

201
14



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**“Conocimientos Actuales sobre
el Interferon”**

Trabajo Monográfico

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Ma. Magdalena Benítez Mandujano

México, D. F.

Febrero de 1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE .

CAPITULO I.

<u>Antecedentes Históricos</u>	1.
--------------------------------------	----

CAPITULO II.

<u>Características del Interferón (IFN)</u>	17.
Actividad biológica del IFN.....	21.
Acción del IFN.....	23.
IFN y la membrana plasmática.....	25.
El efecto inhibitor de la multiplicación celular debido al IFN.	27.
Efectos del IFN en la respuesta inmune "in vivo" e "in vitro"..	28.
Efectos "in vitro".....	29.
Efectos "in vivo".....	32.
Observaciones acerca del sistema inmune relacionadas a pacientes tratados con IFN.....	34.

CAPITULO III.

<u>Inductores del IFN</u>	36.
Mecanismo de inducción del IFN por polinucleótidos sintéticos..	37.
Relación entre la estructura del polinucleótido y su actividad antiviral.....	38.
Relación del peso molecular del ribonucleótido con su capacidad inductora.....	42.
Relación de la resistencia a la degradación con el poder de <u>in</u> ducción.....	42.
Otros inductores del IFN.....	45.

CAPITULO IV.

<u>Potencial terapéutico del IFN. Tratamiento con IFN humano como agente profiláctico.....</u>	49.
Estudios realizados "in vivo".....	50.
El sistema del IFN en infecciones virales naturales.....	52.
Farmacocinética y estudios de toxicidad con el IFN.....	53.
Búsqueda del IFN "in vivo" en años recientes.....	56.
Datos recientes del IFN como antiviral.....	56.
Infecciones del tracto respiratorio superior.....	60.
Administración local y sistemática del IFN en encefalitis.....	61.
La aplicación sistemática del IFN e inductores del IFN.....	62.
Hepatitis crónica.....	63.
Rubeola congénita.....	65.
Herpes zoster.....	66.
Infecciones congénitas por citomegalovirus.....	68.
IFN y los parásitos celulares.....	68.
IFN como agente antitumoral.....	69.
Tumores transplantables de varias etiologías.....	70.
Tumores inducidos por deoxivirus.....	71.
Tumores inducidos por cancerígenos químicos.....	72.
Efectos antitumorales en el hombre.....	72.
Ultimos hallazgos acerca de la aplicación terapéutica del IFN en humanos.....	78.

CAPITULO V.

<u>Producción, purificación y control. Introducción.....</u>	84.
Producción de IFN tipo II (inmune) en respuesta a mitógenos...	89.
Producción de IFN tipo II (inmune) en respuesta a Ags.....	90.
IFN tipo I (clásico) de origen linfocítico.....	90.

Purificación del IFN..... 91.

Rendimiento de la producción de IFN en E. coli..... 105.

CAPITULO VI.

Perspectivas en los próximos cinco años. Ingeniería Genética. 115.

BIBLIOGRAFIA..... 117.

CAPITULO I.

ANTECEDENTES HISTORICOS.

- 1957 Alick Isaacs y Jean Lindenman (1), del Instituto Nacional de Investigación Médica en Londres, descubren un agente de interferencia viral: una proteína, secretada por células infectadas por virus, que permite a otras células resistir la infección viral. Ellos le dan el nombre de INTERFERON.
- 1960 Isaacs (2), en sus investigaciones en células de embrión de pollo expuestas a virus de la influenza, demuestra la producción de las partículas del interferón (IFN) capaces de proteger a células de pollo contra otros virus, pero no a células de animales de otras especies.
- 1962 Ho (3) es el primer investigador, seguido por Baron e Isaacs (4), en obtener el IFN humano preparado en líneas celulares primarias y secundarias.
- 1963 Cantell y Mc Laren (5) por un lado y Wheelock (6) por otro, obtienen el IFN por un método de inducción, siendo los primeros en utilizar este tipo de métodos.
- Ho, por su parte, desarrolla sus experimentos utilizando el método de inducción en placas con virus RMC.
- Wheelock realiza varios trabajos: primero se dedica a investigar cantidades del IFN existentes en el suero humano durante las infecciones virales, y después trabaja con la cepa 17 D de virus de la fiebre amarilla e investiga las cantidades de virus circulante, del IFN y de anticuerpos y, finalmente, realiza experimentos con el IFN utilizando técnicas de hemaglutinación, para observar sus efectos como inhibidor del crecimiento de virus en leucocitos.
- 1964 Thomas Merigan y col. (7) trabajando en el Departamento de Medicina de la Universidad de Stanford en California, son los primeros en demos --

trar algunas características moleculares del IFN y demuestran también algunas de las propiedades físicas y químicas de los IFNs obtenidos en el pollo y en el ratón; además desarrollaron métodos para su purificación.

- 1965 Grosh y Giford (8) estudian los efectos del IFN a nivel bioquímico, trabajando en la parte dinámica de la inducción, con la timidina cinasa y la incorporación de la H-3 timidina en cultivos celulares de fibroblastos de pollo infectados con virus de vacuna.
- 1965 Hallum, Younger y Stinebring (9) relacionan actividad del IFN con las proteínas presentes en la circulación y que mostraban peso molecular mayor de 20 000 daltons inyectando con endotoxinas o bacterias a ratones. Aquí aparecen las primeras bases sobre la inducción.
- 1965 Kleinshmidt (10) y Murphy inician los primeros experimentos sobre la inducción del IFN por medio de una sustancia llamada estatolón.
- 1965 A finales de este año Younger y cols (11) hacen importantes descubrimientos sobre la influencia que tienen las sustancias inhibidoras de la síntesis de proteínas en la formación del IFN en ratones.
- 1966 Burke y Morrison (12) en experimentos para producir el IFN en células embrionarias de pollo, dan los primeros indicios sobre el importante papel que juega el DNA en la inducción y producción del IFN.
- 1966 Wagner y Huang (13), también interesados en los mecanismos de acción del IFN, desarrollan experimentos sobre la inhibición del RNA y la síntesis del IFN, trabajando con células infectadas por virus de estomatitis vesicular.

- 1966 En tanto continúan realizándose estudios sobre la posibilidad de inducir la producción del IFN, Isaacs y col.(14)encuentran un inhibidor de la - producción del IFN.

- 1966 Younger y Stinebring (15), que ya han trabajado bastante con el IFN, comienzan a experimentar con distintas sustancias para probar su capacidad para inducir la producción del IFN,; entre dichas sustancias cabe mencionar el estatolón y algunas endotoxinas bacterianas.

- 1966 Casi a finales de este año., Marcus y Salb (16), investigadores dedicados a estudiar la estructura molecular del IFN, publican el primer trabajo relacionado con las bases moleculares de la acción del interferón y confirman informes anteriores sobre el efecto inhibidor de la síntesis del ARN viral como uno de sus principales efectos antivirales.

- 1967 Vilcek(17) trabaja sobre inductores del IFN y encuentra una técnica para potenciar la acción del IFN utilizando extractos de Escherichia coli.

- 1967 Levine y cols (18) demuestran que el IFN actúa también sobre algunas enzimas que intervienen en la síntesis del ADN viral, en experimentos en células infectadas por virus de vacuna.

- 1967 Truden, Sigel y Dietrich (19) encuentran en células tumorales infectadas por el virus de Erlich, un antagonista del IFN.

- 1968 Merigan y Finkelstein (20) realizan estudios sobre la inducción del IFN y sus efectos antivirales "in vivo", experimentando con varios polímeros aniónicos sintéticos y estudiando varios factores involucrados en la producción del estado antiviral inducido por dichos polímeros. Inician además la producción del IFN en mayor escala.

- 1968 Younger y Hallum (21) realizan también estudios de la inducción del IFN con polímeros sintéticos; estos investigadores estudian en ratones, el efecto de los polinucleótidos sintéticos de doble cadena, tratando de demostrar si son inductores o liberadores del IFN.
- 1969 A principios de este año De Clerck y col. (23) utilizan métodos inmunológicos orientados a la obtención del IFN a mayores concentraciones.
- 1969 Por otro lado Katon N y Eggers (24) trabajan en la búsqueda de nuevos factores capaces de acrecentar la síntesis del IFN en sistemas celulares "in vitro".
- 1969 A finales de este año ya se han hecho importantes descubrimientos sobre los mecanismos de la inducción, como los derivados de los trabajos de Bausek y Merigan (25), quienes estudiaron la interacción de la célula con los polímeros sintéticos usados como inductores y su relación con la producción del interferón. Monto Ho y Yang Ke (26) presentaron una hipótesis basada en resultados obtenidos al estudiar el posible mecanismo de acción en la estimulación y producción del interferón con polinucleótidos sintéticos. Lo cual ha sido un paso importante para descubrir la necesidad de que el inductor tenga una estructura secundaria estable.
- 1970 Durante la purificación del IFN humano, Carter (27) encuentra dos componentes activos a los que denomina IFN-alfa e IFN-beta, de diferente punto isoeléctrico. Esta es la primera evidencia de que el IFN presenta distintas estructuras moleculares.
- 1970 Merigan (28) publica los resultados de la estructura molecular de los inductores del IFN, en particular del ARN de doble cadena; material relativamente fácil de obtener y capaz de producir un alto rendimiento.

- 1971 En este año se publica un informe de Tan y col. (29) acerca de la cinética, formación y liberación del IFN intracelular. Información obtenida de los experimentos realizados en el Instituto Nacional de la Salud en Canada.
1972. Stewart (30), que a partir de este año publicará una larga serie de trabajos sobre el IFN, reporta que los nucleótidos sintéticos más usados hasta entonces son tóxicos para las células, y que se observa además un marcado incremento de la susceptibilidad a la toxicidad en aquellas células previamente tratadas con el IFN.
- 1972 Kleinsmidt (32) publica un extenso trabajo sobre la bioquímica del IFN, incluyendo su inducción y posibles inductores. En ese trabajo se refiere ampliamente a la purificación y propiedades del IFN, y también plantea un posible mecanismo de acción y algunos usos potenciales del IFN.
- 1973 Nuevas investigaciones realizadas por Stewart II y col.(31) demuestran que el ARN de doble cadena induce efectos citopáticos en algunas células cultivadas "in vitro".
- 1973 De Clercq, Stewart II y De Somer (33) encuentran que, en el caso de inducción con polinucleótidos sintéticos, el poly (rC) desempeña un papel más importante que el poly (rI) en la inducción de IFN por el complejo poly (rC).poly(rI).
- 1973 Rodgers y Merigan (34) investigan sobre la producción del IFN en células individuales, y encuentran un buen rendimiento para activar muchas células a partir de unas pocas iniciales que han sido tratadas con virus de la estomatitis vesicular.

- 1973 Al estudiar las características del enlace celular en el caso del IFN humano, Berman y Vilceck (35) encuentran las condiciones adecuadas para que el enlace entre el IFN y la célula sea efectiva y de lugar al estado antiviral.
- 1973 Las evidencias de que los interferones son glicoproteínas con un contenido variable de residuos ácidos terminales, con ciertos azúcares en sitios específicos, son obtenidas por Dorner y Scribam (37).
- 1974 Stewart II (36) publica un trabajo en el que no solo se refiere al IFN sino a todo un sistema de proteínas con diferente estructura molecular. Por medio de la cromatografía y la electroforesis logra separar dos especies moleculares diferentes del interferón de ratón, diferentes también en peso molecular y en actividad antiviral.
- 1974 Después de la publicación de datos acerca de la naturaleza proteica (glicoproteica) del IFN se llevan a cabo experimentos orientados a definir las vías metabólicas involucradas en su producción, utilizando procesos contrarios como inhibición o supresión de la producción del IFN por medio de inhibidores de la glicosilación. Havell y col. (38) trabajaron con el inductor poly (rI).poly(rC) y encontraron que al añadir un inhibidor como la D-glucosamina se inhibe la síntesis de interferón biológicamente activo .
- 1975 Vengris y col. (39) demuestran experimentalmente que es necesaria la liberación del IFN a partir de la célula productora para que ocurra el establecimiento del estado antiviral.
- 1975 Los investigadores Wiebe y Joklik (40), trabajando con reovirus, demuestran el fenómeno de inhibición de la replicación viral, y aportan una prueba más de que el IFN es capaz de alterar el mecanismo de replicación de los virus.

- 1975 Dianza y Baron (41) realizan pruebas sobre el progreso de varias infecciones virales, el efecto que tiene sobre ellas la aplicación de IFN exógeno y como afectan la producción del IFN endógeno, sus resultados indican que la administración de IFN da por consecuencia una acción rápida de resistencia a los virus.
- 1975 Otra propiedad del IFN es puesta en evidencia por Marcus y Sekellick (42), quienes demuestran su capacidad para inducir resistencia total a la acción citopatogénica de algunos virus; células expuestas a cantidades suficientes de IFN no fueron destruidas por los virus.
- 1975 Pitha y col. (43) estudian el efecto del IFN en infecciones por virus productores de leucemia, utilizándolo tanto en forma exógena como por inducción endógena; encontrando que el IFN inhibe la replicación viral en ambos casos, y también que la producción viral en células crónicamente infectadas sólo se suprime en presencia del IFN.
- 1975 Trabajando sobre la inhibición de la síntesis del ARNm del IFN, por medio de una sustancia llamada 5,6, dicloro, 1 beta D- ribofuranosil benzimidazol (DRV), Seghal, Tamm y Vilceck (44) encuentran la primera evidencia de que el DRV puede inhibir la síntesis del ARNm, disminuyendo la producción de IFN. Este es un inhibidor reversible capaz de potenciar o superinducir al poly(rI).poly(rC) en la producción del IFN.
- 1976 Vengris y col. (45) trabajan sobre la intervención de la membrana celular en la acción del IFN y sugieren el enlace de éste con gangliosidos de la membrana; plantean también la posibilidad de que la membrana tenga un papel regulador de la acción del IFN.

- 1976 Samuel y Farris (46) encuentran que el efecto antiviral del IFN es máximo en células de especies homólogas.
- 1976 Hajnicka y Fuchsberger (47) obtienen una preparación del IFN de un alto grado de pureza, empleando cromatografía de afinidad en un inmunoabsorbente y anticuerpos específicos purificados.
- 1977 Ishitsuka y Nomura (48) desarrollan un método sencillo y eficiente para titular el IFN, utilizando microplacas para trabajar con un gran número de muestras.
- 1977 Al realizar estudios sobre los niveles de complemento durante la inducción del IFN, Rathova y col. (49) obtienen datos preliminares que indican que el IFN puede reducir el nivel del complemento "in vivo".
- 1977 Marcus y col. (50) demuestran la acción del IFN sobre el virus de la estomatitis vesicular y comprueban que la transcripción primaria del virus es inhibida por el IFN.
- 1977 Huang (127) estudia el efecto del IFN en la fagocitosis y demuestra que es capaz de potenciar este mecanismo de defensa en animales.
- 1977 Cantell (53) publica un importante artículo sobre las perspectivas para la aplicación clínica del IFN exógeno, en el tratamiento de infecciones respiratorias, hepatitis, sarcoma oncogénico y algunos otros tumores.

- 1977 Newmann y cols. (55) comparan el efecto del IFN de fibroblastos con el IFN de leucocitos en la prevención de infecciones por virus del herpes simple, y encuentran que la diferencia en efectividad es insignificante.
- 1977 Uno de los investigadores más dedicados al estudio del IFN, Stewart II (56), publica resultados de estudios detallados sobre su estructura, inductores y efectos sobre las células.

- 1977 Hajnicka y cols. (58) desarrollan un buen método para la purificación de IFN de ratón, utilizando cromatografía de afinidad con un inmunoabsorbente.
- 1978 Aboud y cols(57) obtienen buenos resultados administrando IFN exógeno en infecciones por virus de la leucemia murina.
- 1978 Cantell y cols(59) logran producir IFN humano de origen leucocitario en gran escala, a una concentración de 10^8 U I/ml.
- 1978 Al estudiar la acción del IFN como una sustancia reguladora capaz de modular la respuesta en ratones adultos y recién nacidos, Straunegard y cols(60) encuentran que el IFN puede tener tanto efecto supresor como efecto potenciador de la respuesta inmune.
- 1978 Por medio de un método de electroforesis, Fuchsberger y Borecky (61) logran avances importantes en la caracterización del IFN.
- 1978 Sehgal y cols (62) encuentran un procedimiento para realizar la superinducción de IFN en fibroblastos humanos;ésto lo consiguen al incrementar la estabilidad del ARNm del IFN.
- 1978 En el curso de este año Stewart M, Stewart II y cols(63) trabajan en dilucidar las características bioquímicas del IFN, y realizan pruebas para determinar el tamaño molecular y la carga eléctrica de los IFNs; encuentran que existen más de 2 IFNs humanos de diferente peso molecular.
- 1978 Scott y cols(64) estudian el efecto del IFN humano de origen fibroblástico en 19 adultos voluntarios infectados con virus de vaccinia, y observan un grado significativo de protección en 13 individuos.

- 1978 Después de lograr la síntesis de 2 diferentes tipos de IFN humano en cultivos celulares de fibroblastos, Havell y cols (67) establecen sus diferentes actividades antigénicas y sus características físico - químicas.
- 1978 Greenberg y cols (68) desarrollan un método rápido y efectivo de utilización del IFN leucocitario, aplicándolo por vía intranasal; sus experimentos indican que el epitelio nasal puede volverse antiviral en vivo, por lo que podría considerársele un método profiláctico para infecciones respiratorias virales.
- 1978 Stinbring y Chape (69) publican un trabajo sobre la producción y usos clínicos del IFN, enfocando principalmente el área de enfermedades tumorales, y hacen mención del costo extremadamente alto del IFN y sus posibles perspectivas a corto plazo.
- 1979 Al realizar estudios sobre la bioquímica de la inducción de IFN, Milles y cols (70) plantean una hipótesis conformacional del polinucleótido y llegan a la conclusión de que es necesaria la presencia del radical 2'-OH en el inductor.
- 1979 Estudiando también la parte bioquímica de los inductores, Sehgal y col. (71) encuentran en sus experimentos 2 componentes que intervienen directamente en el mecanismo de inducción.
- 1979 Mattheus y col. (72) desarrollan una técnica para detectar IFN en el suero, sugiriendo que esta técnica podría ser muy útil en la detección de infecciones virales.
- 1979 En un análisis comparativo del IFN y el ARNm de la proteína anti-

ral, lo cual da apoyo a la teoría de que el IFN actúa vía una proteína antiviral.

