo, S.J. and Kirkpatrick, C. H. Purification of transfer factors. *Molecular Immunology*. 29: 167-182. (1992).
115. Ryan, J. A. Endotoxins and Cell Culture, Technical Bulletin, Corning Costar Corporation. (1995).
116. Saemann, D. M., Bohmig, A. G., Osterreicher, H. C. and Zlabinger, J. G. Anti-inflammatory 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-Zoster 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., Hinnrasky, 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 calostrum, 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).

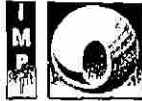


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisional de Patentes

Uso exclusivo del IMPI

- Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial

- Modelo Industrial Dibujo Industrial

Expediente: NL/a/2004/000058
Fecha: 16/JUL/2004 Hora: 15:42
Folio: NL/E/2004/000376

No. de expediente

No. de folio de entrada

Fecha y hora de presentación



Para más detalles información las consultaciones generales al reverso

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. 66451. 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. María Cristina Rodríguez Padilla, b) Dr. Rayas S. Tamez Guerra, c) Dr. Moisés Amides 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) Corrala 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 Arquelles	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. 66451. 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 Día: Mes: Año:	19) Clasificación Internacional uso-exclusivo del IMPI
20) Divisional de la solicitud Número	21) Fecha de presentación Día: Mes: Año
22) Prioridad Reclamada: País: Fecha de presentación: Día Mes Año No. de serie:	
Lista de verificación (uso interno)	
No. Hojas	No. Hojas
<input type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tarifa	<input type="checkbox"/> Documento de cesión de derechos
<input type="checkbox"/> Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input type="checkbox"/> Constancia de depósito de material biológico
<input type="checkbox"/> Dibujo (s) en su caso	<input type="checkbox"/> Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input type="checkbox"/> Resumen de la descripción de la invención	<input type="checkbox"/> Documento (s) de prioridad
<input type="checkbox"/> Documento que acredita la personalidad del apoderado	<input type="checkbox"/> Traducción
	TOTAL DE HOJAS
Observaciones: Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos. Lic. Jaime Javier Gutiérrez Arquelles 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

516

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

Email address: erodrig@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 [23]. 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 [24]. 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 mol- 88
 ecules 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 [25,26]. 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

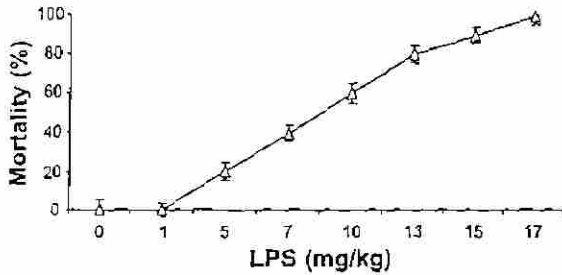


Fig. 1. Effect of LPS on mice mortality. Different groups of mice ($n=10$) were treated i.p. with one dose of LPS (0, 1, 5, 7, 10, 13, 15, and 17 mg/kg) and mortality was determined 72 h later. Results were presented as mortality percentages.

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

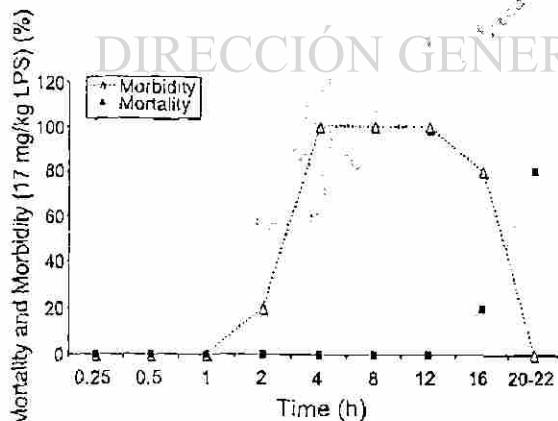


Fig. 2. Mortality and morbidity by LPS (17 mg/kg) lethal doses. Balb/C mice ($n=30$) were i.p. injected with one dose of 17 mg/kg LPS and their morbidity and mortality monitored for 24 h. Results are presented as morbidity and mortality percentages. (Morbidity was determined by the typical symptoms including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