- 1979 Emeny y Morgan (74) realizan estudios en células tratadas con el --- poly(rI).poly(rC) después de la aplicación de IFN, encontrando un notable efecto citotóxico en células de ratón y un efecto menor en células de embrión de pollo; en células de primates no resulta resulta citotóxico.
- 1979 En un trabajo acerca del papel del IFN en las infecciones virales Merigan y Sommenfeld (75) sugieren que el IFN está directamente in volucrado en el proceso de las infecciones virales, ya sea por acción directa sobre la replicación viral o por interacción en otros mecanismos inmunes .
- 1979 Stewart (76) publica un amplio informe sobre la acción antiviral - del IFN, mencionando la existencia de diversas respuestas provocadas por el IFN tanto "in vivo" como "in vitro".
- 1979 Jameson y Grossberg (77) logran producir IFN en células tumorales humanas (líneas estables) y demuestran que diversas células derivadas de tumores tienen la capacidad de producir IFN.
- 1980 El investigador japonés Takenakka (79) demuestra que el IFN juega - un papel importante como mecanismo de defensa en infecciones del --- tracto respiratorio superior, para lo cual utiliza virus de influen za tanto "in vivo" como "in vitro".
- 1980 Otros investigadores japoneses, Yonehara y cols (80) desarrollan -- una técnica rápida y efectiva para purificar IFN de células de ra-

tón, por medio de inmunoprecipitación con aminoácidos radiactivos. ^{13.}

- 1980 Salit y Ogburn (81) realizan los estudios para determinar si es posible separar las 2 actividades principales del IFN, actividad antiviral y la inhibición del crecimiento, por medio de procesos electrofóreticos enzimáticos.
- 1980 Otto y col.(82) trabajan con los 2 tipos más importantes de IFN humano, el leucocitario y el fibroblástico, para tratar de diferenciar sus actividades antivirales en relación a su sensibilidad a enzimas como las proteasas.
- 1980 Berg y Heron (83) logran la completa purificación de IFN leucocitario humano, con un alto factor de purificación.
- 1980 Krim (84) realiza pruebas para demostrar los efectos "in vitro" del IFN en la terapia contra tumores, encontrando muy buenos resultados en animales; en el hombre ocurre frecuentemente una regresión del tumor, posiblemente debido a pequeñas dosis que se usan para evitar la toxicidad.
- 1980 Fauconnier (85) encuentra que los cultivos celulares de hígado humano inducidos por el virus Sendai producen de manera constante cantidades de IFN de más de 10^8 UI/ml.
- 1980 Rubin y Gupta (86) investigadores americanos, trabajan con los IFNs I y II para probar sus diferentes eficacias como agentes antiproliferativos y antivirales, obteniendo como conclusión que al parecer el IFN tipo II puede ser un potente agente antitumoral.

- 1980 Borden y Hawkins (87) emplean el IFN para el tratamiento de neoplasias y enfermedades virales como el herpes, encontrando que por lo menos limita el progreso de los tumores y , en el caso de infecciones, puede ser un potente agente antiviral.
- 1980 Shigekasu, Nagata y cols (88) trabajan sobre la genética del IFN, - logrando dilucidar la estructura de uno de los 8 genes cromosomales que codifican para el alfa-IFN humano.
- 1980 Geoffrey, Allen y Fantes (90) también realizan experimentos sobre la parte genética responsable de la producción del IFN deduciendo - que las 2 mejores clases de interferon humano, el tipo I alfa (leucocitario) y el beta (fibroblástico), se podrían distinguir serológicamente y tendrían origen en diferentes genes estructurales.
- 1981 Sedmak y Grossberg (89) realizan algunos experimentos con diferentes tipos de sales raras de lantánidos, que logran potenciar la actividad del IFN y también lo estabilizan contra varios factores.
- 1981 Tamulevich y Bakessi (91) encuentran que los IFNs fibroblástico, leucocitario y linfoblástico tienen una marcada actividad antiviral en la replicación de herpes virus a una concentración de 500 UI/ml , -- pero una actividad mínima contra virus neurotrópicos, de donde logran dilucidar algunos aspectos sobre la selectividad viral del IFN.
- 1981 Raffault y cols (92) realizan experimentos para la utilización de - células hepáticas en la producción del IFN, obteniendo buenos rendimientos.
- 1981 Billian y cols (93) trabajan en conejos y monos, aplicándoles IFN

- intramuscular para observar la distribución posterior del IFN en los tejidos.
- 1981 Hayes (94) publica una interesante revisión de los interferones alfa y beta y plantea las diferencias existentes en ambos, tanto antigénicas como fisicoquímicas.
- 1981 Gipta y cols (95), en sus experimentos con el IFN, encuentran primeramente que éste induce a un cierto número de proteínas que se relacionan al estado antiviral. Después descubren que la respuesta celular está sujeta a regulación y puede manipularse, cosa que logran — utilizando actinomicina D.
- 1981 Fujita y Kohno (96) demuestran que la respuesta inicial del IFN requiere primariamente de una síntesis de proteínas.
- 1981 Vonk y cols (97) logran determinar las propiedades del IFN de células L de ratón, inducido por poly (rI), poly(rC).
- 1982 Peter Lengyel (99) del Departamento de Biofísica y Bioquímica de la Universidad de Yale, publica un trabajo sobre sus experimentos acerca de la bioquímica del IFN y sus acciones. En él habla de la estructura del IFN, su inducción, el papel del ARNm de IFN, el aislamiento de los genes del IFN, la estructura del mismo, su síntesis, actividad y efectos, así como información muy importante sobre muchas de las enzimas involucradas en el proceso de inducción y producción del IFN.
- 1983 Nallache (100) realiza investigaciones sobre el decrecimiento del poder natural de las células asesinas (killer) cuando se aplica — alfa, beta o gamma IFN.

- 1983 Wallacke (101) también descubre que las células tratadas con IFN son potenciadas en su capacidad de liberar linfotoxinas (linfocinas); esto depende también de la fitohemaglutinina, pero no tiene relación con la síntesis de proteínas.
- 1983 Vanderbussche y cols (102) trabajan con líneas celulares derivadas de carcinosomas y prueban los efectos del IFN sobre ellas, encontrando que son refractarias al IFN y que éste tiene poco efecto antiviral.
- 1983 Sidney Pestka (103) publica un trabajo en el que explica ampliamente la producción y manufactura del IFN humano trabajando con Escherichia coli, produciendo suficiente cantidad de interferón para llevar a cabo pruebas clínicas.

CAPITULO II

CARACTERISTICAS DEL INTERFERON.

En los años 30's, varios investigadores describieron el fenómeno de interferencia viral, por el cual la infección de un animal por un virus de algún modo le protegía contra otra infección subsecuente producida por otro virus.

En 1957, Alick Isaacs y Jean Lindenmann (1) del Instituto Nacional de Investigación Médica en Londres, encontraron un agente de interferencia viral, de naturaleza proteica, liberada por las células expuestas al virus y que permitía a otras células resistir otras infecciones virales y le dieron el nombre de Interferón (IFN). Estos investigadores trabajaban con células de pollo expuestas al virus de influenza, observando que protegía a células de pollo, pero no a otras especies celulares, contra la infección por otros virus.

Ellos demostraron que en la membrana alantoidea de embriones de pollo, inoculados con el virus inactivados de influenza, se producía una sustancia soluble que era diferente a los anticuerpos y hacía a las membranas resistentes a los ataques de virus activos posteriormente.

El interferón conocido inicialmente como una proteína, es ahora identificado como una familia de proteínas, muchas de las cuales forman parte de una secuencia homóloga, que aparece en una gran variedad de especies de vertebrados desde peces hasta el hombre, como respuesta no sólo a virus -- sino a sustancias como endotoxinas microbianas, a rickettsias y a ciertos polinucleótidos sintéticos, así como a ciertas cadenas de ácidos nucleicos y otras sustancias químicas.

Merigan (7) en 1966 logró preparar IFN humano en células de piel de neonato y pudo dar a conocer algunas de sus propiedades físicas y químicas como son:

- El IFN humano es estable en albúmina bovina al 0.025% a -20°C por lo menos un año y a 4°C por lo menos 9 meses, liofilizado es estable guardado a -

- 27°C, logrando una concentración de 1 :90 000 Unidades.

- El IFN pierde su actividad total en 2 h de incubación con tripsina a 37°C y pH=8.5 . Sus resultados indicaron que se trataba de una proteína con peso molecular aproximado de 26 000 daltons.

Carter (27), en sus experimentos de purificación de IFN humano y de ratón, detectó múltiples componentes activos; en el caso del IFN humano, utilizando el método de electroforesis separó 2 proteínas de diferente peso molecular que son las formas A y B. La forma B de punto isoeléctrico 5.6, tenía un peso molecular de 24000 daltons y la A con punto isoeléctrico de 5.35 y de peso molecular de 12 000 D. Estos datos sugieren que la forma B se encontraba como un dímero.

Se conocen muchos tipos de IFN distintos, según la especie que los produce. En el IFN humano se han hecho diferentes clasificaciones; la más común y aceptada se basa en las características que tienen algunos IFNs de resistir el pH ácido hasta de 2 y se denomina tipo I, de acuerdo a Salvin y Younger (104).

Los dos IFNs humanos más activos del tipo I, el leucocitario (IFN alfa) y el fibroblástico (IFN beta), pueden distinguirse serológicamente y ha sido demostrado que se producen por genes estructuralmente diferentes. La secuencia de aminoácidos terminales de ambos IFNs es diferente pero las cadenas presentan algunas áreas homólogas en su secuencia, como se ha demostrado por cromatografía de afinidad, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y punto isoeléctrico.

Se ha explicado la diferencia o heterogenicidad tomando en cuenta la diferente glicosilación de la molécula, como reportan Dorner (37) y Vengris (45), o bien que puede ser debido a la degradación parcial de la molécula nativa.

G. Allen (90) demostró que los IFNs alfa son una familia de proteínas de por lo menos 5 diferentes tipos, ya que tienen diferente peso mo-

lecular, pero de secuencias de aminoácidos homólogas en gran parte. Genéticamente provienen de genes estructuralmente diferentes. La secuencia de aminoácidos en el alfa y el beta IFN se logró establecer por medio de electroforesis utilizando como revelador ninhidrina, obteniéndose resultados un poco diferentes y coincidiendo sólo en algunas regiones sus aminoácidos, los resultados indican que el IFN alfa consiste de una cadena peptídica homogénea y el IFN beta consta de una mezcla de por lo menos 3 péptidos. Así pues se puede afirmar que la diferencia entre los IFNs alfa y beta reside principalmente en su diferente secuencia de aminoácidos y a su peso molecular, además de proceder de distintos genes estructurales. (Hayes 94).

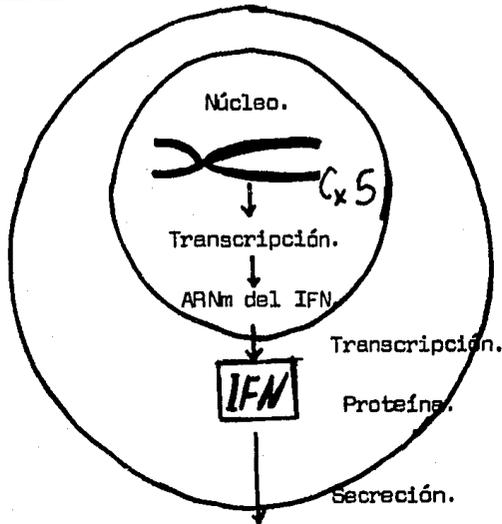
Hasta la fecha se han llevado a cabo numerosos estudios para llegar a la secuencia completa que conforma el IFN y a partir de ella explicar su comportamiento, así como utilizar esta información en la investigación sobre la ingeniería genética orientada a la utilización de bacterias, como Escherichia coli, empleando técnicas de cambios en sus genes para codificar la producción de IFN. Algunos de los principales investigadores en esta área son Lengyel (99), Rubinstein (105) y Pestka (103), el primero de los cuales publicó en 1982 una revisión sobre la Bioquímica del IFN así como de sus acciones. Esta revisión es muy completa y actualizada, recomendable para obtener mayor información sobre los siguientes aspectos:

- Perspectivas del IFN.
- Ensayos, inducción, ARNm del interferón y su papel en la síntesis de IFN.
- Producción del IFN humano.
- Síntesis del IFN humano en E. coli y levaduras.
- Estructura del IFN humano sintetizado en E. coli.
- Actividad del IFN humano sintetizado en E. coli.
- Enlace del IFN con la célula y establecimiento del estado antiviral.
- Enzimas involucradas en la acción del interferón.

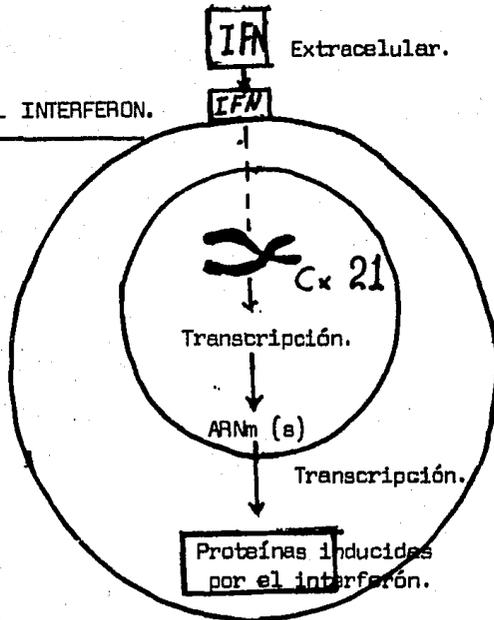
Varios de estos aspectos serán tratados en esta monografía con ampli-

A. INDUCCION DEL INTERFERON.

Inducción por virus de doble cadena de ARN.



B. ACCION DE L INTERFERON.



El sistema del IFN. El ejemplo mostrado es para la producción y acción del IFN humano fibroblástico.

plitud sin embargo, sobre ingeniería genética no entraremos en detalles - básicamente porque en torno a ella se ha creado un nuevo lenguaje científico, por demás extenso y complejo que sería muy difícil de abordar correctamente.

El sistema del IFN puede definirse como una compleja cadena de eventos moleculares que cubren los siguientes pasos:

1. El reconocimiento de la molécula específica inductora del IFN.
2. La activación de la transcripción de la información genética previamente expresada por el ARNm del IFN.
3. El proceso regulador y la traducción del ARNm del IFN.
4. La síntesis y secreción subsecuente de la proteína denominada IFN.
5. Interacción del IFN y reconocimiento de la célula susceptible.
6. Activación de la transcripción de otros genes previamente expresados - genéticamente.
7. Traducción de esta transcripción.
8. Alteración del metabolismo celular, una o más expresiones del IFN.

Así, el IFN puede ser planteado como una serie de eventos que tienen lugar en 2 células diferentes (Figura I). Como resultado de eventos ocurridos en la superficie de una célula definida que parecen activar la transcripción y la traducción de secuencias particulares. Hay también genes reguladores que producen ciertas funciones controladas que limitan temporalmente la activación de este sistema (Stewart II 56).

Stewart II (56) plantea así la posible acción del IFN:

- A. Inducción de la síntesis de IFN.
 1. Molécula inductora del IFN.
 2. Molécula identificadora del inductor de IFN.
 3. Gen estructural del IFN.
 4. Gen regulador del IFN.
 5. ARN mensajero del IFN.
 6. Molécula reguladora.

7. Interferón.
- B. Respuesta celular al tratamiento con IFN.
1. Interferón.
 2. Reconocimiento del IFN.
 3. Gen estructural para la respuesta al IFN.
 4. ARNm para la respuesta.
 5. Gen regulador.
 6. Molécula reguladora.
 7. Proteína antiviral (PAV).
 8. Proteína de respuesta no antiviral.

Estos componentes se han dividido en 2 grupos: inducción y actividad del IFN por mera conveniencia de conceptos, ya que esta división es más - aparente que real, así como el hecho de que una célula normal es capaz de ambos procesos, inducción y síntesis de IFN.

MECANISMOS DE ACCION.

El papel del IFN no es de ningún modo como una molécula de acción anti viral directa, sino más bien ejerce en las células un efecto antiviral reac cionando con ellas y desencadenando la acción de otra proteína secundaria, que es aparentemente un polipéptido, aunque bien podría ser una proteína - completa de estructuras primaria, secundaria y terciaria.

Se han obtenido datos que hacen creer que el efecto del interferón -- está basado en 4 proteínas celulares:

1. Una proteína o foco receptor que identifica la molécula inductora del - IFN.
2. El interferón propiamente.
3. Un represor de la síntesis del IFN.
4. Una proteína antiviral.

Por lo general se acepta el mecanismo de acción del IFN que exige la producción de la proteína antiviral (PAV), porque los inhibidores de la -

síntesis de ARNm (actinomicina D) o de proteínas (Ciclohexamida) bloquean por completo la acción del IFN en contra del virus, como explican Sokolova y Stewart II (100, 109).

Una vez que el IFN ha entrado en contacto con la célula, atraviesa la membrana celular y llega al núcleo; una vez ahí, activa el genoma celular por un mecanismo de represión sobre un gen, originando la síntesis de un ARNm - el cual se traduce para que se efectúe la síntesis de la proteína antiviral.

Parece ser que el efecto de la PAV consiste en inhibir o bloquear la replicación del virus a nivel de la transcripción o la traducción. Al haber producción del IFN durante la infección viral, las células más -- cercanas a las células productoras de IFN son las que presentan mayor resistencia a los virus y si con este mecanismo se logra evitar o limitar la infección en el sitio de entrada, esto impedirá la diseminación hasta focos -- lejanos ó si acaso será mínima, de ahí que la intervención precoz del IFN -- sea tan importante para la evolución de una infección viral.

Por último, el interferón puede proteger a los órganos antes de -- los virus lleguen a ellos, a través de la sangre o linfa, ya que en pruebas clínicas ha sido posible demostrar que en pocas horas después de la viremia hay IFN en el suero y es capaz de alcanzar rápidamente los órganos suscep-- tibles.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL INTERFERÓN.

La inducción del IFN en células de mamíferos ofrece un excelente siste-- ma modelo para estudiar los factores involucrados en la regulación de la -- síntesis de proteínas en los mamíferos ya que tiene dos ventajas sobre las -- demás proteínas celulares inducidas. Primero, la síntesis del IFN es produc-- to de una inducción real; la mayoría de las células producen cantidades no -- detectables de IFN de manera consecutiva y su inducción requiere de la esti-- mulación de los genes transcritores, así como de la síntesis de la proteína "in novo", como explica Lengyel (99).

En segundo lugar, casi todas las células son capaces de producir IFN -- mediante la inducción adecuada. El requerimiento de ADN dependiente de la -- síntesis de ARN después de la inducción de IFN, ha sido sugerida por DE Mae -- yer y Guignard (109) en experimentos donde la actinomicina D fue añadida -- después de la inducción, encontrándose que con este método se inhibía la -- síntesis de IFN.

Estudios hechos por Dorner y Scribam (37) realizados en conejos, demue -- tran que los IFNs son glicoproteínas y que siguen las rutas biosintéticas -- de otros tipos de proteínas secretadas por células. Stewart II explica que -- en sus trabajos pudo observar que el ADN celular dependiente de la sínte -- sis de ARN y el proceso de síntesis proteica completo son necesarios para -- el establecimiento del estado antiviral.

ACCION DEL INTERFERON.

Ha habido gran controversia acerca de las alteraciones que son realmen -- te debidas a la acción del IFN y las que son debidas a otras respuestas celu -- lares alternativas.

Sin embargo, hay varias evidencias sobre el hecho de que muchas respues -- tas celulares antivirales y algunas no antivirales, de las cuales se hablará -- más adelante, pueden atribuirse en mayor o menor grado al efecto del IFN, co -- mo respaldan con sus trabajos Shaughnessy (110), Stewart II (56) y otros. -- Estas referencias ratifican que el IFN es capaz de dar origen a una gama de -- respuestas activas.

Recientemente, Stewart II (56) ha demostrado que el IFN leucocitario hu -- mano contiene dos fracciones moleculares diferentes y que ambas tienen un e -- efecto antiviral diferente pero constante. Las evidencias de la actividad an -- tiviral del IFN nos permiten creer que el significado biológico del IFN debe -- ser mayor que el de un mero agente antiviral.

El término "cebar" (priming) fue utilizado por Isaacs y Burke (111) para -- describir la aplicación de una pequeña dosis de IFN en la membrana alantoidea

de embriones de pollo, previo a la inducción con virus de influenza. El IFN puede ser producido en dichas membranas cuando se tiene un inductor adecuado y no solamente con el virus. Otros investigadores como De Clerck y De Sommer (33) han reportado que el uso de dosis cebantes de IFN para producir el IFN, logra precondicionar a las células, antes de inducir las, lo que permite después la obtención de dosis mayores de IFN.

Sumandose a la producción de IFN incrementada, el nuevo IFN es detectable y liberado más rápidamente por las células cebadas anteriormente que por las otras, como explica Friedman (115) junto con Levy (116).

Contrariamente a los investigadores anteriores, Vilcek y otros (106), - encontraron que el pretratamiento con IFN previo a la inducción inhibía la habilidad de las células a responder al inductor y a producir el IFN posteriormente.

Sin embargo, Friedman (115) demostró que el tratamiento previo de las células con bajas dosis de IFN potenciaba la inducción de IFN, pero que altas dosis del mismo la inhibían. De este modo, mientras las células tratadas con dosis bajas adecuadas, en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas son potenciadas en su producción.

El efecto de pequeñas dosis de IFN no es limitante a la potenciación de la inducción del IFN. El cebado con una pequeña dosis puede también influenciar los mecanismos de respuesta al IFN. Stewart II (56) ha comunicado que las células de pollo cebadas con IFN homólogo desarrollan una respuesta antiviral significativamente mayor.

El cebado con dosis mínimas de IFN también es capaz de reducir la cantidad de IFN requerido para causar inhibición a la mitosis.

La naturaleza de este mecanismo de cebado no es muy claro; algunas evidencias sugieren que este fenómeno no está directamente relacionado a la capacidad antiviral del IFN, y que tal vez varias actividades que se le atribuyen correspondan a otros mecanismos asociados a la membrana celular. Kleinschmidt (32) ha sugerido que el cebado por medio del propio IFN es un fenómeno -

de membrana, y por el contrario De Clerck ha encontrado que las células pretradas no mostraban incremento en el rendimiento de IFN después de inducir las con poly (rI).poly(rC).

Se especula que el cebado actúa sobre la célula enmascarando o ajustando los sitios receptores. El efecto cebante ha sido demostrado como algo específico a la especie celular de que se trate. Podemos concluir que es posible el hecho de que una pequeña cantidad de IFN producido por unas cuantas células inicialmente infectadas durante una infección viral, puede ser suficiente para iniciar a muchas otras células a producir IFN más tempranamente y con mayor rendimiento cuando son expuestas subsecuentemente al inductor.

El fenómeno de cebado tiene varias aplicaciones y ha sido usado recientemente para elevar la producción de IFN en células humanas diploides y leucocitarias, como explican en sus comunicaciones Billiau (115) y Berg (83).

INTERFERON Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

Hay un gran número de publicaciones sobre las muchas actividades no antivirales que pueden atribuirse al IFN, que comúnmente son llamadas modificaciones de la membrana celular. Evidencias directas de que el IFN tiene un efecto en los antígenos (Ags) de superficie han sido obtenidas por Lindahl (116), -- quién observó durante la exposición de células de ratón que presentaban leucemia frente al IFN, un incremento en el enlace del anticuerpo (Ac) específico de -- histocompatibilidad de ratón (H2-d). Sin embargo, una sublínea de células L1210-IFN resistentes fue incapaz de responder de esta manera. El enlace de Concanavalina A (ConA) a las células L1210 se incrementó altamente en 48 horas de tratamiento con IFN, según Vengris (45) y Aboud (57) en sus trabajos sobre el papel del IFN y la membrana celular en las infecciones virales.

En relación a las alteraciones asociadas con los sitios de enlace en la superficie celular, son conocidas muchas enzimas relacionadas y cuya actividad sigue su curso después de la exposición al IFN. Friedman (112) reportó que el AMPc fue significativamente potenciado en la respuesta al IFN. La asociación del AMP-ciclasa con la membrana plasmática hace de esto una observación interesante.

Recientemente Allen y cols. (118), así como Stewart II (108) encontraron que el AMPc y algunos de sus derivados eran afectados por la acción del IFN en células de pollo. De todos los nucleótidos cíclicos que investigaron, el - menos activo es el AMPc. Estos datos aunados a los hallazgos de que el IFN por sí mismo puede incrementar significativamente los niveles de AMPc en - las células de riñón de ratón, sugieren que el AMPc puede jugar un impor-- tante papel en la respuesta celular al IFN.

Se sabe que el tratamiento con IFN puede causar cambios estructurales y funcionales en la membrana plasmática de células susceptibles; estas modi- ficaciones son esenciales para la expresión de varias respuestas biológicas de las células, que ocurren después de la exposición al IFN y dan lugar a - un estado que no permite la replicación viral.

Es interesante señalar las similitudes respecto a los modos de acción del IFN y algunas hormonas polipeptídicas como la insulina. El IFN, como la insulina, permanece activo cuando es unido covalentemente a un soporte de - Sefarosa, lo cual sugiere que no requiere entrar a la célula para lograr -- sus efectos, como explican Stewart II(56) y cols. Además, como explica BlaTT (119). la acción de ambos -IFN e insulina - puede ser inhibida bloqueando la ATP-asa responsable del intercambio de sodio y potasio en la membrana de enlace.

El IFN también ha sido señalado como responsable de inducir alteracio- nes en la respuesta a condiciones citotóxicas. Merigan (20) observó que, si bien la replicación de vaccinia virus fue impedida en células L tratadas con IFN, estas células degeneraban rápidamente después de 3 horas de infección - con una alta multiplicación del virus. Cultivos celulares no tratados con - IFN permanecieron morfológicamente "intactos" después de 24 horas de infección.

Estas observaciones han sido complementadas por Horak (120), quien mi- dió cuantitativamente esta destrucción por medio de un marcador de Cr⁵¹ a-- coplado a las células tratadas con IFN. No ocurrió un incremento en la des-- trucción de las células marcadas si estas eran previamente tratadas con in-

hibidores de la síntesis de proteínas como Actinomicina D, previo al tratamiento con IFN. Estos autores sugieren que la alteración celular causada -- junto con el efecto específico viral son responsables de la temprana des-- trucción de las células tratadas con IFN.

Gauntt y Lockart (121) han comunicado sus experiencias con Mengo virus en células L, y consideran que esta falla en la protección de las células - contra la destrucción puede deberse a que las células han sido tomadas para la replicación viral anteriormente, ya que la destrucción no es una respues ta inmediata sino que ocurre después de 4-5 horas de la infección y viene - enseguida de un período de actividad metabólica alterada.

Otros cambios de las células tratadas con IFN en situaciones de citoto xicidad en infecciones virales fueron primeramente relacionadas por Stewart quien observó que las células L se volvían susceptibles al IFN después de ser susceptibles a la citotoxicidad por poly(rI).poly(rC) y por dobles cadenas - de ARN. La magnitud de la respuesta dependía de la concentración de IFN y de la cantidad de poly (rI).poly(rC) usados en las pruebas.

En vivo ha sido reportado que los inductores del IFN potencian la leta lidad de las endotoxinas de ratón, y se ha sugerido que este incremento del poder letal está mediado por el IFN, como argumentan Huang y cols (122). Como han señalado varios autores, la muerte de una célula puede ser benéfi ca para el organismo multicelular, y podemos preguntarnos si una de las fun ciones del IFN sea la de ejercer este tipo de control en las células 'in vi vo'.

EL EFECTO INHIBIDOR DE LA MULTIPLICACION CELULAR DEBIDO AL INTERFERON.

Uno de los más recientes y significativos avances en este campo de la investigación ha sido el renovado interés hacia la capacidad del IFN para inhi bir la multiplicación celular. La primera evidencia experimental que indicó que el IFN tenía un efecto en el crecimiento celular en mamíferos, fue presentada por Paucker y cols (123), quienes demostraron que el IFN inhibía el creci-- miento de células L en suspensión, y que el grado de inhibición era directa

mente proporcional a su actividad antiviral. Este efecto de inhibición era reversible y al retirarse el IFN, el crecimiento celular gradualmente retornaba a la normalidad.

Se ha demostrado en el IFN, la presencia de el factor capaz de producir este efecto y sus propiedades biológicas son similares a las del principio antiviral.

Han sido muchos los autores que han realizado estudios sobre el hecho de que el IFN inhibe el crecimiento celular como una respuesta de su acción y se han obtenido siempre resultados similares, encontrándose que el IFN - de una determinada especie celular no inhibe el crecimiento de las células de otra especie. La inhibición del crecimiento no está limitada a cultivos celulares en condiciones "in vitro", ya que se ha demostrado también "in vivo".

En suma, puede decirse que esta capacidad de inhibición celular es de una magnitud variable dependiendo del tipo de células (haploide, diploide, homóloga o heteróloga, joven o vieja), de la densidad de población celular del tiempo de exposición, del tipo de IFN y de las condiciones bajo las cuales es utilizado. Se trata de un fenómeno reproducible, de carácter complejo y probablemente de tanta importancia biológica como el efecto antiviral.

Como puede verse, el IFN provoca una gran variedad de respuestas biológicas que se discutirán posteriormente, incluyendo su importancia en el mecanismo de acción durante los procesos de transcripción del ADN.

EFFECTOS DEL INTERFERON EN LA RESPUESTA INMUNE "IN VIVO" E "IN VITRO".

El IFN originalmente descrito como una proteína antiviral, es de hecho un grupo de glicoproteínas de diversos orígenes celulares, como han descrito varios autores (Merigan-20, Ho Armstrong-26, Younger-21, StewartII-56 y otros) también es sabido que los ahora llamados interferones pueden ser inducidos por numerosos agentes, además de virus, y que pueden funcionar no sólo para conferir protección contra los virus en células normales y malignas.

Similarmente, el IFN es conocido como un inhibidor y modulador, ya -- que regula varios aspectos de la respuesta inmune.

El tipo de IFN producido por células linfoides o no, en respuesta a - virus o a polinucleótidos sintéticos, es el que conocemos como IFN Tipo I o IFN clásico. El IFN producido por linfocitos en respuesta celular a Ays específicos o por la proliferación celular como respuesta a mitógenos, se conoce como IFN Tipo II o IFN inmune. El tipo II difiere del I en que es - considerablemente más lábil a la exposición a un pH= 2. Como por otro lado el antisuero contra el tipo I no neutraliza el tipo II, se cree que tienen sitios antigénicos diferentes.

Pero no sólo el tipo I y II son diferentes, sino que hay además varios subtipos entre los cuales hay también notables diferencias tanto en sitios antigénicos como en peso molecular y otras propiedades. Respecto a los crite rios sobre los efectos en la respuesta inmune del IFN, tanto tipo I como II, se conoce lo siguiente:

EFFECTOS "IN VITRO".

1. Efectos en la producción de anticuerpos (Acs).

SE han realizado estudios con eritrocitos de carnero, linfocitos T y B o macrófagos, tratándolos por separado con IFN, obteniéndose como resultado el decremento o supresión de la producción de Acs, dependiendo esto de la cantidad de unidades de IFN empleadas.

Concluyen los autores Gisler y cols (124) que el IFN no tiene efectos sobre macrófagos en su papel de célula soporte durante la reacción primaria, ayudando en linfocitos T . Además demostraron que las dosis de IFN emplea-- das y el tiempo de adición del mismo en el cultivo tiene un efecto supresivo o potenciador de la respuesta inmune primaria.

Así, varios autores han demostrado que el IFN puede ~~in~~hibir, o bajo ciertas circunstancias específicas potenciar, la respuesta primaria de Acs a -- Ays .

Otros autores realizaron experimentos en cultivos celulares de riñón de ratón, encontrando que el IFN actúa en la inhibición de Acs primarios - dependiendo de la etapa en que se añade, y sus resultados sugieren que el IFN actúa en varios eventos primarios involucrados en la inducción de la -- producción de Acs, lo que se manifiesta después en el sistema "in vitro".

En suma, concluye Stewart II(56) que el IFN ha sido reportado como capaz de afectar ambas respuestas (primaria y secundaria) de Acs "in vitro". Este efecto toma fuerza en los eventos tempranos, pues muchos datos indican que la exposición de cultivos al IFN por sólo 4 horas fue suficiente para afectar la formación de Acs 5 días después. En los sistemas productores de Acs "in vitro", el IFN parece afectar los linfocitos B primariamente pero no afecta ni macrófagos ni linfocitos T. La dosis de IFN y el tiempo de administración relativo es crítico en la determinación del efecto; el máximo efecto inmunosupresor fue observado cuando el IFN se añade al mismo tiempo que el antígeno (Ag). El IFN tipo I por sí mismo es inmunosupresor cuando -- se añade al mismo tiempo que el Ag probado.

Bajo ciertas circunstancias el IFN tipo I puede tener un efecto potenciador de la respuesta inmune primaria de Acs "in vitro", si es dado a bajas dosis o en varios intervalos después del Ag.

2. Efecto en la expresión de antígenos de superficie.

Lindahl y cols. (129) fueron quienes realizaron varios estudios con -- linfocitos sensibilizados, utilizando Cr⁵¹ como marcador para probar los efectos del IFN en la respuesta de Acs de superficie, encontrando como resultados que el IFN tipo I "in vitro" puede afectar la citotoxicidad de linfocitos de ratón sensibilizados por células tumorales y potenciar la expresión de Acs de histocompatibilidad en células tumorales de ratón, el efecto del IFN en la citotoxicidad de linfocitos requiere sólo de 3 a 4 horas de pretratamiento con bajos niveles de IFN, mientras que el efecto en la expresión -- de Acs de superficie requiere de por lo menos 12 a 24 horas con dosis más altas de IFN. Si bien el mecanismo de acción en algunos de estos efectos es co-

nocido, se sabe que éstos sólo funcionan en los Ags de superficie que no están expresados al máximo.

3. Efectos en la proliferación de células inmunes.

Una vez establecido que las preparaciones de IFN inhibían la multiplicación celular de varios cultivos celulares "in vitro", tanto de células tumorales como normales, fue lógico para los investigadores examinar la respuesta proliferativa de linfocitos estimulados por agentes mitogénicos.

Lindahl (125) y más recientemente Pacheco (126) realizaron estudios al respecto encontrando que numerosas preparaciones de IFN tipo I han demostrado inhibir la proliferación de linfocitos frente a agentes mitogénicos, y que el IFN adicionado justo antes o simultáneamente al agente da el máximo efecto inhibitor.

El efecto es en la síntesis de ambos ácidos nucleicos y se pierde si el IFN se añade 24 horas después de iniciado el cultivo. Los niveles de IFN vistos en pacientes tratados con IFN son suficientes para suprimir la respuesta proliferativa de los linfocitos donadores a muchos antígenos y mitógenos, sugiriendo ésto que ambos tipos de linfocitos son afectados por el IFN.

4. Efectos en la fagocitosis.

Siendo conocido que tanto el IFN como sus inductores pueden suprimir la infección por varios agentes no virales y que los macrófagos a veces juegan el papel de llave en la fagocitosis y eventual destrucción de tales agentes, Huang y cols (127) investigaron la posibilidad de que el IFN pueda tener algún efecto en la propiedad fagocítica de los macrófagos y los resultados fueron que diversas preparaciones de IFN tipo I pueden incrementar la proporción de células peritoneales mononucleares capaces de fagocitar partículas inertes de carbón.

Se requieren más investigaciones para establecer las condiciones en las que el IFN tiene ese efecto en la fagocitosis por macrófagos de bacterias, hongos y otros parásitos.

EFFECTOS DEL IFN EN LA RESPUESTA INMUNE "IN VIVO".

1. Efectos en la producción de anticuerpos.

La cantidad de IFN requerida para producir un efecto en varios aspectos de la respuesta inmune en el sistema "in vivo" es considerablemente más grande que la requerida para lograr los mismos efectos "in vitro". Stewart - II (56) nos explica los resultados obtenidos por varios autores :

El tratamiento "in vivo" de ratones con IFN tipo I ha demostrado ser supresor de la respuesta primaria y secundaria de Acs debido a Acs timo-dependientes, y de la respuesta primaria en los timo-independientes.

La dosis de IFN, el tiempo de administración y las dosis del Ag prueba son factores críticos en la determinación del efecto del IFN. Los máximos efectos inmunosupresores en la respuesta primaria ocurren cuando el IFN se añade de 4 a 48 horas antes del Ag, y a bajas dosis de IFN dadas después del Ag tienen un mínimo incremento. El IFN parece actuar directamente en la respuesta primaria por medio de su acción en los macrófagos y células B.

El IFN tipo I puede también reducir la producción de IgE por células de ratón.

2. Efectos en varios aspectos de inmunidad celular.

a. Expresión de Acs de histocompatibilidad. Lindahl y cols. (125) habían demostrado previamente que el tratamiento con IFN de timocitos y células del bazo "in vitro", daba como resultado un incremento en la expresión de los Acs de histocompatibilidad. Más recientemente realizaron estudios para observar el efecto "in vivo" de los Acs de histocompatibilidad en los mismos tipos celulares con el marcador Cr⁵¹. El tratamiento con IFN no produjo por sí mismo un decremento en el total de células, ni de timocitos ni de células del bazo, así que los investigadores dedujeron que el IFN no funciona como un mecanismo de destrucción selectiva o de inhibición de la población con el Ag - H2, pero sí produce un incremento de los Acs -H2 de los timocitos. Similar a lo observado "in vitro", el IFN parecía tener un mayor efecto en -

en las células tímicas.

Hay una observación que varía en los estudios "in vivo" y los "in vitro"; mientras que "in vitro" se observó incremento por el IFN sólo en células jóvenes de bazo, el efecto "in vivo" se dió tanto en células jóvenes como maduras, siendo una posible explicación el hecho de que "in vivo" las cantidades de IFN pueden ser moduladas por la célula y esto no es factible "in vitro".

b. Respuesta proliferativa a mitógenos. El efecto inmunosupresor observado cuando el IFN se añado "in vivo" a linfocitos estimulados por mitógenos, se ha visto también cuando se han tratado animales vivos, con IFN.

Estudios concernientes al efecto del IFN en la respuesta a mitógenos por linfocitos vivos han sido realizados por Brodeur y Merigan (130) y Pacheco (126), y los resultados indican que el IFN administrado "in vivo" a ratones ocasiona una depresión de la respuesta proliferativa de linfocitos, este efecto inmunosupresor es dependiente de la dosis y del tiempo, teniendo un máximo de respuesta cuando el IFN se da 24 horas antes del mitógeno. Los linfocitos de pacientes tratados con el inductor Poly (rI).Poly(rC) muestran también cierto efecto disminuído de la respuesta proliferativa.

c. Hipersensibilidad de tipo retardada. Debido a las numerosas observaciones concernientes al efecto inmunosupresor de los virus, De Maeyer y cols (129) decidieron investigar la posibilidad de que la inmunosupresión inducida por virus pudiera estar mediada por el IFN y sus inductores, concluyendo que el tratamiento de animales con IFN producía un efecto inhibitor en la hipersensibilidad de tipo retardado, siendo el efecto del IFN válido sólo si éste se administraba el día anterior a la exposición al hapteno o Ag; en suma, el IFN tipo I puede inhibir la respuesta aferente y deferente de la hipersensibilidad retardada frente a Ags y haptenos.

d. Inmunidad en trasplantes. Los más recientes estudios realizados en la URSS sugieren que el suero que contiene bajos niveles de IFN químicamente inducido o viral, administrado a ratones después de un aloinjerto, causa una

aceleración del rechazo del injerto en un lapso de 3 días. En contraste a estos estudios, otras investigaciones indican que el IFN tipo I en muy altas dosis puede retardar el rechazo de aloinjertos por varios días, no habiendo de momento argumentos que apoyen dichos hallazgos y quedando pendientes de respuesta ambas posibilidades.

3. Efectos en la fagocitosis.

Parece ser que el IFN tipo I por sí mismo tiene "in vivo" un efecto potenciador de la fagocitosis (Stewart II 56), requiriéndose, sin embargo, una dosis 10 000 veces mayor para causar el mismo efecto "in vitro".