t1.1
t1.2
t1.3
t1.4
t1.5
t1.6
t1.7
t1.8
t1.9
t1.10
t1.11
t1.12
t1.13
t1.14
t1.15
t1.16
t1.17

t1.18

251
252
253

254
255
256

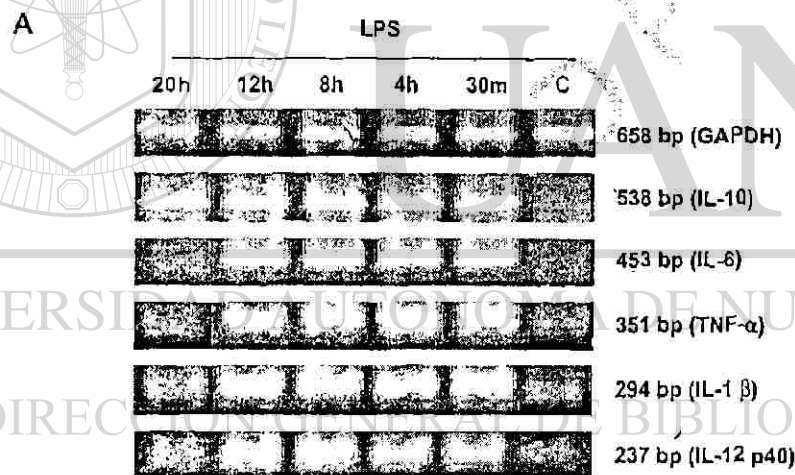
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266