4. Efectos en el complemento.

Se ha encontrado que el IFN y algunos de sus inductores ocasionan cambios en los niveles de complemento. En el suero de ratones con tumores malignos ; que han sido tratados con IFN humano, se ha observado un decremento en la reacción de fijación de complemento a numerosos virus y micoplasmas. Esto ocurre generalmente a los 3 meses del tratamiento con IFN y persiste hasta 12 meses después de terminado el tratamiento.

OBSERVACIONES ACERCA DEL SISTEMA INMUNE RELACIONADAS A PACIENTES TRATADOS CON INTERFERON.

La evaluación de los efectos de la terapia con IFN "in vivo" en humanos está complicada por el hecho de que muchos pacientes pueden estar siendo tratados con otros fármacos, además del IFN. Los estudios conciernen básicamente a pacientes con algún tumor maligno, y tratados con agentes quimioterapéuticos que ocasionan inmunosupresión además de sus efectos citostáticos y citocidas en las células tumorales.

También el proceso maligno por sí mismo puede ocasionar efectos depresivos en la respuesta inmune. Sin embargo, dado el reciente incremento en el uso del IFN en este tipo de casos hace importante analizar datos acerca de su efecto en la respuesta inmune.

Stewart II (56) obtuvo los siguientes datos, recopilados de diversos --

estudios:

Los ensayos clínicos con el IFN en el tratamiento de pacientes con enfermedades malignas y/o infecciones han rendido bastante información acerca de la respuesta inmune frente al IFN. El IFN usado en pruebas clínicas fue -- del tipo I (ácido resistente), empleando dosis masivas de 4×10^4 hasta de 1×10^7 unidades /ml. al día, en cantidades suficientes para alcanzar niveles en el suero de 50 a 100 U/ml. Se encontró ,en general, que el IFN no era --- tóxico ni antigénico en los humanos. Por otro lado, no se presentaron alteraciones en los linfocitos y los niveles de inmunoglobulinas prácticamente -- no fueron alterados.

Los pacientes tratados con IFN para sus tumores malignos no tuvieron -- virtualmente infecciones virales, y las que hubo fueron menos severas que en los pacientes no tratados con IFN. En el capítulo dedicado a usos del IFN se hablará más ampliamente de sus efectos.

CAPITULO III

INDUCTORES DEL INTERFERON.

Una amplia variedad de virus, microorganismos y productos fúngicos, ácidos nucleicos tanto de origen animal como sintéticos, polímeros y sustancias de bajo peso molecular han demostrado ser eficientes para inducir la producción de IFN en cultivos de células y /o en organismos completos. (Stewart II 56, Kleinschmidt 32, Merigan 20 y otros).

Ho y Armstrong (117) recientemente presentaron la clasificación más común sobre inductores que dice:

1. Se consideran inductores del tipo A aquellas sustancias capaces de estimular por lo menos 10^3 unidades por mililitro de IFN en cultivos celulares y en sangre cicularante de animales cuando es administrado en cantidades de microgramos.

2. Los inductores del tipo B, por otro lado, son casi inactivos en cultivo celular y también son inferiores en términos de la cantidad de IFN producida generalmente mucho menos a 10^3 U/ml, y la cantidad de inductor requerida, -- que puede ser altamente tóxica a la célula, está en cantidades hasta de miligramos. Ho y Armstrong clasificaron separadamente estos inductores en inductores de linfocitos o macrófagos e inductores de fibroblastos.

Stewart II (31) y Cordell, explican que toda clase de inductores de tipo A contienen por sí mismos una doble cadena de ARN que, en el caso de virus, aparentemente realizan la síntesis directa de la doble cadena de ARN en alguna etapa durante su replicación intracelular.

Si la designación de "inductor" es aplicada en su significado genético, el término se aplicaría solamente a sustancias cuyas moléculas tuvieran el papel de iniciador de los eventos para obtener como producto final una nueva protefina particular. El ARN de doble cadena parece ser el candidato más indicado para el papel de molécula inductora.

En la actualidad se ha trabajado en toda una serie de sustancias que -- han demostrado ser capaces de inducir cantidades aceptables de IFN; vamos a

ocuparnos de ellos y de algunos de sus requerimientos e inconvenientes.

MECANISMO DE INDUCCION DEL INTERFERON POR POLINUCLEOTIDOS SINTETICOS.

El mecanismo de inducción del IFN involucra la aparición de una proteína antiviral, que es el interferón, por medio de un inductor bien definido y su interacción subsecuente con la célula, lo cual conduce al desarrollo -- del estado antiviral.

El IFN puede ser inducido en cultivos celulares por polinucleótidos sintéticos como son los complejos de doble cadena de los ácidos poli-inosínico y poli-citidílico -Poly (rI).Poly(rC) -, como han demostrado en sus investigaciones Kleinschmidt (32) y De Clercq (33). Ambos inductores activan el genoma celular y el ARN mensajero del IFN para que éste sea sintetizado.

De Clercq ha presentado evidencias de que en este sistema la síntesis de ADN y ARN junto con otras proteínas es esencial. La producción de IFN en cultivo celular inducido por virus de Newcastle y por Poly(rI).Poly (rC) -- muestra una diferente sensibilidad a la Campotericina, que es inhibidora de la síntesis de ADN y ARN, lo cual reafirma lo antes dicho respecto a la relación de la producción de IFN con dichas moléculas.

La inducción del IFN por polinucleótidos sintéticos, como Poly (rI). -- Poly (rC), no es un proceso simple. Involucra una serie de pasos, así, hay ciertos requerimientos estructurales que deben cumplirse para que la función de los polinucleótidos sea llevada a cabo.

En primer lugar, para ser un inductor activo de IFN, el polinucleótido o el polímero sintético debe contener en su estructura molecular una secuencia densa y regular de cargas negativas, es decir, debe ser un polianión. Como puede notarse, los requerimientos son más o menos específicos.

Respecto a la etapa en que el inductor hace contacto con la célula, cabe decir que no es un paso que regule grandemente el proceso de inducción. Datos obtenidos por Ho (26) y De Clercq (33) indican que la inducción debe ocurrir por el contacto externo del inductor con la membrana celular. La activación de la inducción causa la inactivación o represión del genoma celu-

lar y permite la transcripción del gene del IFN y la síntesis de ARNm del IFN. Las síntesis del IFN y de su ARNm en fibroblastos humanos inducidos por Poly (rI).Poly (rC), parecen ir estrechamente paralelas. Esto indica que la producción de IFN por polinucleótidos sintéticos en la célula es una síntesis "nueva" y eso elimina la posibilidad de que el inductor realice la activación de moléculas preformadas de IFN.

La síntesis de IFN en las células parece estar regulada por la célula a un nivel post- transcripción, como explican Stewart II (56) y Havell (38). Esta conclusión está basada en experimentos con inhibidores metabólicos y no ha sido aún confirmada a nivel molecular.

Después de que el IFN ha sido sintetizado, pasa a otra célula o pasa al medio externo celular y el efecto antiviral es inducido. Hay evidencias experimentales que demuestran que la inducción del estado antiviral es un fenómeno de membrana.

RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA DEL POLINUCLEOTIDO Y SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

Stewart II (56) y Kleinschmidt (32) explican que, además de la antes -- mencionada relación entre la estructura del inductor y su eficiencia como -- tal, hay factores muy importantes y otros más bien triviales o que tienen poca importancia en el fenómeno de inducción. Según estos autores, las propiedades esenciales de un inductor son :

1. La presencia de un grupo 2-OH (2- hidróxilo) en un azúcar central del polinucleótido.
2. Alto peso molecular.
3. Resistencia adecuada del polinucleótido a la degradación.
1. Presencia de un grupo 2-OH.

La presencia de ribosa parece ser una exigencia estructural para que -- ocurra la inducción; se ha demostrado que solo polímeros que contengan ribosa son buenos inductores. También en este aspecto , se ha demostrado experi-

mentalmente que interviene la posición de la ribosa, ya que habiéndose probado diferentes posiciones, se han encontrado diferentes resistencias a la degradación. Pero en el punto más adecuado para evitar la degradación, se encuentra también que el inductor resulta disminuido en su efecto como tal, lo cual indica que la disminución de habilidad inductora está directamente relacionada con la posición del grupo 2 -OH del residuo de ribosa antes mencionado. Se ha tratado de hacer diferentes sustituciones en la posición 2 con diferentes radicales, obteniéndose los resultados de la tabla I.

Como puede verse, algunas modificaciones estructurales estabilizan al nucleótido contra la actividad degradativa de la ribonucleasa, pero en todos los casos hay decrecimiento en la actividad antiviral, como demostraron Ho y cols. (26).

La sustitución de la posición 2 no afecta grandemente el peso molecular ni su estabilidad térmica (T_m = temperatura a la cual se disocia el 50% de la doble cadena del complejo). Esto nos indica que la pérdida de la habilidad inductora va en relación directa a la sustitución del radical 2-OH de la ribosa.

La importancia del mencionado grupo 2-OH en la inducción es debido a que la posición se encuentra fuera de la hélice de ARN y puede ser parte directa de la señal de reconocimiento ; aún más, se ha encontrado que la presencia de grupos hidróxilo en la configuración de pentosas fosfatadas en la estructura de la cadena del polinucleótido sirve como una de las determinantes del sitio de reconocimiento en el receptor del polinucleótido. (Merigan Finkestein 20).

Merigan y cols. demostraron que la modificación química del residuo ribosa, como el 2-OH en la cadena del Poly (rI).Poly (rC), reduce drásticamente la actividad del complejo, demostrando esto con una prueba de Acs anti-polinucleótido.

En resumen, los cambios estructurales con cambios en los sitios de reconocimiento hacen que el complejo pierda capacidad inductora.

T A B L A I.

Efecto de la metilación de 2-OH del residuo ribosa en la actividad antiviral de los complejos de poliribonucleótidos de doble cadena.

COMPLEJO	SUSTITUCION HOMOPOLIMERO		Tm °C	RESISTENCIA	ACTIVIDAD
	MODIFICADO			A NUCLEASAS	ANTIVIRAL.
Poly (rI).Poly(rC)	---	-----	62°	1	1
	2'-H	Poly (rC)	52°	< 0.01	> 1
		Poly (rI)	35°	< 0.01	> 1
	2'-Cl	Poly (rC)	66°	< 0.01	> 1
	2'-O-CH ₃	Poly (rC)	61.5°	< 0.01	> 1
Poly(rA).Poly(rU)	---	-----	56°	1	1
	2'-F	Poly (rU)	75°	0.1	> 1
	2'-Cl	Poly (rU)	56°	0.01	> 1
	2'-O-CH ₃	Poly (rU)	70°	0.01	> 1
	2'-N ₃	Poly (rU)	59°	0.01	> 1
	2'-O-CO-CH ₃	Poly (rU)	57°	0.01	> 1
		Poly (rA)	30°	0.01	> 1.

Los valores obtenidos anteriormente son comparativos con el valor de uno, considerado para los polinucleótidos originales.

Finalmente, debemos considerar la posibilidad de que el residuo de ribosa en la cadena del inductor sea esencial para que el inductor sea transportado por la ribonucleasa transportadora.

Según Merigan (20), el Poly(rI).Poly(rC) puede inducir la actividad de la ribonucleasa transportadora asociada a la membrana celular. Es sabido que la entrada del complejo a la célula se facilita por ribonucleasas asociadas a la membrana.

Recientemente se ha demostrado que la actividad del Poly(rI).Poly(rC) en cultivos celulares puede restituirse o incluso excederse si los homopolímeros constituyentes son adicionados sistemáticamente. Merigan realizó experimentos encaminados a la demostración del funcionamiento del complejo Poly(rI).Poly(rC), y del papel que desempeña cada uno de ellos en el proceso y en el mecanismo de acción. Sus experimentos se realizaron en cultivos celulares de riñón de conejo. La inducción fue medida por medio de la observación de placas virales, utilizando virus de estomatitis vesicular (VSV), y el IFN fue caracterizado con tripsina y por su resistencia frente a la ribonucleasa pancreática. La producción fue determinada en diferentes intervalos de tiempo después de la exposición al complejo completo, adicionando primariamente el Poly (rI) seguido del Poly(rC) y viceversa, y también usándolos por separado.

Los resultados muestran claramente que el régimen Poly(rI) seguido de Poly (rC) produjo una respuesta de IFN mucho más alta que el régimen de Poly (rC) seguido de Poly (rI). Las cantidades de IFN producidas en los inicios no muestran una diferencia marcada; sin embargo, después de 7-24 horas los títulos de IFN producidos por Poly (rI) seguido de Poly (rC) son consistentemente más altos que en los otros casos, dándose los valores más bajos con el uso de cada complejo por separado.

La posible explicación de esto es que el complejo Poly (rI) Poly(rC) está más firmemente enlazado a la célula si los polímeros son adicionados en ese orden.

Para demostrar dicha hipótesis, se utilizaron cultivos celulares que fueron tratados con el polímero complejo o con cada polímero por separado y después tratados con ribonucleasa pancreática o poli-lisina; se esperó la producción de IFN y se encontró que los títulos se redujeron marcadamente con Poly(rC)Poly(rI) y con cada complejo separado, y que hubo menor reducción con el complejo Poly (rI).Poly(rC). Las células expuestas son, por tanto las más protegidas cuando se usa este complejo y en ese orden.

Estos estudios demuestran que la adición del complejo Poly(rI).Poly(rC) da al enlace más firmeza y eficiencia, y sugiere que el sitio receptor en el complejo es reconocido mucho antes en la parte de Poly(rI) que en la Poly(rC).

RELACION DEL PESO MOLECULAR DEL RIBONUCLEOTIDO CON SU CAPACIDAD INDUCTORA.

La capacidad inductora del complejo Poly(rI).Poly(rC) parece estar relacionada con el peso molecular, circunstancia que ocasiona una sustancial reducción de posibilidades, ya que reducciones en el tamaño molecular del complejo conllevan la reducción de la actividad antiviral.

Stewart II (56) señala que en algunos análisis se ha visto que el intervalo de pesos moleculares debe ser entre 5 S y 10 S (10^4 a 12×10^4 dältons). Sin embargo, cuando el peso molecular es mayor de 10 S la actividad decrece y algo similar ocurre cuando es menor a 5 S, de donde se señala el intervalo óptimo entre estas cifras.

RELACION DE LA RESISTENCIA A LA DEGRADACION CON EL PODER DE INDUCCION.

La resistencia a la degradación es también un factor importante como ya se mencionó; la actividad de ciertas enzimas es una de las causas del decremento de la actividad antiviral. Esto está basado en los experimentos de Stewart II (56) y De Clercq (33), quienes demostraron que cuanto más resistente es un polímero a la degradación, tanto más poder de inductor tiene.

La adición de sustancias como la poli-lisina al complejo, por el contra

rio, incrementa la producción del IFN. La importancia de la resistencia a las nucleasas tiene como base la observación en diferentes animales así como estudios en cultivos celulares. Se ha dilucidado que el incremento de la actividad biológica del complejo está relacionada a otros factores, además de la resistencia a la degradación, como el ya indicado grupo 2-OH de la ribosa. Siendo los factores determinantes los ya enumerados, aún restan otros que también participan en el buen funcionamiento del complejo.

Para la inducción es también importante que el inductor presente una estructura compleja, como lo es el ser un polinucleótido de doble cadena y estructura secundaria.

El IFN se induce de diversas maneras por polianiones naturales y sintéticos incluyendo polinucleótidos, plásticos y polisacáridos. Las similitudes en la estructura secundaria de estas sustancias fue sugerida en trabajos realizados por Merigan (20) quien ha obtenido resultados trabajando con diversas sustancias con estructura de doble hélice. Los ácidos nucleicos de doble cadena con un alto potencial de inducción han sido obtenidos de diversas fuentes, desde hongos, bacterias y animales hasta virus de plantas.

Un ácido nucleico sintético al cual nos hemos referido ampliamente es el Poly (rI).Poly(rC), que se considera un derivado del ácido policitidílico que es acoplado al ácido poliinosílico; este par de sustancias ha demostrado ser el más activo inductor, y es además fácil de obtener de fuentes comerciales. Quizá es por esta razón que sea el inductor más estudiado hasta el momento. Aproximadamente otros 40 ácidos nucleicos han sido estudiados con relación a su habilidad inductora, y de ahí ha surgido el conocimiento de las necesidades estructurales del inductor.

Merigan considera que otro inductor, el ARN de doble cadena es mucho más efectivo que cualquiera otro y que las moléculas de doble cadena formadas complementariamente por pares de bases son mucho más efectivas y activas que 3 o 4 cadenas de moléculas de cadena sencilla.

Los complejos de doble cadena pueden formarse entre 2 homopolímeros al-

ser complementarios o a través de un proceso llamado templado, en el que son enlazados los polímeros alternativos o las dos cadenas semejantes. Experimentos similares se han hecho con ARN natural y se ha observado gran contraste entre la baja actividad de la cadena simple y la del complejo de una doble - cadena replicativa.

Estos tipos de homopolímeros que tienden a formar complejos de policade- nas tienen una actividad muy alta ejemplos de ellos son el ácido inosínico - y el poliguanílico, así como el polixantínico, y como agregados puede hablar se de los ácidos poliadenílico y policitidílico.

Merigan (29) afirma que es posible que la estimulación natural del IFN involucre la síntesis o la localización de una cadena simple de ARN en el -- sitio crítico dentro de la célula, más allá del nivel donde actúan los re-- querimientos de dobles cadenas.

El requerimiento de una estructura secundaria estable está básicamente relacionado a la resistencia térmica de esas moléculas, y como ya sabemos -- tiene mucho que ver con la actividad inductora. La estabilidad térmica de la doble cadena puede extrapolarse a la T_m , ya que mientras más alta es la T_m - el polímero es más estable. Sólo los polinucleótidos que tienen su T_m mayor de 60°C poseen máxima actividad antiviral, y por tanto resultan los induc-- tores óptimos.

Sin embargo, el potencial antiviral no está correlacionado con el incre- mento muy elevado de T_m , ya que el complejo más activo, el Poly (rI).Poly(- rC), tiene una T_m de 62°C a diferencia de complejos menos activos con T_m -- muy alta, como el Poly (rA).Poly (rU) con T_m de 69°C y el Poly(rG).Poly(rC) de T_m mayor de 100°C .

La actividad de los polinucleótidos complejos se puede inducir por in-- cubación a 37°C en presencia de cationes divalentes como Mg^{++} y Ca^{++} .

Algunas conclusiones de lo expuesto pueden resumirse como sigue:

1. Los inductores tienen una estructura que puede compararse a la de los --

ácidos nucleicos virales.

2. La interrupción de una de las cadenas en la hélice del complejo reduce la actividad inductora del IFN.
3. El complejo Poly(rI).Poly(rC) es más activo biológicamente que el Poly(-rC).Poly(rI).
4. Es necesario que el complejo inductor forme una doble cadena por medio de la asociación de pares de bases en su estructura.
5. Al ser un sistema biológico, requiere de condiciones especiales como los sistemas vivos, como son la temperatura de 37°C y la presencia de cationes divalentes como Ca++ y Mg++.

OTROS INDUCTORES DEL INTERFERON.

Ya hemos mencionado las características necesarias de una molécula para ser un buen inductor de IFN; no obstante, cabe mencionar otras sustancias -- que se han estudiado con este fin, si bien no han dado los mejores resultados, pero que han servido como pautas a seguir en la experimentación relacionada al IFN.

1. Cadenas simples de polinucleótidos.

De Clercq (33) y Merigan(28) estudiaron ampliamente una gama de inductores y, si bien sabían que era necesario tener una estructura de doble hélice encontraron varias excepciones como son el Poly (rG), Poly (rI) y el Poly (rX); todos estos homopolímeros resultaron ser más o menos buenos inductores, y dieron pie para estudios posteriores de algunas combinaciones entre ellos, y que son buenos inductores.

Así, bajo condiciones experimentales adecuadas, estas cadenas simples pueden formar cadenas dobles o multicadenas complejas.

Fue así como se encontró que las cadenas inactivas de Poly(rI) y de Poly(rC) incapaces de producir un buen estado antiviral por ellas mismas, cuando se plegaban formando un complejo producían excelentes cantidades de IFN -- en las células, y esto se lograba adicionando sustancias como la DEAD-dex---

trana y polilisina.

Este fue el punto de partida para el descubrimiento de que es necesaria la formación de un complejo y la presencia de cationes.

2. El efecto de compuestos polibásicos.

El pretratamiento de las células con sustancias polibásicas como DEAE-dextrana o poli-lisina, o la adición de estas sustancias con el inductor, incrementa la actividad antiviral. Los investigadores atribuyeron muchos de estos efectos a un incremento de la asimilación del inductor y a su protección contra la degradación por nucleasas.

Estudios con Poly(rI).Poly(rC) muestran que éstos forman un complejo terciario con DEAE-dextrana en una equivalencia de 1:1. Se ha sugerido que el cambio en la porción de masa, cuando ocurre la formación del complejo va acompañada de un incremento en la resistencia a la degradación por ribonucleasa pancreática; el efecto del DEAE-dextrana puede ser explicado sólo por la acción directa del complejo polibásico sobre la membrana celular, y existen datos que indican que los determinantes de reconocimiento se encuentran en el complejo polinucleótido (Kleinschmidt 32).

3. Otros inductores en estudio.

Uno de ellos es el copolímero formado por grupos carboxílicos, que pueden presentarse en diferentes posiciones a lo largo de la cadena del polímero; no se han observado variaciones en la producción de IFN pese a múltiples cambios en la cadena. Otras modificaciones, como la adición de grupos amida, no afectan tampoco. Estos compuestos no funcionan bien por el peso molecular que comparado con compuestos activos se deduce que debe ser mayor de 3 000. De cualquier manera, algo interesante es, el hecho de que los inductores tienen componentes polianiónicos, incluyendo los polinucleótidos. Cabe mencionar la suposición de Kleinschmidt (32) de que los polianiones actúan en la represión de la síntesis de ARN.

El año de 1983 se llevó a cabo en La Habana, Cuba un congreso sobre el

IFN y algunos de sus inductores que se mencionaron como viables son :

a. Compuestos naturales inductores del IFN. Tanto en la URSS como en otros países se está prestando gran atención a compuestos de origen natural que pueden inducir la producción del IFN humano. Entre éstos se encuentran extractos de Eleuterococcus senticosus maxim, Panax Ginseng G.A., Aralia man dshuria y otros. Se están haciendo características comparativas de los extractos y hasta la fecha los resultados parecen favorables. Se han empleado estos materiales biológicamente activos en la quimioterapia, como adyuvantes, así como en la radioterapia intensiva.

b. Se ha estudiado la inducción de IFN en los leucocitos de pollo con Conca-navalina A (Con A). En suspensiones de leucocitos expuestos a Con A se induce la inducción y producción de IFN, y al cuarto día de tratamiento se alcanzó un nivel de producción de 10^3 U/ml; el IFN se establece a pH =2, lábil a 56°C y sensible a la tripsina. Se encontró también que se puede potenciar la producción del IFN con el éster de formol 12-0-tetradecanoil (formol - 13 -- acetato).

En combinación con Con A , aún se realizan estudios que darán resultado para próximos estudios.

c. En 1983 se realizaron también trabajos sobre inducción del IFN por flavo-virus y arbovirus en células de línea (L-M); el IFN inducido por 6 tipos de flavovirus se comparó con el efecto de 5 tipos de arbovirus en células fibroblásticas de ratón (L-M) encontrándose, que los arbovirus inducen cantidades significativamente mayores de IFN que los flavovirus.

d. Inducción del IFN en las células L por partículas defectuosas de virus de la estomatitis vesicular .Los experimentos se han realizado en cultivos celulares BHK-21, con partículas defectuosas de VSV con diferentes contenidos de ARN. Se observaron las capacidades de tales partículas para producir IFN y se encontró que no hay relación con los contenidos de ARN sencillo.

e. En los más recientes estudios sobre inducción de IFN se están empleando mutantes de Escherichia coli (Pestka 105) y se han obtenido buenos resulta--

dos , aún cuando el costo actual continúa siendo elevado para su producción comercial.

CAPITULO IV.

POTENCIAL TERAPEUTICO DEL IFN.

TRATAMIENTO CON IFN HUMANO COMO AGENTE PROFILACTICO.

El presente capítulo nos presenta los datos hasta la fecha publicados que han permitido dilucidar el papel del IFN en el organismo y su uso en -- propósitos terapéuticos y profiláctico.

Las técnicas más comunes empleadas para tales fines son básicamente : la producción del interferón en cultivos celulares y su administración parenteral, la administración de diversos compuestos, principalmente ARN de doble cadena, tanto sintéticos como naturales capaces de estimular la producción del IFN endógeno, la administración de Acs específicos para el IFN . Al parecer el IFN ha demostrado ser útil en tres áreas médicas principalmente : profilaxis , terapia antiviral y antitumoral e inmunología clínica.

Es obvio que varias acciones del IFN, descritas al principio "invitro", tienen un potencial terapéutico y profiláctico, como son : la capacidad del IFN de inducir resistencia a la infección por virus y otros parásitos intracelulares; frenar el crecimiento celular, particularmente rápido en el caso de células tumorales, potenciar la expresión antigénica así como potenciar o inhibir las funciones inmunes.

Los IFNs son aparentemente inocuos, "no tóxicos" para células no infectadas y "no antigénicos" en especie. Las acciones del IFN pueden volverse evidentes en cuestión de horas y no hay un período refractario en las células después de su inducción por IFN, como explica Morgan (74), en contraste al efecto refractario que ocurre en las células durante una repetida estimulación por inductores.

Así, el IFN no sólo actúa rápidamente sino que es efectivo durante una repetida y prolongada administración, pudiendo observarse un incremento geométrico entre la respuesta antiviral y la concentración del IFN, los efectos pueden ser controlados por medio de la vía de administración y las diferentes dosis empleadas.

ESTUDIOS REALIZADOS "IN VIVO".

El uso más importante del IFN es en el campo de la profilaxis y terapia antiviral, ya que toda una serie de compuestos químicos empleados para dicho fin presentan una limitada aplicabilidad ; como explica en su trabajo Merigan T.C. (130), la resistencia viral a dichas sustancias se desarrolla rápidamente mientras que no han sido reportados virus que hayan desarrollado resistencia hacia un estado antiviral debido al IFN. Vacunas de virus atenuados o inactivados no son aún viables para la prevención de algunas enfermedades virales y otras no se pueden usar en situaciones adversas (por ej: en infecciones por influenza, parainfluenza y rinovirus), como la existencia de múltiples serotipos que presentan extensas variaciones antigénicas , estos virus generalmente no representan una amenaza a la vida, pero tienen -- una gran importancia económica por la morbilidad que ocasionan. Muy importantes también son diversos virus contra los cuales no se cuenta con vacunas aún, como los de la hepatitis, el virus sincicial respiratorio, los Echo virus y otros que causan epidemias y daños graves como meningitis y parálisis. Los virus Coxsackie causan frecuentemente epidemias de mialgias, problemas respiratorios, miocarditis, que pueden dejar secuelas como reporta, en sus trabajos sobre los efectos de los virus en el sistema cardiovascular Pankey (131).

Los Herpes virus tipos I y II ambos con afinidad neurotrópica son la -- causa de infecciones que pueden volverse latentes, crónicas y recurrentes, -- el tipo I causa lesiones recurrentes y algunas veces encefalitis, y el tipo II que al parecer se transmite por contacto sexual, ha sido implicado en el cáncer cervical.

En el caso de estos virus la posibilidad de una vacuna atenuada ha re-- presentado un gran esfuerzo y se ha comprobado que puede inducir infecciones latentes, por lo que su empleo representa un posible riesgo. Muchos virus de localización mundial causan enfermedades asintomáticas o rápidamente limitadas en individuos inmunocompetentes, sin embargo, estos mismos virus son --

una amenaza para la vida en el caso de individuos inmunodeficientes o inmunodeprimidos.

Dentro de los primeros seis meses después de un injerto, la persona receptora de trasplante renal inmunodeprimida es parcialmente susceptible a muy severas infecciones virales y en muchas ocasiones mortales. Así, es importante que un agente antiviral de amplio espectro sea disponible para un tratamiento y que pueda incluso emplearse antes de que el agente causal haya sido específicamente identificado, de este modo, un agente no tóxico que pueda ser efectivo en la prevención o terapia de diversas infecciones virales puede contribuir sustancialmente al desarrollo de otras formas de tratamiento y a mejorar la salud pública.

Un agente que también sea efectivo contra parásitos intracelulares nos daría una amplia ventaja sobre otros tipos de medicamentos.

El IFN puede ser considerado el antiviral no tóxico de amplio espectro mientras se encuentra otro antiviral "ideal". En muchas especies animales, el IFN ha demostrado ser inhibidor de la multiplicación y propagación de virus oncogénicos así como sus interacciones. El IFN puede demorar, inhibir o suprimir tumores inducidos por virus, como han encontrado en sus trabajos Averi y cols. (132), quienes observaron que el IFN inhibe la transformación celular por el virus del sarcoma murino.

Hasta ahora preparaciones humanas del IFN han demostrado ser capaces de producir actividad antiviral contra tumores viralmente inducidos en los primates; Laufs y cols (133) demostraron la influencia del IFN en la multiplicación de Herpes virus oncogénicos tanto en cultivos celulares como en primates no humanos.

Los IFNs humanos son capaces de inducir actividad celular, no sólo del estado antiviral sino también de efectos sobre las células huésped que pueden mediar acciones antitumorales, muchas de las células pueden intervenir en la inhibición del tumor.

Todas las consideraciones anteriores son un poderoso incentivo para el

estudio de los efectos de los IFNs homólogos en tumores humanos de posible etiología viral.

EL SISTEMA DEL INTERFERON EN INFECCIONES VIRALES NATURALES.

Muchas infecciones virales en la naturaleza no suscitan enfermedades -- sintomáticas. La diseminación de múltiples virus es efectivamente detenida -- por los mecanismos de defensa del organismo; en los casos de infecciones pri-- marias en que no hay inmunidad previa, se cree que el sistema del interferón contribuye de manera importante en la capacidad del organismo susceptible pa-- ra resistir la diseminación interna de algunos virus altamente infecciosos.

Stewart II (56) ha encontrado evidencias que indican que la activación del sistema del IFN por un virus invasor constituye uno de los primeros meca-- nismos de defensa del organismo. Con sus estudios ha demostrado que el meca-- nismo de inducción y acción del IFN se activa de manera efectiva en un tiem-- po corto (entre 5 y 17 horas), siendo el total del tiempo requerido conside-- rablemente menor que el que necesita la respuesta primaria de Acs, que es de algunos días.

Aún en presencia de Acs, el sistema del IFN parece ser un importante -- componente natural de resistencia del huésped, lo que se ha podido comprobar titulando las cantidades de IFN que pueden localizarse en los sitios de mul-- tiplicación viral.

Los sitios de acción del IFN y de los Acs no son los mismos; el IFN ejer-- se su acción intracelularmente, en el sitio de replicación viral mientras -- que los Acs reaccionan en fluidos extracelulares directamente con los virio-- nes, antes de que estos penetren a la célula. Sin embargo, en gran parte de las infecciones virales la importancia relativa del IFN es difícil de apre-- ciar de manera precisa principalmente por las complejas y numerosas respues-- tas del huésped hacia los virus invasores.

Muchos investigadores han tratado de determinar si el incremento en la susceptibilidad de algunos individuos a las infecciones virales puede deber--

se a defectos en su sistema de IFN. Los resultados de la mayoría indican -- que la actividad del IFN parece contribuir significativamente en la resisten-
cia de la infección viral, en algunas enfermedades de manera muy notable y -
en otras apenas perceptible. También hay marcada diferencia si el IFN ha si-
do administrado de manera exógena lo que ayuda a reforzar y alargar la pro--
tección contra los virus, que confiere el IFN endógenamente .

FARMACOCINETICA Y ESTUDIOS DE TOXICIDAD CON EL INTERFERON.

Un punto muy importante en el estudio de cualquier sustancia farmacoló-
gicamente activa es su cinética dentro del organismo y sus posibles conse---
cuencias mediatas o inmediatas, de ahí que un gran número de investigadores
se han orientado al estudio de la posible toxicidad del IFN y de sus inducto-
res (Stewart II, Merigan, Ho M y otros).

Ho (26, 117) encontró que el IFN tiene una vida media muy corta en vivo
y probablemente puede medirse en los minutos posteriores a su inoculación in-
travenosa y en horas en la inoculación intramuscular.

La inoculación subcutánea demostró dar niveles del IFN de mayor dura---
ción, pero esta vía de administración ha sido usada sólo en los más recien--
tes estudios. El patrón de acción del IFN es similar en todas las especies -
estudiadas, rápido al principio y después más lento; en el hombre, como en--
contró en sus estudios Stewart II (56) este patrón permite mantener un nivel
constante de IFN por la administración de una dosis "alta" y posteriormente
la mitad de esa dosis cada 12 horas; con aproximadamente 2×10^5 U de IFN --
por Kg de peso corporal, se puede mantener 100 U de actividad antiviral por
litro de plasma durante 12 horas. No se ha encontrado a la fecha otro méto-
do para prolongar esta fase de meseta que no sea la aplicación inicial de --
una alta dosis.

El IFN se excreta en una paqueña cantidad en la orina; en sus experimen-
tos Ho encontró que con un nivel de 200 U antivirales por ml de suero, sólo
10 U por ml se encontraron en la orina, con lo que puede considerarse que el

IFN se difunde rápidamente en los tejidos y los órganos para ser liberado -- lentamente después de un período de tiempo.

La barrera sanguínea cerebral puede ser un importante, si no absoluto, obstáculo para alcanzar el sistema nervioso central. Otras barreras para la difusión del IFN son la barrera sanguínea del ojo y posiblemente la placenta ; sin embargo, Korsantiya y cols (134) trabajaron en la transmisión --- transplacentaria del IFN endógeno y los resultados indican que el IFN cruzó la placenta en las pruebas efectuadas en ratas preñadas infectadas con virus de Newcastle. Estos resultados fueron discuridos por otros investigadores -- que atribuyen el resultado a la transmisión del IFN a través de la leche materna.

Respecto a la toxicidad en dosis efectivas en terapia antiviral, sólo - han sido reportadas algunas molestias leves como eritema local y fiebre tran- sitoria en pacientes que han recibido IFN leucocitario humano; aún estos mí- nimos efectos no pueden atribuirse directamente al IFN "per se ", ya que -- todas las preparaciones empleadas en el presente y en el pasado tienen en su composición otras proteínas además del IFN.

Con la reciente disponibilidad de preparaciones muy potentes de IFN y - la observación de ciertos efectos de éste, como la actividad antitumoral en ratones que requieren administraciones repetidas por largo tiempo, se ha in- tentado establecer el rango de dosis claramente tóxico para las especies.

En ratones recién nacidos Gresser (135) reporta que la inyección diaria de 0.05 ml de IFN de ratón con título 1×10^6 U/ml produjo la muerte de los ratones entre los días 11 y 14. Los hígados de los ratones muertos presen- taban una extensa degeneración celular. Si las inoculaciones eran suspendi- das entre los días 6 y 8 la mayoría de los ratones sobrevivían. Sin embargo, estos ratones fallecían después, a partir del día 35, a causa de glomerulo- nefritis, fallas cardíacas y pulmones edematosos y hemorrágico. Estos efec- tos no se encontraron con las preparaciones control.

Así, parece ser que la respuesta tóxica, puede ocurrir enseguida de una

administración diaria de muy altas dosis de IFN homólogo. Es interesante a este respecto, que en 3 de 6 lactantes humanos tratados con IFN leucocitario para infecciones generalizadas por citomegalovirus, en que se aplicaron 1.8 a 3.5×10^5 U/Kg de peso cada día durante 7 a 14 días, se encontró un aumento de una enzima del hígado, la aspartato-aminotransferasa, como informan de sus experimentos Arvin y cols. (136).

De este modo el IFN parece afectar las funciones hepáticas más rápidamente en niños que en adultos, ya que sólo los niños mostraron este efecto. Salvo esto, los lactantes no presentaron otros efectos.

La toxicidad no puede ser extrapolada de una especie a otra dadas las características de cada una de ellas. La administración de IFN exógeno no impide la inducción de IFN endógeno ni interfiere con la producción de Acs. En el transcurso del tratamiento antiviral puede aparecer un efecto de inmunodepresión de Acs; pero esto puede deberse a una restricción de la masa antigénica debido a que el IFN indujo la inhibición de la multiplicación viral.

Los riesgos potenciales involucrados en la terapia del IFN no se derivan de la toxicidad de las moléculas activas sobre las células, sino que -- por ser una molécula mediadora fisiológicamente es capaz de alterar una variedad de funciones y propiedades celulares como las proliferativas, las sintéticas, las enzimáticas, las antigénicas; etc.

En verdad la farmacología de tales mediadores naturales puede esperarse que difiera cualitativamente de las sustancias no fisiológicas (fármacos) y que son más específicas, discriminativas y sutiles en sus efectos. Sin toxicidad directa para las células y tejidos, órganos y sistemas ocasionando posibles desajustes en el organismo como un todo. Ya tratamos en el capítulo anterior la capacidad del IFN de afectar las células del sistema inmune como ejemplo de lo antes dicho.

Estos datos marcan al IFN como una de las sustancias farmacológicamente más activas tomando en cuenta el importante factor de que sus efectos sobre

las células no afectadas parecen ser, completamente reversibles,

Conocidas ya las principales características del IFN, puede hablarse -- ahora de las propiedades terapéuticas e interpretación de los estudios clínicos en que se ha trabajado con él.

BUSQUEDA DEL INTERFERON " IN VIVO" EN AÑOS RECIENTES.

Los experimentos "in vivo" con el IFN comenzaron un poco después de que Isaacs y Lindenmann descubrieron al IFN. Muchos de los estudios iniciales no se basaron en un claro entendimiento de la relación entre la multiplicación viral y la enfermedad, y las condiciones bajo las cuales el IFN podía intervenir en este proceso; tampoco incluían la mayoría de los estudios, preparaciones control de IFN "falso" (placebo), ni proveían de información sobre -- la potencia del IFN empleado, ni datos sobre la toxicidad "in vivo" de las preparaciones. Así, cuando preparaciones muy crudas fueron administradas y se encontró marcada actividad profiláctica antiviral, se aplicaba sistemáticamente al sujeto pero sin controles adecuados.

DATOS RECIENTES DEL INTERFERON COMO ANTIVIRAL.