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-

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

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

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

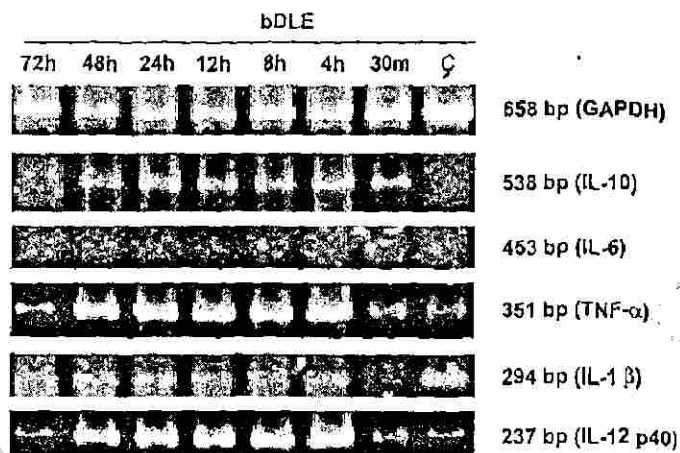


B

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

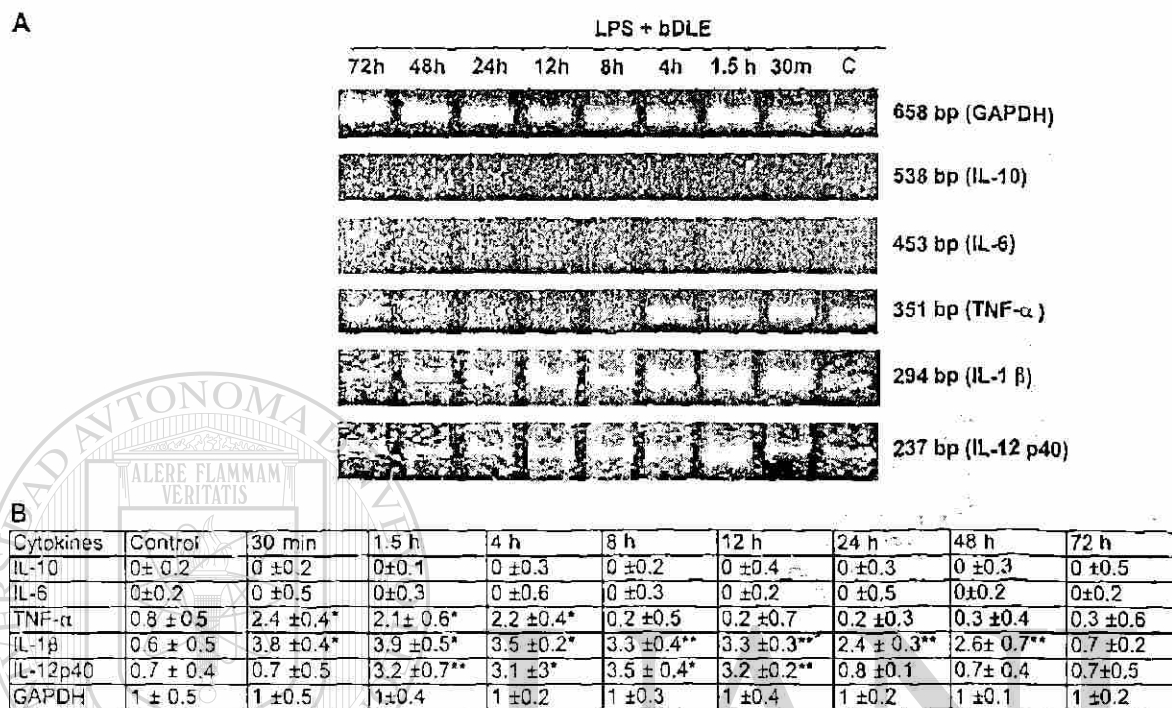


Fig. 5. Cytokine gene expression in LPS-induced endotoxic shock in mice treated with bDLE. Total RNA was extracted from mouse spleens at 30 min, and 1.5, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h after bDLE (1 U) treatment in LPS-induced endotoxic shock mice. RNA was analyzed for the expression of cytokine mRNA (IL-10, 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
 laboratory studies with animal models demonstrate
 that inhibition of TNF-α or IL-1β protects against the
 deleterious effects of excessive cytokine activity and
 significantly improves the survival rate in cases of
 experimental endotoxic shock [17]. Our results
 showed that although the posttreatment with bDLE
 increased the survival of mice with LPS-induced
 endotoxic shock, the treatments did not affect the
 morbidity; however, 72 h after the treatment with
 bDLE, the signs and symptoms of endotoxic shock
 disappeared. Because the bDLE posttreatment 8 h
 after injection with LPS induced the highest survival
 rate (90%), this treatment was chosen for bDLE
 studies. These results suggest that bDLE decreases
 mortality induced by LPS (Table 1). The bDLE
 posttreatment (after the LPS injections) modulated
 the expression of inflammatory cytokine genes (sup-
 pressed IL-6 and IL-10; decreased IL-1β, IL-12p40,

351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369

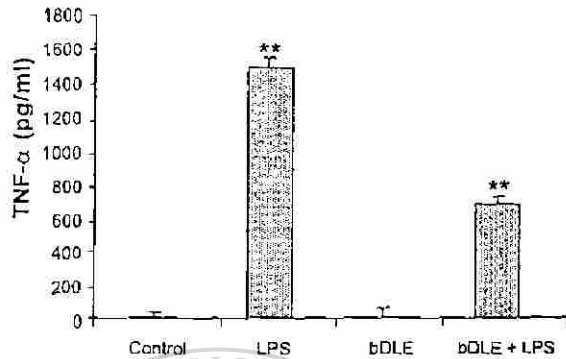


Fig. 6. Effect of bDLE on the production of TNF- α in LPS-induced endotoxic shock in mice. Animals in control, bDLE, and LPS groups ($n=10$) were injected intramuscularly or intraperitoneally with either pyrogen-free water, bDLE (1 U), or LPS (17 mg/kg), respectively. Balb/C mice ($n=10$) were injected 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.

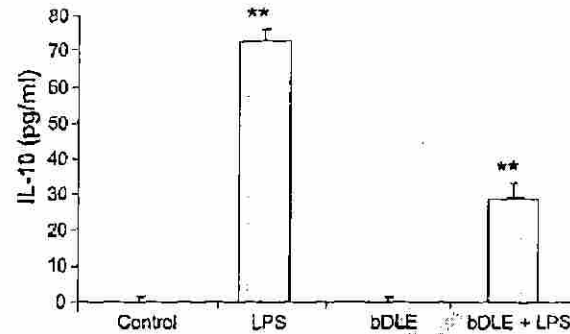


Fig. 8. Effect of bDLE on the production of IL-10 in LPS-induced endotoxic shock in mice. Animals in control, bDLE, and LPS groups ($n=10$) were injected intramuscularly or intraperitoneally with either pyrogen-free water, bDLE (1 U), or LPS (17 mg/kg), respectively. Balb/C mice ($n=10$) were injected 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

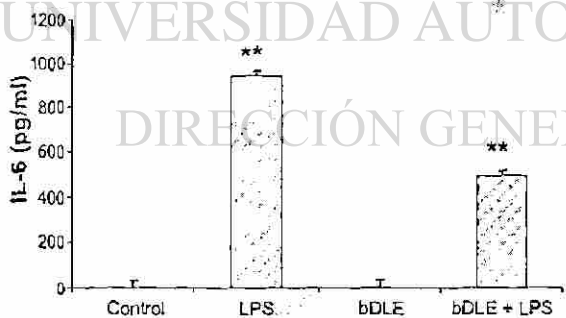


Fig. 7. Effect of bDLE on the production of IL-6 in LPS-induced endotoxic shock in mice. Animals in control, bDLE, and LPS groups ($n=10$) were injected intramuscularly or intraperitoneally with either pyrogen-free water, bDLE (1 U), or LPS (17 mg/kg), respectively. Balb/C mice ($n=10$) were injected 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] Davenport KL, Zagorski J, Schleimer RP, Bochner BS.
 461 Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion

- in the rat mesenteric microcirculation: regulation by gluco- 462
 corticoids and role of cytokines. *Journal of Immunology* 1988; 463
 161:6861–70. 464
 [3] Di Santo E, Sironi M, Pozzi P, Gnocchi P, Ghezzi P, et al. 465
 Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor 466
 necrosis factor and interleukin-1 β production in the brain 467
 without affecting the activation of the hypothalamus– 468
 pituitary adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 1988;2: 469
 149–154. 470
 [4] Di Santo E, Alfonzi T, Poli V, Fattori E, Ghezzi P, et al. 471
 Differential effects of IL-6 on systemic and central production 472
 of TNF: A study with IL-6-deficient mice. *Cytokine* 1997;9: 473
 300–6. 474
 [5] Estrada PS, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Estrada IG, 475
 et al. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the 476
 treatment of herpes zoster. *International Journal of Immu- 477
 nopharmacology* 1988;20:521–35. 478
 [6] Haimovitz FA, Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, Kolesnick 479
 R, et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial 480
 apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997;186: 481
 1831–1841. 482
 [7] Howe LM; Novel agents in the therapy of endotoxic shock. 483
Expert Opin Investig Drugs 2000;9:1363–72. 484
 [8] Kakutani MK, Waga TI, Iwanura H, Wakitani K. JTE-607, a 485
 novel inflammatory cytokine synthesis inhibitor without 486
 immunosuppression, protects from endotoxin shock mice. 487
Inflamm Res 1999;48:461–8. 488
 [9] Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Yan D, Sredni B, et al. Anti- 489
 IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 490
 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on 491
 timing of immunomodulating intervention. *J Immunol* 2002; 492
 169:384–92. 493
 [10] Kirkpatrick CH. Transfer factors: identification of conserved 494
 sequences in transfer factor molecules. *Mol Med* 2000;6: 495
 332–341. 496
 [11] Krakauer T, Stijles BG. Pentoxifylline inhibits superantigen- 497
 induced toxic shock and cytokine release. *Clin Diag Lab* 498
Immunol 1999;1993:594–8. 499
 [12] Lauw FN, Pajkrt D, Hack EC, Kurimoto M, Van der Poll T, 500
 et al. Proinflammatory effects of IL-10 during human 501
 endotoxemia. *J Immunol* 2000;165:2783–9. 502
 [13] Lawrence HS, Borkowsky W. A new basis for the immuno- 503
 regulatory activities of transfer factor—an arcane dialect in the 504
 language of cells. *Cell Immunol* 1983;82:102–16. 505
 [14] Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Jolinson ML, Billar TR, 506
 et al. Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by 507
 cytokines during endotoxemia. *Infection and Immunity* 1998; 508
 5:5089–98. 509
 [15] Lokaj J, Pekarek J, Kuklinek P. Dialyzable leukocyte extract in 510
 the therapy of sepsis. *Leukocyte dialyzates and transfer factor*. 511
 Bratislava: Slovak Academy of Science 1987;5:516–25. 512
 [16] Lynn AW, Golenbock TD. Lipopolysaccharide antagonists. 513
Immunology Today 1992;13:563–72. 514
 [17] McNamara MJ, Norton JA, Nauta RJ, Alexander HR. 515
 Interleukin-1 receptor antibody (IL-1rab) protection and treat- 516
 ment against lethal endotoxemia in mice. *Journal of Surgical* 517
Research 1992;54:316–21. 518