1. Administración tópica del interferon.

Infecciones localizadas por virus herpes y vaccinia virus; el primer experimento en el cual una preparación demostró conferir protección contra una infección viral en el hombre fue reportada en 1963, este involucraba la inhibición de la replicación de virus vaccinia en un grupo de voluntarios que -- fueron inoculados con IFN y luego con el virus . Había disponible una pequeña cantidad de IFN preparado en cultivos celulares de riñón de mono y su administración local en un bien diseñado experimento condujo a magníficos resultados para el Comité Científico del IFN que en 1962 se había formado con el fin de buscar toda la información útil sobre el IFN. Este mismo tipo de -- IFN, aplicado a pacientes con queratitis vaccinal que presentaban extensas y

progresivas lesiones epiteliales ulcerativas, lograba el aclaramiento de la opacidad de las córneas en un tiempo de 24 horas, y la mejora de las lesiones en cuestión de días. Este último descubrimiento en el hombre fue precedido por iguales resultados en ojos de conejo, como informó en sus experimentos Cantell (53).

La primera evidencia inequívoca de la eficacia terapéutica de las preparaciones del IFN humano en enfermedades naturales se obtuvo en 1976. En un experimento doble ciego con placebo, Newman y cols. (138) trabajaron con 40 pacientes con queratitis dendrítica herpética a los que se aplicaron 2 gotas de una preparación leucocítica de IFN (3 millones de U/ml) o 2 gotas de solución de albúmina cada día. Todas las córneas enfermas en el grupo de 22 pacientes tratados con IFN se libraron de los virus que actuaban desprendiendo las córneas y mejoraron significativamente más rápido que las del grupo control.

Stewart II (56) en su extenso trabajo refiere otros intentos llevados a cabo al principio de 1976, para emplear al IFN como un medicamento en infecciones localizadas. y también pruebas con diferentes inductores para producirlo.

El ojo fue frecuentemente elegido para este tipo de estudios, ya que ofrece oportunidades únicas por el rápido reconocimiento de la enfermedad y el aislamiento del agente infeccioso, posibilidad y facilidad para la aplicación de un agente terapéutico. También permitía pruebas clínicas con cantidades relativamente pequeñas de la sustancia antiviral.

En suma, el ojo es el sitio de un gran número de infecciones no bacterianas como el herpes y vaccinia virus, ambas causantes de ulceraciones progresivas profundas y diversas enfermedades peligrosas para la visión. Las infecciones por herpes virus son característicamente progresivas en su severidad, y hay además otros virus que pueden afectar el ojo humano.

De ahí que después de emplear otros antivirales con resultados parcialmente buenos, el IFN puede a este respecto ser un mejor agente antiviral, ya

que su aplicación local en el ojo ha sido ensayada repetidas veces en modelos animales en el hombre.

Sin embargo, la patogénesis de las infecciones oculares es muy compleja y poco entendida por la variedad de tejidos y células involucrados y los diferentes grupos de agentes infecciosos.

Hablaremos enseguida de los principales intentos realizados y sus resultados , recopilación hecha por Stewart II (56).

Una preparación de IFN demostró ser efectiva contra la queratitis vacuinal severa en córnea humana, pero se halló inefectiva contra queratitis herpética. El uso de varios modelos animales reveló que las especies pueden diferir en su respuesta a tratamientos similares para enfermedades semejantes.

Así, el IFN se encontró ineficaz en el tratamiento del ojo de conejo y -- presentó alta efectividad protectora en monos. Ahora se conocen algunas de -- las aparentes diferencias entre especies, por ejemplo; se ha establecido que el IFN producido por inducción con ARN es ineficaz en primates por sufrir rápida degradación debida a que en el suero humano existen una gran cantidad -- de nucleasas.

Otro factor muy importante en la variación de resultados es el tiempo -- y tipo de tratamiento. En una investigación sobre queratitis herpética humana que se llevó a cabo en Alemania empleando una dosis diaria total de 4×10^4 U/ml de IFN, que fue aplicada en varias dosis pequeñas, no tuvo efectos -- benéficos, pudiendo deberse dicho resultado a que la dosis total fuese insuficiente no en cuanto a cantidad sino a la seriación de las dosis repetidas -- inapropiadas. En contraste, otro estudio sobre queratitis ulcerativa herpética usando sólo una dosis local diaria conteniendo 10^7 U/ml , mostró una disminución de los síntomas dentro de las 24 horas posteriores a su aplicación , -- sin signos aparentes de toxicidad u otros signos externos .

Como Finter (137) predijo, estos últimos resultados confirman que una -- simple dosis diaria con un alto título puede ser efectiva no sólo en la prevención de infecciones primarias, sino en la supresión del establecimiento --

de las manifestaciones clínicas en el ojo. Una evaluación del efecto del IFN leucocitario humano en la frecuencia de la recurrencia de la enfermedad herpética del ojo, es importante en la práctica médica, ya que no hay aún un método efectivo para prevenir la recurrencia de dicha enfermedad.

Infortunadamente, las relativamente grandes cantidades del más potente IFN (10^6 a 10^7 U/ml) que son idealmente requeridas para el tratamiento profiláctico en los pacientes, no son factibles de utilizarse.

Así, hasta 1976 parecía cierto que el IFN leucocitario humano dado localmente a concentraciones adecuadas (3 a 10×10^6 U/ml) en aplicaciones diarias era efectivo contra la querato-conjuntivitis en el hombre. En 1977 Newmann y cols (55) presentaron un trabajo comparativo en que evaluaron el IFN leucocitario y fibroblástico en la prevención de queratitis herpética en monos.

Cuando emplearon 1.9×10^3 U/ml obtuvieron malos resultados, siendo entonces utilizadas dosis de 1.9×10^6 U/ml y obteniéndose buenos resultados. No encontraron ninguna diferencia notable entre los dos tipos de IFN empleados.

En 1980 Overall y cols. (139) informaron sobre la sensibilidad de los herpes virus tipos I y II a tres diferentes preparaciones de IFN humano observándose una sensibilidad ligeramente mayor al IFN por el tipo II. Estos resultados indican que ambos tipos son sensibles al IFN y por tanto éste tiene un importante potencial terapéutico en las infecciones por herpes virus.

En 1983, durante el Congreso sobre IFN llevado a cabo en Cuba, González y cols. del Centro de Salud Animal de La Habana Cuba, presentaron su evaluación experimental del IFN leucocitario bovino en terneros inoculados con herpes virus, utilizando el IFN leucocitario en una dosis única de 2.5×10^3 U por Kg de peso en terneros inoculados con una cepa de pseudodermatitis nodular los resultados mostraron la eficiencia del IFN frente a la sintomatología de la enfermedad, además de demostrar que el producto es inocuo.

INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR .INFLUENZA Y RHINOVIRUS.

Como es conocido por la mayoría de investigadores los mixovirus son altamente sensibles a la acción del IFN "in vitro" e "in vivo" cuando el IFN es administrado en aerosoles; los esfuerzos han sido orientados a liberar al IFN localmente en el sitio de multiplicación viral en el tracto respiratorio humano. Los investigadores rusos y japoneses han reportado efectos profilácticos medibles, contra las infecciones por virus de influenza en el hombre, tanto en situaciones naturales como experimentales, con la administración de bajas dosis de preparaciones de IFN dadas por aspersión intranasal.

Dichas preparaciones se pueden conseguir comercialmente en la URSS.

Los rinovirus se replican en la mucosa superficial respiratoria, y puede recuperarse IFN a títulos bajos por medio de lavados nasales durante las infecciones por rinovirus, Merigan (130) informó al Comité Científico del Interferón, de sus estudios empleando IFN en forma de aerosol como profiláctico contra la infección por rinovirus en dosis de 10^7 U por paciente. Encontró que en 16 voluntarios se inhibió la sintomatología, lo que no ocurrió con el grupo control-placebo. Mientras que cantidades medibles de IFN fueron halladas localmente hasta 17 horas después de su aplicación, se sugirió que sólo se requiere un tratamiento de 24 horas para mantener suprimida la infección.

En 1978 Greenberg (68) y cols. demostraron en sus experimentos la actividad antiviral del IFN humano leucocitario en el epitelio nasal, así como la variación de este efecto dependiendo de la concentración y tiempo de aplicación. Ese estudio comparaba la actividad del IFN intranasal, tanto en gotas nasales como en un algodón impregnado que se mantenía en la nariz por una hora. Los resultados indicaron que las células epiteliales nasales desarrollaban el estado antiviral "in vivo" con la aplicación del IFN humano, pero para la profilaxis era importante el método de aplicación habiendo dado mejores resultados el tratamiento con gotas.

Takenaka (141) del Instituto de Otorrinolaringología de Tokio, publicó

en 1980 un informe sobre el papel del IFN en las infecciones virales del tracto respiratorio superior. Como resultado de sus experimentos, considera que el IFN parece ser un factor muy importante de defensa local en este tipo de infecciones. En ese mismo año, Greenberg y Johnson realizaron estudios sobre la inducción del estado antiviral en el epitelio nasal comparando el IFN que se obtuvo como respuesta de las células y el IFN fibroblástico, encontrando que el estado antiviral se desarrolló más con el IFN fibroblástico. Esto podía demostrar que el estado antiviral se desarrollaba más con dosis de IFN más o menos altas.

Finalmente, en 1983 en el Congreso del IFN se presentó el trabajo de Díaz y Dorticós (142) sobre el uso profiláctico de un preparado intranasal de IFN en afecciones virales del tracto respiratorio superior; trabajaron con 3 grupos (grupo contraplacebo, grupo de dosis máxima y grupo de dosis mínima) encontrando que posterior al tratamiento la incidencia de infecciones fue menor en el grupo de dosis mínima, no encontrándose efectos secundarios en el grupo y apreciándose los mayores efectos en el de dosis máxima.

ADMINISTRACION LOCAL Y SISTEMATICA DEL INTERFERON EN ENCEFALITIS.

El IFN ha sido empleado tanto de manera local como sistemática en varios tipos de encefalitis, en donde la mortalidad alcanza hasta un 50%, los primeros ensayos se llevaron a cabo en encefalitis causada por herpes virus y en modelos animales. Ya en humanos se ha probado en encefalitis herpética del recién nacido, observándose buenos resultados cuando se emplearon altas dosis de IFN y manteniéndolo por largos períodos de tiempo, siendo el factor limitante la dificultad para obtener grandes dosis de IFN. Otra de las encefalitis en que se ha empleado el IFN es en los casos de Togavirus y Rabdovirus (Fenner 143) ya que estos virus son altamente sensibles al IFN tanto "in vivo" como "in vitro"; en los experimentos con togavirus, demostró ofrecer protección significativa si se aplicaba un día después de la infección. Sin embargo, la patogénesis y epidemiología de estas infecciones puede hacer im-

practicable el tratamiento con IFN.

En el caso de rabdovirus se han realizado pocos experimentos en humanos por lo que aún no hay resultados claros al respecto a su acción en estos casos.

LA APLICACION SISTEMATICA DEL IFN E INDUCTORES DEL INTERFERON.

1. Infecciones por Toga, Rabdo y Picornavirus.

La mayoría de los primeros estudios en el uso profiláctico o terapéutico del IFN exógeno demostró que la actividad del IFN es más efectiva cuando se le emplea de manera sistémica; los virus más usados han sido los Togavirus, Rabdovirus y Picornavirus que causan respectivamente encefalitis, encefalomiocarditis y meningitis asépticas: Los resultados indican una acción protectora del IFN con el virus de la encefalomiocarditis tanto con el IFN como con algunos de sus inductores como Poly (rI).Poly(rC) y Estatolón, administrados 2 veces al día en dosis de $4 \text{ a } 8 \times 10^4 \text{ U/ml}$ demostraron dar protección efectiva hasta en un 40%. El IFN además de lo antes mencionado, ha sido empleado en experimentos con enterovirus (Armstrong 120) del grupo Cox sackie, que son causantes de una amplia variedad de infecciones; hasta ahora, sin embargo, los estudios no están del todo terminados en su aplicación humana.

La poca disponibilidad de preparados de IFN humano es una limitación -- para emprender estudios sobre la aplicación sistémica del IFN como profiláctico. Como se describió al principio de este capítulo, los primeros estudios con el IFN como antiviral en el hombre fueron llevados a cabo por administración tópica, como son las inyecciones sucutáneas, gotas nasales y oftálmicas o aplicaciones con aerosoles, en la prevención de infecciones en vías respiratorias altas (Greenberg 68); sin embargo, existen evidencias de el IFN -- exógeno humano leucocitario administrado sistémicamente ofrece protección -- efectiva contra infecciones virales.

Stewart II (56) ha recopilado datos muy importantes a este respecto:

En Estocolmo, en años recientes se llevó a cabo un tratamiento a 50 pacientes de cáncer con IFN humano leucocitario, aplicándolo sistémicamente en dosis de $2 \text{ a } 3 \times 10^6$ U/ml dos veces por semana durante por lo menos 18 meses, dado que estos pacientes son muy propensos a otras infecciones virales; fue un dato importante el comprobar que durante ese tiempo no tuvieron ninguna infección viral. De igual manera pueden citarse otros ejemplos de tratamientos parecidos realizados en otros países, donde los resultados han sido alentadores.

De sus informes Stewart II resume que puede sugerirse con bastante seguridad que el IFN humano leucocitario aplicado sistémicamente, siguiendo un régimen similar al empleado en Suecia, ofrece una profilaxis efectiva contra infecciones virales locales y sistémicas en pacientes con cáncer.

En los inicios del capítulo nos hemos referido a diversas aplicaciones que se han probado con el IFN, enfocadas siempre en principio a animales; ahora nos ocuparemos específicamente sobre el empleo del IFN en la terapia antiviral en el hombre.

El considerable número de evidencias obtenidas por diversos estudios — dieron pie para el intento de emplear al IFN en programas de terapia en enfermedades sistémicas.

HEPATITIS CRÓNICA.

La hepatitis B es una enfermedad de suma importancia en los países occidentales, por lo que son varios los investigadores que han realizado experimentos con el IFN sobre todo en pacientes con hepatitis crónica; este problema fue también seleccionado por la facilidad para cuantificar los marcadores virales en las muestras de sangre.

El primer estudio realizado con 4 pacientes en Finlandia por Cantell (53), fue llevado a cabo en los casos de hepatitis crónica y enfermedades activas del hígado, persistentes por seis meses. Se aplicaron dosis de 6×10^3 a 2×10^5 U/Kg de peso, y se cuantificaron los marcadores virales en el

suero; el Ag HB fue medido por radioinmunoensayo, y estos pacientes presentaban altos niveles de la partícula Dane asociada a una ADN- polimerasa. Como resultado se encontró que después de cada inyección de IFN hubo un rápido y notable descenso en el nivel de la ADN polimerasa, según la dosis -- de IFN aplicada; también fueron afectadas las partículas Dane, y el efecto en los niveles de Ag HB fue más variable y menos pronunciado.

La administración del IFN fue bien tolerada por los pacientes durante el tratamiento que fue hasta un máximo de 15 semanas, sin cambio en la actividad del hígado. Todos estos efectos se observaron en 5 diferentes experimentos, con resultados iguales. El IFN parece suprimir la presencia de -- las partículas Dane asociadas a la hepatitis B, y sus efectos persistieron por un tiempo considerable después del tratamiento.

La hepatitis B parece ser altamente susceptible a la actividad antiviral de dos distintas preparaciones de IFN, así como un inductor, con lo que nos ofrece una preciosa oportunidad no sólo de explorar con el sistema IFN la terapia antiviral en esta enfermedad, sino como un valioso patrón de comparación en distintos enfoques de dicha terapia.

El inductor empleado en estos experimentos es un complejo de Poly (rI). Poly (rC) con L-lisina, ácido poliribosínico -policitidílico (PICL), que fue empleado al principio por Lin (63) y cols. y que parece tener una gran ventaja por ser resistente a las nucleasas del suero, y quizá por esta razón un -- mejor inductor en primates. En este estudio se emplearon chimpancés infectados crónicamente con hepatitis B utilizando como inductor al PICL en proporción de 3 mg por Kg de peso en dos diferentes experiencias, la primera aplicando el PICL una vez al día durante dos períodos de 6 días, y la segunda -- cada tercer día por siete semanas. Los resultados durante el tratamiento indicaron un decremento de las partículas Dane asociadas a la hepatitis por la ADN polimerasa y del Ag HB. La respuesta de inmunidad humoral no fue afectada. El nivel del IFN en el suero varió considerablemente durante los tratamientos.

Resultaron interesantes las observaciones hechas con el PICL, ya que - todos los animales tratados mostraron dependencia a la droga y cambios hematológicos y bioquímicos, así como hepatotoxicidad; sin embargo, los efectos tóxicos del PICL parecen ser reversibles, lo que lo hace un inductor superior en términos de índice terapéutico. Con esto no puede decirse que ya se ha curado la hepatitis B, sino que pudiendo administrarse por un buen período de tiempo parece ser capaz de prolongar el efecto curativo.

Las implicaciones de estos hallazgos tienen gran importancia para la salud, ya que demuestran que dos diferentes preparados de IFN humano exógeno, así como un inductor endógeno (PICL), son efectivos en la supresión del virus responsable de la etiología de la hepatitis, que es una enfermedad seria crónica, contra la que no hay una terapia por completo efectiva. Así, - el IFN puede ser la oportunidad para limitar o suprimir la infectividad de algunos virus activos, pudiendo llegar a su erradicación.

RUBEOLA CONGENITA.

La rubeola congénita presenta importancia debido a las propiedades teratogénicas del virus, ya que los defectos en el recién nacido : cataratas, malformaciones cardíacas y retraso mental, están asociados a una infección por virus de rubeola durante el embarazo; el síndrome de la rubeola congénita es fatal en el 20% de los casos. La infección es muy persistente, y dado que sólo hay un serotipo de virus parece una buena opción la vacunación, pero los virus atenuados parecen ser por sí mismos teratogénicos, de ahí la necesidad de un buen tratamiento contra las embriopatías causadas por rubeola.

Banatvala y cols. (145) han hallado que el virus de rubeola , si bien es relativamente pobre inductor de IFN, en cultivos fetales puede inducir IFN "in vitro" tanto en células de mono como humanas, y es absolutamente sensible al IFN en cultivos celulares humanos. Una cantidad tan pequeña -- como 4 U de IFN humano es capaz de reducir el rendimiento de virus hasta --

en un 90%. Sin embargo, resultados posteriores mostraron que cuando las células son tomadas de lactantes infectadas en el útero y cultivadas "in vitro" se establecía en el cultivo, una infección crónica y ni aún cantidades de 100 U de IFN exógeno bastaban para suprimir la producción de virus.

A la fecha los resultados de diversos trabajos indican que el papel del IFN en esta infección congénita es muy pobre y que la profilaxis con él es impracticable por el momento, teniendo quizá en el futuro un mejor papel en este área.

HERPES ZOSTER.

Los herpes virus son estructuralmente complejos. Son deoxiribovirus que tienen una especial afinidad por el sistema nervioso y la piel, y tienden a producir infecciones latentes y/o recurrentes; los que afectan al hombre son los herpes virus tipos I y II, varicela-zoster, citomegalovirus y virus de Epstein Barr, estando los herpes I y II involucrados en carcinomas cervicofaríngeos y el Epstein Barr en la mononucleosis, linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo.

Todos los herpes virus estimulan la producción de IFN y son sensibles a su efecto antiviral, pero se requiere elevadas dosis de IFN para inhibir la producción del virus. Armstrong y cols. (146) trabajaron con IFN en herpes zoster, que según evidencias previas parecía tener un papel interesante en esta enfermedad.

Los estudios previos en 17 pacientes con herpes zoster diseminado, se llevaron a cabo dándoles dosis de 10^7 U/ml por día por vía intramuscular o intravenosa, incrementándose las dosis hasta 8×10^7 U/ml por día durante 3 días consecutivos; 9 de los pacientes presentaban hasta 100 lesiones en la piel. El resultado fue que, pese a que los pacientes se hallaban inmunodeprimidos, no hubo extensión de las lesiones a las vísceras u órganos, cosa muy común en pacientes debilitados. El nivel medio de IFN que puede ser mantenido en circulación aplicado intramuscular, correspondió a 17 veces el

mínimo necesario para mostrar efecto antiviral en cultivos celulares infectados con virus de varicela zoster. A esta concentración el IFN se predice como un marcado inhibidor de otros tipos de virus más sensibles.