519 [18] Moreira AL, Wang J, Sarno EN, Kaplan G. Thalidomide
 520 protects mice against LPS-induced shock. *Brazilian Journal of*
 521 *Medical and Biological Research* 1997;30:1199-207.
 522 [19] Netea MG, Kullberg BJ, Joosten LA, Sprong T, Van der Meer
 523 JV, et al. Lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*
 524 endotoxemia is mediated through different pathways. *Eur J*
 525 *Immunol* 2001;31:2529-38.
 526 [20] Rodríguez BI, Pérez MP, Jiménez GG. Factor de transferencia
 527 bovino en el choque séptico neonatal. *Rev Mex Pediatr* 1999;
 528 66:240-5.
 529 [21] de Bont SJM, Kimpfen JL, Limburg PC, Bijzet J, De Leij JF, et
 530 al. Increased interleukin-10 plasma concentrations during
 531 neonatal sepsis. *Immunology and Infectious Diseases* 1996;
 532 6:49-52.
 533 [22] Steinhäuser ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, Strieter RM,
 534 Kunkel SL. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic
 535 peritonitis. *J Immunol* 1999;162:5437-43.
 553

[23] Tollner B, Roth J, Storr B, Martin D, Zeisberger E, et al. The
 536 role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and
 537 metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a
 538 high dose of lipopolysaccharide. *Eur J Physiol* 2000;440:
 539 925-32. 540
 [24] Vacek A, Hofer M, Barnet K, Cech K, Schneiderová H, et al.
 541 Positive effects of dialyzable leukocyte extract (DLE) on
 542 recovery of mouse haemopoiesis suppressed by ionizing
 543 radiation and on proliferation of haemopoietic progenitor cells
 544 in vitro. *International Journal of Immunopharmacology* 2000;
 545 22:623-34. 546
 [25] Victor VM. Comparative study of peritoneal macrophage
 547 functions in mice receiving lethal and non-lethal doses of LPS.
 548 *Journal of Endotoxin Research* 2000;6:1125-36. 549
 [26] Viza D, Vich JM, Phillips J. Orally administered specific
 550 transfer factor for the treatment of herpes infections. *Lympho-*
 551 *kine Research* 1985;4:112-23. 552

4

5

6

7

2297 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;

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