No hubo reacción tóxica en los huéspedes, lo cual es una buena señal. En estudios subsecuentes, los autores coinciden en afirmar su impresión de que las lesiones mejoraron mucho más rápidamente en los pacientes tratados que en los control placebo, como expone en su informe Emodi (147), del Departamento de Medicina Nuclear en Zurich Suiza.

En 1980, Weimar y cols. (148) trabajaron en monos rhesus empleando el IFN como profiláctico contra infecciones posteriores por vaccinia virus en la piel, obteniendo como resultado que 9 de los monos tratados durante 7 días con 5×10^5 U/Kg al día resultaron completamente protegidos, tanto intravenosa como intramuscular; la aplicación de dosis menores estuvo correlacionada con la cantidad y severidad de las lesiones en los demás monos. Las dosis más eficaces fueron de 5×10^5 U/Kg de IFN fibroblástico o 1.25×10^5 U/Kg de IFN leucocitario.

Estudios más recientes realizados por Merigan y cols. (149) trabajando con IFN leucocitario como tratamiento a la varicela zoster en pacientes con cáncer, indicaron que las lesiones disminuyeron y las lesiones distales, si bien no tuvieron progreso, tampoco mostraron regresión de dermatomas primarios. No hubo evidencias de empeoramiento en lesiones ni tampoco grandes mejoras.

Respecto a herpes virus oncoogénicos y neurotrópicos, hay trabajos bastante recientes llevados a la práctica por Daniel y cols. (91), realizados en primates; utilizando IFN humano fibroblástico, leucocitario y linfoblástico, demostraron tener una marcada actividad frente a algunos herpes virus, cuando se trabajó con dosis de 500 U/ml o mayores, pero sólo actividad mínima contra 2 virus neurotrópicos; los tres IFNs resultaron igualmente efectivos, siendo estos efectos permanentes hasta por varios meses después de concluido el tratamiento.

El informe más reciente sobre el uso del IFN en la terapia de herpes virus la llevaron a cabo González y cols. (140), quienes trabajaron en forma experimental con IFN leucocitario bovino en terneros inoculados con herpes virus, dando como resultado una eficacia notable del IFN frente a la sintomatología de dicha infección y siendo además el IFN inocuo para los animales.

INFECCIONES CONGENITAS POR CITOMEGALOVIRUS.

El citomegalovirus (CMV) es ubicuo del grupo Herpes, son un grupo que generalmente ataca en la infancia y causa infecciones crónicas en células de glándulas salivales. Sin embargo, también pueden adquirirse por vía placentaria ocasionando "inclusión citomegálica" que en el recién nacido es frecuentemente mortal. La infección por CMV es la causa más frecuente de microcefalia y de daños auditivos y visuales, el virus también puede transmitirse por vía transfusional. Estudios "in vitro" han demostrado que la multiplicación del CMV se puede inhibir con el inductor del IFN Poly (rI).- Poly (rC), como demostró en sus estudios Arvin y cols. (136). Los primeros resultados fueron favorables, sin embargo aparecían algunos efectos adversos como un descenso temporal de peso y una elevación de las enzimas hepáticas (transitoria) y fiebre.

El efecto del IFN en infecciones debidas a complicaciones en trasplantes de médula ósea ha sido favorable, como informa en sus trabajos O'Reilly (130).

En resumen puede considerarse que el IFN ofrece buenas perspectivas en la terapia anti-CMV en pacientes inmunodeprimidos.

INTERFERON Y LOS PARASITOS CELULARES

Hay numerosos informes que establecen que el IFN exógeno y los inductores del IFN son capaces de afectar el crecimiento de microorganismos parásitos; daremos sólo unos cuantos ejemplos ya que no es parte esencial de --

este trabajo y nuestro principal enfoque es hacia los virus.

Los efectos del IFN en la multiplicación de parásitos protozoos se han estudiado en toxoplasma, esporozoos, trypanosomas y plasmodios, y sus efectos parecen limitados a los protozoarios que viven por lo menos parte de su ciclo de vida dentro de la célula.

IFN COMO AGENTE ANTITUMORAL.

En los siguientes párrafos resumiremos la mayoría de datos relacionados con los efectos del IFN en la oncogénesis y el establecimiento de tumores animales, acercándonos después a sus efectos en los pacientes humanos con cáncer.

1. Tumores inducidos por oncornavirus.

Todos los virus oncogénicos del tipo ARN Oncornavirus pertenecen a los Leucovirus. Todos los Oncornavirus estudiados son capaces de inducir IFN y los preparados de IFN son inhibidores efectivos de su crecimiento "in vitro" según los trabajos de Sarma y cols. (151, 152) de donde puede asegurarse que el IFN puede inhibir el desarrollo de muchas enfermedades malignas causadas por Oncornavirus. Algunos estudios muy importantes se relacionan con :

a. Tumores inducidos en el laboratorio por cadenas de virus.— Los experimentos en animales demostraron que el IFN aplicado un poco antes de la infección experimental con el virus, hacía bajar el crecimiento y rendimiento de virus, e incluso suprimir los virus causantes de leucemia y sarcomas.

b. Leucemia en ratones.— La leucemia es un mal espontáneo en ratones, ya que según varios estudios el 8% de los ratones entre los 6 y 8 meses de edad la desarrollan. En sus experimentos, Gresser (153) trabajó con altas dosis de IFN aplicadas a ratones diariamente, iniciando la aplicación en la fase pre leucémica y obteniendo como resultado una buena protección. Los ratones han sido extensamente empleados en la búsqueda de quimioterapia. En suma se encontró que existe una relación entre la dosis y vía de administración, con

el efecto antitumoral. La idea de que los efectos inmunosupresores pueden ser disociados de los efectos antitumorales del IFN no es factible, ya -- que como antes se mencionó el IFN interviene también en algunos procesos de inmunidad. Los estudios realizados en ratones, han dado resultados muy alentadores; no obstante, cabe decir que las dosis de IFN requeridas para cada especie varían y en el caso de mamíferos son demasiado altas e impracticables: una dosis de 5×10^5 U/20 g de peso en ratones equivale a 2.5×10^7 U/kg de peso para el hombre.

TUMORES TRANSPLANTABLES DE VARIAS ETIOLOGIAS.

Las enfermedades neoplásicas se han establecido en varios casos como -- de origen viral (Stewart II 56). Un gran número de líneas celulares tumorales son mantenidas vivas o los tumores sólidos han sido transplantados -- para usarse en pruebas antitumorales y otras modalidades de terapia del -- cáncer.

Muchos tumores transplantables han sido estudiados para observar su -- susceptibilidad a ser inhibidos por el IFN o sus inductores. Sus propiedades malignas no dependen de los viriones (Oncornavirus) puesto que han sido encontrados con frecuencia asociados a células normales. Los tumores -- transplantables son generalmente derivados de tumores primarios de etiología viral o bien de neoplasias inducidas por agentes cancerígenos. Independientemente de su origen, son altamente malignos ya que en muchos casos un inóculo de una a 10 células es suficiente para originar un tumor. Estos tumores transplantables han sido estudiados por Gresser y cols. (154), quienes en sus experimentos en el laboratorio hallaron inhibición en el crecimiento de los mismos empleando preparaciones de IFN homólogo.

En el transcurso de estos estudios se observó:

- a. La repetida administración de preparados de IFN y un tratamiento prolongado parecen necesarios para resultados óptimos.
- b. Si el IFN se da solo antes del trasplante del tumor (24 horas) éste no

tiene efecto.

- c. Los tumores ascíticos fueron más rápidamente suprimidos en cultivos ce lulares en suspensión que en tumores sólidos.
- d. Hay una marcada relación entre la dosis del IFN y la extensión de la -- inhibición tumoral.
- e. No hubo pruebas evidentes de muerte en células tumorales; sin embargo, muchas células debieron eliminarse, mientras que las células tumorales vi vas se recuperaron tanto en el tratamiento como en los controles.
- f. Las células tumorales tratadas con IFN que sobrevivieron mostraron un - aumento en la resistencia a una reinoculación de células tumorales.

Los efectos de los inductores del IFN han sido extensamente estudiados y han mostrado ser capaces de inhibir el crecimiento tumoral, inclu-- yeno tumores sólidos como el de Walker , Erich y otros hepatomas, como explican Bart y cols. (156) que trabajaron con inductores sintéticos de poliribonucleótidos de doble cadena. En vivo demostraron que, por ejemplo, - la inyección de Poly (rI).Poly (rC) ejercía marcada inhibición de un melanoma maligno en ratones y prolongaba la vida de los animales con tumores - localizados. El mecanismo de estos efectos no parece ser de características inmunológicas.

Los resultados de la mayoría coinciden con el hecho de que el IFN tiene un papel en este mecanismo de inhibición.

TUMORES INDUCIDOS POR DEOXIRIBOVIRUS.

Hay una gran variedad de deoxiribovirus que tienen potencial oncogénico, y han sido base de estudios con el IFN. Los principales virus de este tipo - que han sido estudiados son :adenovirus , por Haase y cols (157), quienes observaron como efecto del IFN, cierta regresión de los tumores, si bien parece ser que los inductores como el Poly (rI).Poly (rC) ejercen una función de inmuoestimulación que puede relacionarse a la regresión.

Del mismo modo, otros estudios realizados con herpes virus, papiloma-

virus , poliomavirus y virus SV40 han dado resultados alentadores en varios casos, pero aún no son suficientes los estudios realizados y hay mucho campo por investigar.

TUMORES INDUCIDOS POR CANCERIGENOS QUIMICOS.

Muy pocos estudios han sido emprendidos para conocer los efectos del IFN o sus inductores en los eventos relacionados con la transformación celular "in vitro" o la carcinogénesis "in vivo" resultantes de la exposición celular a cancerígenos químicos.

Salerno y cols (158) han estudiado el efecto del IFN de ratón en tumores inducidos en ratones por el beta-metil colantreno. El tratamiento completo con IFN suprimió el desarrollo del tumor en los animales tratados.

En estos experimentos, el mecanismo por el cual el IFN anula químicamente la carcinogénesis parece ser que es una reacción a nivel de multiplicación celular. Este tema es también una buena fuente de estudios para tener mayores y más claras respuestas al respecto.

EFFECTOS ANTITUMORALES EN EL HOMBRE.

Los intentos de tratar pacientes humanos de cáncer por medio de preparaciones de IFN humano fueron ciertamente una consecuencia de las primeras evidencias de que se presentaba una inhibición de los virus oncogénicos en estudios con animales.

Los leucocitos y células amnióticas humanas son buenas fuentes de IFN humano y los sistemas de cultivos celulares fueron los que permitieron que estos estudios pudieran llevarse a cabo al proporcionar cantidades relativamente grandes de IFN necesario.

En el primer grupo de pacientes tratados con IFN entre 1963 y 1966 -- (Stewart II 56) , once de ellos presentaban leucemia mielocítica y 3 eran recién nacidos con infecciones congénitas por citomegalovirus. De estos estudios no se obtuvieron resultados medibles, pero demostró que el IFN --

crudo era bien tolerado por los pacientes de cualquier edad aún en algunos muy debilitados.

Sin embargo, esto fue aparentemente lo que originó un incremento en los experimentos encaminados a los ensayos con el IFN en el hombre; lo cual requería de preparaciones con títulos mucho mayores y un alto grado de purificación, que las empleadas antes no poseían. Si calculamos las cantidades de IFN que fueron empleadas en estos pacientes con el IFN disponible en ese entonces y en el largo período que se les aplicó (alrededor de 400 días), podemos decir que ellos probablemente recibieron menos de 10 millones de unidades activas de IFN.

La producción de IFN humano para usos clínicos y particularmente para los ensayos antitumorales requiere un esfuerzo formidable y costoso. No obstante, comenzando en 1963 el Dr. Kari Cantell (59) del Laboratorio Central de Salud Pública en Helsinki dirigió sus esfuerzos a la producción de IFN, utilizando las más factibles y baratas células diploides humanas en grandes cantidades, los leucocitos. Se empeñó en el desarrollo e improvisación de métodos óptimos para el cultivo de estas células, producción y capacidad de división simple y métodos efectivos de purificación y concentración del IFN, para obtener preparaciones con alto título y sin problemas de efectos "in vivo".

También llevó a cabo estudios farmacocinéticos en animales y en el hombre con dichos preparados. Cantell y sus colaboradores presentaron un método simple para la preparación del IFN (Cantell 59, 159). Este investigador ha sido capaz no sólo de optimizar el rendimiento porcentual del IFN sino de incrementar la producción de su laboratorio hasta un título de 4.4×10^6 U de IFN crudo, que titulándolo da un récord de 40 mil unidades por ml.

En años recientes este esfuerzo sólo ha sido imitado por el "Finnish Red Cross Blood Transfusion Service", y su propia producción ha alcanzado la calidad y extendido la cantidad del producido en el laboratorio del Dr. --

Cantell. Esta es la única fuente de material que ha hecho posible conocer más de la farmacocinética y los estudios antivirales, antitumorales llevados a cabo en el hombre (virus respiratorios, herpes zoster, hepatitis B - crónica, queratitis herpética, infecciones congénitas con CMV y otros).

En estos estudios han sido demostrados positivamente los efectos antivirales. Las preparaciones del Dr. Cantell han sido usadas en los tratamientos exploratorios de enfermedades neoplásicas que incluyen ensayos y experimentos en pacientes con aloinjertos renales.

Tres tipos de preparaciones de IFN leucocitario producido en Finlandia son al presente factibles de emplear clínicamente; estas varían en su título y grado de pureza relativa:

1. C-IF (interferón concentrado crudo), estas preparaciones contienen de 0.5 a 2×10^6 U/ml y 10^4 a 5×10^6 U/mg de proteína.
2. P-IF. (interferón parcialmente puro). Se ha vuelto viable su uso desde 1973. Sus preparaciones contienen de 5 a 20 millones de U por ml y de 10^5 a 5×10^5 U/mg de proteína, pero la recuperación de la actividad del IFN original es sólo del 50%.
3. P-IF-B. Es el IFN más purificado que se encuentra disponible desde 1974. Contiene marcadamente menos contaminación de albúmina que el P-IF. Su título es de 10 a 20 millones de U/ml con 5×10^5 U/mg de proteínas.

Todas estas preparaciones de IFN son muy estables y no requieren adición de agentes estabilizadores. Una preparación de Cantell de IFN humano leucocitario es en el presente usada como estándar internacional para IFN humano.

Algunos intentos sistemáticos para dilucidar los efectos antitumorales a través del IFN humano han sido realizados con preparaciones proporcionadas por el Dr. Cantell y el Dr. Strander. Primero fue la fase I, llevada a cabo con 11 pacientes con cáncer avanzado, con el fin de medir la seguridad de terapia con altas dosis de IFN y el estudio de los posibles efectos en tales pacientes. Todos estos pacientes habían recibido otros trata-

mientos como quimioterapia y radioterapia y no habían obtenido respuesta.

Después de la administración del IFN, fue reportado un moderado aumento en la temperatura y algunas reacciones locales transitorias como únicos efectos notables. La cuenta de leucocitos permaneció normal o si estaba disminuída por algún otro tratamiento se restauraba a la normalidad durante la administración de IFN. No se detectó ningún Ac contra el IFN cuando se midió la capacidad del suero de los pacientes de neutralizar menos de 4 U de actividad de IFN. Sin embargo, los pacientes produjeron Acs contra otros componentes antigénicos de las preparaciones del IFN, como el fluido alantoideo de pollo y el virus Sendai usado para estimular la producción de IFN.

Los títulos de fijación de complemento contra varios virus no cambian durante el tratamiento y se incrementaron después del tratamiento.

El tratamiento con IFN no tuvo efectos medibles en los tumores mismos. Las dosis administradas fueron importantes (en el tiempo que sólo se disponía de C-IF) con el máximo de dosis tolerable en términos de su pirogenicidad. Esta dosis de 3×10^6 U corresponde a la dosis mínima efectiva en monos.

Stewart II (56) ha descrito experimentos realizados por Armstrong y cols. en 1974 con 6 niños leucémicos, a los cuales se aplicó IFN leucocitario, 2.5×10^6 U/día por 20-25 Kg de peso. Si bien no se observaron efectos marcados en las malignidades, hubo una impresión favorable que se derivó del promedio total de sobrevivencia. En suma, todos estos pacientes parecieron estar efectivamente protegidos contra infecciones virales en ese estado de enfermedad en el que son sumamente susceptibles a infecciones. Esto por sí mismo fue una recomendación para el uso del IFN en los tratamientos clínicos del cáncer. Frei y cols. (160) seleccionaron al IFN para sus ensayos antitumorales en el sarcoma oncogénico debido a su pobre pronóstico y su pronto final por la metástasis en los pulmones y el alto índice de mortalidad. Aproximadamente el 80% de los pacientes sufren metástasis

en los meses posteriores al diagnóstico de la lesión primaria. Así, estos investigadores decidieron aventurarse a este estudio, siguiendo como criterio que el tumor primario alojado en los huesos largos y del tórax no presentara metástasis. El IFN administrado se inició enseguida a la detección del tumor primario y fue continuado diariamente durante la hospitalización, generalmente de un mes con dosis de 10^6 U/ml en inyecciones.

El régimen continuó durante 18 meses y entonces se detuvo. En los casos, en que apareció la metástasis pulmonar durante el tratamiento, éste fue suspendido. El IFN empleado fue en principio el C-IF, y en caso de respuesta febril del paciente, de ser posible se cambió a P-IF o P-IF-B. Como se mencionó antes el régimen estaba determinado por las cantidades factibles de IFN.

Se puede decir que los resultados fueron desde éxito moderado a mínimo si no es que nulo.

En 1975 Stewart trabajó con 14 pacientes que habían sido tratados -- postoperatorios por 6 meses. Strander comenta al respecto "trece de los catorce pacientes tratados con IFN por más de seis meses durante los cuales no desarrollaron metástasis, se comparó con 15 de 33 pacientes control. La diferencia es significativa y sugiere que las observaciones preliminares fueron insuficientes y se requiere expandir más los estudios".

La mayoría de los 14 pacientes fueron observados por largos períodos de tiempo y 3 de ellos completaron el 18o. mes de tratamiento, sobreviviendo a la enfermedad por períodos de hasta 28 meses.

Una evaluación estadística de los resultados obtenidos nos lleva a los datos concernientes a 12 pacientes que iniciaron tratamiento en agosto de 1975,; a cargo de Gresser y cols (153,154), los pacientes presentaban sarcoma oncogénico de los huesos largos. Comparando las dos series de pacientes (12 pacientes tratados con IFN junto a 33 pacientes no tratados), las pruebas realizadas a lo largo de meses mostraron que se alargó el tiempo de -- supervivencia hasta más de dos años, en los pacientes tratados.

Estas pruebas clínicas parecen mostrar dos datos importantes: más largo tiempo antes de las metástasis y más larga supervivencia comparativamente con los pacientes control. En los casos en donde hubo metástasis, ésta se presentó más tiempo después de lo común.

Una especulación sobre el tratamiento con IFN es que puede necesitar ser continuado por largos períodos de tiempo, lo cual es posible mientras sea bien tolerado. Sin embargo, la pequeña cantidad de datos en contra -- nos impide una firme conclusión.

La importancia científica de estos ensayos reside en que los experimentos deben ser llevados a cabo con extremo cuidado. Una interpretación final podrá hacerse hasta después de que más pacientes hayan sido tratados y haya transcurrido el tiempo suficiente para tener conclusiones firmes basadas en el análisis estadístico.

Los problemas de diseño y desarrollo de estas investigaciones no son únicos en la investigación clínica; en el pasado, impresiones positivas de la eficiencia de varias drogas muchas veces resultó falsa debido a factores que no se apreciaron en un principio . De ahí que parece prematuro el plan tear resultados como una interpretación inequívoca. En algunos casos el IFN solo puede debilitar los efectos del crecimiento celular , pero su fal ta de toxicidad lo hace un buen agente terapéutico, atractivo para la tera pia del cáncer en combinación con otras modalidades del tratamiento. Como se ha señalado, las dosis empleadas son probablemente bajas, y en el presen te es más factible conseguir preparaciones más potentes y puras del IFN.

Se han iniciado estudios exploratorios en otras enfermedades neoplásicas, ya que las observaciones efectuadas en algunos casos de cáncer huma no sugieren resultados medibles.

Stewart II (56), en comunicación de Strander, recibió informes sobre los experimentos realizados administrando IFN en la enfermedad de Hodgkin con predominancia linfocítica, en los que pronto se observó marcado descen so en los síntomas que presentaban los pacientes, decremento en los nódulos linfáticos e infiltraciones pulmonares, y valores de laboratorio normales.

También se reportaron respuestas incrementadas de los linfocitos frente a agentes mitogénicos. Finalmente, Stewart II (56) habla de un caso notable de descenso de la proteína de Bence Jones en un tratamiento de mieloma - con IFN, en el cual el nivel se sostuvo bajo por varios meses después del tratamiento.

El costo del tratamiento con IFN en los ensayos antitumorales es aún bastante considerable, si bien no prohibitivo. Gracias a su baja toxicidad el IFN permite el tratamiento de pacientes en fase ambulatoria sin requerir en ningún momento hospitalización (la cual es necesaria para el régimen actual de quimioterapia).

Estas considerables ventajas sobre otras terapias experimentales -- contra el cáncer hacen al IFN de un costo cercano a otros tratamientos -- contra el cáncer (incluyendo hospitalización y tratamiento soporte), por ejemplo el tratamiento con altas dosis de metotrexato , comúnmente empleado en la quimioterapia de sarcoma osteogénico en EUA.

También , puesto que la administración de IFN ha demostrado experimentalmente en modelos animales no interferir con la efectividad de otra quimioterapia, y que posiblemente potencia dicho tratamiento, parece ser que la combinación de un recurso quimioterápico tradicional y del IFN presenta posibilidades particularmente atractivas en la oncoterapia .

ULTIMOS HALLAZGOS ACERCA DE LA APLICACION TERAPEUTICA DEL IFN EN HUMANOS.

1. Ensayo del IFN humano en suero como una posible prueba para infecciones virales en el hombre.

Matthews y cols. (161), trabajando con voluntarios infectados con virus respiratorios en estricto aislamiento, descubrieron una fase del suero que daba resultados positivos en una prueba para buscar IFN. Los resultados fueron positivos, ya que el IFN fue detectado en el suero de los voluntarios esta prueba puede ser empleada como un suplemento a las pruebas convencionales para infecciones virales y con algunas modificaciones puede proveer de --

un útil auxiliar para el diagnóstico.

2. Diferente eficacia del IFN tipo I y II como agentes antivirales y anti-proliferativos.

Rubin y cols. (86) realizaron en 1980 estudios con los IFNs tipos I y II. El tratamiento con IFN tipo II indujo la síntesis de 4 proteínas, que fueron similares en tamaño a 4 de las 5 proteínas inducidas por el tipo I.

Comparando experimentalmente ambos interferones respecto a su actividad antiviral contra diferentes virus y en sistemas celulares " in vitro ", encontraron que los virus tienen diferente sensibilidad y sus eficacias son distintas. El tipo II inhibe la incorporación de la (³H) timidina mucho más que el tipo I. Parece ser que el tipo II puede ser mejor agente antitumoral.

3. El IFN inhibe la transformación celular por virus del sarcoma murino, antes de la integración del provirus,

Avery y cols (132) realizaron estudios de neoplasias debidas al sarcoma murino, encontrando que el IFN puede prevenir la transformación celular, actuando antes de la integración del virus y previniendo la síntesis del ADN del provirus.

4. Usos del IFN leucocitario por vía intraperitoneal en humanos. Aspectos farmacocinéticos.

Ramírez y cols. (162) expusieron, durante el Congreso del IFN llevado a cabo en 1983 en Cuba, su trabajo sobre esta nueva vía de administración del IFN, no explorada hasta el momento en el tratamiento de pacientes con hepatitis B. Sus estudios se hicieron sobre los aspectos farmacocinéticos del IFN leucocitario humano durante el tratamiento con él en 25 pacientes portadores asintomáticos del Ag de superficie del virus de hepatitis B, empleando dosis simple intraperitoneal inicial más peritoneoclisis. Se administraron dosis de 4×10^6 U.I. y 8×10^6 U.I. /24 horas. Se determinó la actividad antiviral del alfa IFN así como las concentraciones horarias dentro

de las primeras 8 horas a partir de iniciada la administración del IFN, observándose el incremento de IFN en suero en relación a la dosis empleada.

La actividad máxima del alfa IFN en suero en todos los casos se alcanzó al final de cada esquema de tratamiento, y el 50 % de este valor a las 8 horas después de culminado el mismo. No se observaron complicaciones en ningún paciente, ni efectos indeseables en cifras de plaquetas y transaminasas.

5. Tratamiento de esclerosis múltiple con alfa IFN.

Nestor Chamoles y cols. (163) trabajaron en la Clínica del Sol en Argentina acerca de los efectos del IFN en la esclerosis múltiple (EM). La EM es una enfermedad desmielizante cuya fisiopatogenia se relaciona con una alteración del sistema inmune y /o una infección viral. Los pacientes con EM tienen disminuída la función supresora de los linfocitos T y defectos en su capacidad de producción de IFN frente a inductores. Se realizaron ensayos clínicos en 7 pacientes de EM con alfa-IFN humano en dosis de 1×10^6 U.I/24 horas durante 18 meses y luego 1×10^6 U.I/72 horas durante 12 meses, toda la administración por vía intramuscular.

Las tres cuartas partes de los pacientes no tuvieron recaídas, si bien no hubo grandes mejoras en su condición psicofísica. Una cuarta parte de los pacientes que previo al tratamiento tenían recaídas cada 6 meses, solo presentaron una leve recaída en dos y cuatro años. La mitad de los pacientes desarrollaron durante el tratamiento una leve recaída y se suspendió el ensayo, ningún paciente tuvo efectos secundarios al tratamiento.

6. Tratamiento de la papilomatosis laríngea juvenil con IFN leucocitario humano.

Ponce y cols. (164) realizaron estudios preliminares acerca del uso del IFN humano leucocitario en el tratamiento de papilomatosis; la papilomatosis laríngea es una enfermedad de origen viral para la cual no ha existido un tratamiento médico específico. En diferentes estudios se ha utilizado el IFN y se han observado resultados favorables con él. Las dudas son acerca de los -

esquemas y dosis que sean efectivamente adecuadas.

En Cuba se ha proyectado un trabajo que abarca el tratamiento de un grupo de adultos con 2 esquemas terapéuticos combinados y una etapa sin tratamiento como fase control. Hay, además, un estudio en niños que abarca todos los casos existentes en el país. Los resultados a la fecha no alcanzan los objetivos finales y ello se debe al corto tiempo transcurrido, pero sí es posible concluir que los resultados preliminares son favorables ya que, de 11 casos, sólo en 3 se ha producido una discreta proliferación de tejido y la voz y la función respiratoria mejoró en todos los casos tratados. Se considera por tanto factible el llevar a cabo un programa nacional para el control de la enfermedad.

7. Estudios con el alfa IFN.

G. Mathe y Misset (165), quienes trabajan en el Servicio de Enfermedades Sanguíneas y Tumorales del Hospital P. Brousse en Francia, han llevado a cabo experimentos sobre el tratamiento de la leucimia linfocítica crónica con el alfa IFN, con dosis altas incrementadas o dosis bajas diarias durante 3 meses, en los que han hecho las siguientes observaciones:

Los efectos secundarios como fiebre, escalofríos y malestar dependen -- claramente de las dosis y se toleran muy difícilmente por períodos de más de 10 días a una dosis de 6×10^6 U diarias. Hay reducción de la cuenta de linfocitos a la dosis baja, pero no fue más pronunciada con incremento de la dosis. Hay regresión de los ganglios linfáticos y de lesiones cutáneas con el régimen bajo, y una remisión completa en los casos de administración prolongada de una dosis baja, la que parece óptima para dichos pacientes.

8. Estudios Fase II con beta IFN.

Los mismos autores G Mathe y Misset (166) realizaron otra fase experimental pero ahora empleando el beta IFN. Se trataron 16 pacientes con mieloma, con IFN fibroblástico humano (b-IFN) en dosis de 6×10^6 U/semana o de 3×10^6 U dos veces por semana, durante por lo menos 3 meses si era tolerado.

El tratamiento se descontinúo en 3 pacientes al presentarse efectos secundarios. En otro desapareció la proteína de Bence Jones. En 4 casos hubo reducción significativa de la infiltración de la médula ósea por células plasmáticas. En 5 casos hubo alivio o desaparición del dolor óseo. Parece ser que la administración prolongada es un factor importante para la respuesta óptima al tratamiento.

9. Uso del IFN en cáncer de mama.

Selman y cols. (167) emplearon el IFN leucocitario en 5 pacientes con cáncer de mama que presentaban metástasis a distancia y que se negaron a recibir el tratamiento citostático.

La dosis usada fue de 6×10^6 U por vía intramuscular diariamente por un mes y se redujo posteriormente la dosis. Hubo mejoría en todos los casos pero en 2 de ellos al reducirse la dosis empeoraron las lesiones. Todas las pacientes se mantienen vivas y activas entre 6-17 meses de iniciado el tratamiento. Las reacciones secundarias fueron mínimas y los resultados han hecho iniciar una investigación prospectiva con un mayor número de pacientes.

10. Aplicación del IFN como terapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama, melanomas y mesoteliomas.

Kupin (168) del Centro de Investigaciones del Cáncer en la URSS en Moscú, comenzó sus investigaciones sobre la aplicación del IFN leucocitario humano en la aplicación del mismo como terapia adyuvante en pacientes oncológicos (cáncer de mama y melanoma). Actualmente se lleva a cabo un estudio -- sobre la eficacia del IFN leucocitario humano en combinación con inmunodepresores (inmunomoduladores) para incrementar la actividad antitumoral de drogas citostáticas. Se estudian también los efectos de los inductores Poly (rA) Poly (rU). Están en estudio las dosis, esquemas y vías de administración -- del IFN. Todos los pacientes están bajo control inmunológico. A la fecha los datos preliminares nos permiten concluir la conveniencia de la aplicación -- de IFN en pacientes con ciertos tipos de cáncer.

11. Experiencias generales de la aplicación del IFN en enfermedades virales y neoplásicas en Cuba.

Limonta y cols. (169) exponen una reseña histórica desde el comienzo de los estudios clínicos con IFN en Cuba, tanto estudios piloto como estudios clínicos más profundos.

Durante dos años de trabajo se ha utilizado el IFN leucocitario en un total de 891 pacientes en Cuba. Las aplicaciones han sido llevadas a cabo - en varias vías de administración y en las dosis más convenientes, según las diferentes investigaciones reportadas para un total de 15 afecciones virales diferentes. Los resultados indican que no se presentan en la mayoría efectos secundarios si la dosis es tolerable, ni hay restos de toxicidad, que en ocasiones se presentan debido a que el IFN no es suficientemente puro.

No ha habido muchos casos de afecciones secundarias y , cuando esto ocurrió, se debió a dosis muy elevadas lo cual puede controlarse disminuyendo la dosis y ampliando el tiempo de tratamiento.

Como puede observarse a lo largo de todo el capítulo, el uso terapéutico y profiláctico del IFN se halla difundido en un gran número de países -- que lo han utilizado en infinidad de estudios sobre infecciones virales.

Las conclusiones de ello han sido en una gran mayoría buenas, ya que -- el IFN ha demostrado ser un excelente agente antiviral y en pocos casos produce efectos secundarios. No obstante, cabe observar que presenta un inconveniente de difícil solución que es su costo, y si consideramos que en la mayoría de los casos se requiere de altas dosis y tratamiento prolongado, es -- éste su mayor problema.

En el capítulo próximo nos ocuparemos de la producción del IFN y las posibilidades de fuentes de producción costeables, lo que es un tema por demás interesante si, como hemos referido, su costo es el principal inconveniente.

CAPITULO V.
PRODUCCION PURIFICACION Y CONTROL.

METODOS DE PURIFICACION Y PRODUCCION.

INTRODUCCION.

La producción de IFN ha sido demostrada en una gran variedad de células animales en cultivo. Cultivos en suspensión y en monocapa, tanto de leucocitos como células de riñón, de peritoneo y otras han sido empleadas en estudios primarios, si bien en un principio se usaron obviamente mezclas no homogéneas de células., consistentes en múltiples tipos celulares, y algunos de ellos demostraron después interferir con la producción de preparados de IFN. Hay por tanto una creciente necesidad de examinar la contribución particular de los componentes individuales de las células en la -- producción del IFN en un cultivo celular. Todos los estudios sobre la producción del IFN en un cultivo celular . Todos los estudios sobre la producción del IFN han sido realizados respecto al comportamiento de las células productoras en poblaciones celulares muy grandes. (Rodgers y Merigan 34).

El IFN fue inicialmente identificado como una sustancia, producida -- por células infectadas por virus, que podía conferir una resistencia antiviral a otras células. Como el primer estímulo observado para la producción fue un virus y la acción medible del IFN fue su acción antiviral, esta relación inducción- acción sugirió aparentemente que la actividad del IFN - se reducía a ser un agente antiviral; sin embargo, los estudios subsecuentes han demostrado que el IFN puede inducir reacciones inmunes de reconocimiento y alterar varias reacciones a nivel inmunológico (ver Cap. II), por lo que es justificable concluir que el IFN tiene un papel de inmunomodulador, y si tomamos en cuenta que el IFN puede también inducirse por mitógenos y a su vez inhibir la multiplicación celular puede atribuirsele además una actividad inhibidora de la multiplicación celular.

Por supuesto, en ausencia de IFN holólogo purificado, estos efectos antivirales inducidos por las preparaciones de IFN pueden deberse a otras sustancias antivirales extrañas al IFN y que pueden estar presentes en los preparados; así, el modificar la definición del IFN en donde se incluyan sus otros efectos puede ser prematuro si no se especifica la pureza del IFN, pero considerando las evidencias anteriores no podemos decir que se tenga una verdadera significación del concepto de IFN.

El criterio normal para la aceptación de una sustancia antiviral como el IFN involucra un gran número de mediciones indirectas de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, así como de la descripción de las actividades antivirales que éste induce. Como resultados generales de los estudios se presenta la siguiente tabla que se refiere a las propiedades del IFN aceptadas como tales, y cabe mencionar que estas propiedades están presentes en las actuales preparaciones de IFN, en las que están aparentemente libres de otros componentes . (Tomada de Stewart II 56).

TABLA II

PROPIEDADES DEL INTERFERON.

a. Propiedades biológicas.

- Inducción de la actividad antiviral.
- Requerimiento de ARN celular y síntesis de proteínas.
- Espectro característico de resistencia viral relativa.
- Especificidad de especie.

b. Propiedades fisicoquímicas.

- Actividad destruida por proteasas.
- Insensible a nucleasas.
- No traspasa las membranas de diálisis
- No sedimenta en ultracentrifugación (100 000 x g 2 horas).
- Estable en un rango de pH de 2 a 10.

Todos los IFNs por definición inducen actividad antiviral, así, el criterio es digno de confianza. En todos los casos reportados esta actividad está mediada por ARN celular y por procesos de síntesis de proteínas y esta actividad es válida contra un amplio grupo de virus conocidos. Se ha encontrado que las células de cada especie animal tienen un espectro característico de resistencia viral inducida por el IFN, como explica en uno de sus trabajos Stewart II (170), y el relativo orden de resistencia antiviral inducida en las células es determinado por la especie celular tratada y la productora. En suma, puede decirse que la actividad antiviral es muy consistente en cualquier IFN.

La " especificidad de especie " acerca de la actividad del IFN, fue por mucho tiempo considerado como una reacción de "cerradura y llave", - por lo que el IFN de ratón no puede inducir resistencia en células de pollo y viceversa, como demostró en sus experimentos Baron y cols (171); - no obstante, a la fecha han sido reportados varios casos de cruzamiento a diferentes niveles filogenéticos por lo que la afirmación anterior no puede tomarse como 100 % cierta. Otro punto importante es que diferentes preparados del IFN obtenidos de diferentes tipos celulares, pero del mismo animal, pueden diferir en su actividad en el huésped.

El IFN aparentemente puede ser retenido en grandes cantidades por membranas de diálisis y no sedimenta de soluciones tratadas por ultracentrifugación a velocidades lo suficientemente grandes para lograr la sedimentación de picornavirus. Es un importante dato considerar el peso molecular estimado para el IFN de diferentes especies animales, que presenta grandes variaciones; por ejemplo, el IFN humano puede tener un intervalo desde lo más bajo, cerca de 12 000 daltons, hasta lo más alto, -- mayor de 100 000 daltons.

La estabilidad a los ácidos (pH=2) ha sido una propiedad muy útil para la caracterización y purificación del IFN; sin embargo, cabe recordar que hay un tipo de IFN que no resiste el pH ácido, por lo que este crite-

rio no es válido para todos los tipos de IFN. Similarmente, la estabilidad térmica y los efectos de los desnaturalizantes difiere en los diferentes tipos producidos por una especie dada (Stewart II y De Clercw 172).

El tratamiento con nucleasas afecta la capacidad del IFN para actuar como antiviral, y a la fecha todos los IFNs probados han sido inactivados por enzimas proteolíticas. Así, podemos observar que el único criterio absoluto para definir al IFN sigue siendo la definición de que el IFN "es una proteína capaz de inducir en las células una actividad antiviral, que es dependiente de el ADN y de las vías metabólicas de síntesis de proteínas". Una mejor definición requiere de una extensa "nota -- al amrgen" para aclarar las otras características propias sólo de algunos tipos de IFN.

No obstante, de lo anterior tenemos 2 datos muy importantes:

1. Las diferentes propiedades del IFN observadas en los distintos preparados de una misma especie pueden atribuirse a impurezas.
2. Hay diferentes formas del IFN producidas por una sola especie animal dada.

De esto, cual es la respuesta correcta sólo puede saberse cuando se trabaja con el IFN altamente purificado, , de ahí la importancia de conocer los métodos de obtención y sobre todo de purificación de IFN, lo que será el tema a tratar en los siguientes párrafos.

Desde 1957 en que Isaacs y Lindenmann descubrieron el IFN, han sido muchos los investigadores que han tratado de producir por diferentes medios el IFN humano. Por razones históricas se había clasificado en 3 tipos según su origen: IFN leucocitario, fibroblástico e inmune.

Ahora sabemos que un tipo en particular no es producido por un sólo tipo de célula, y se ha propuesto una nueva nomenclatura: IFN alfa para el leucocitario, beta el fibroblástico y gamma para el inmune. Esto es únicamente una simplificación, puesto que a la fecha varios tipos del grupo alfa han sido aislados y caracterizados.

Hay datos que indican que hay varios tipos del grupo beta y sólo un tipo del gama ha sido aislado y purificado.

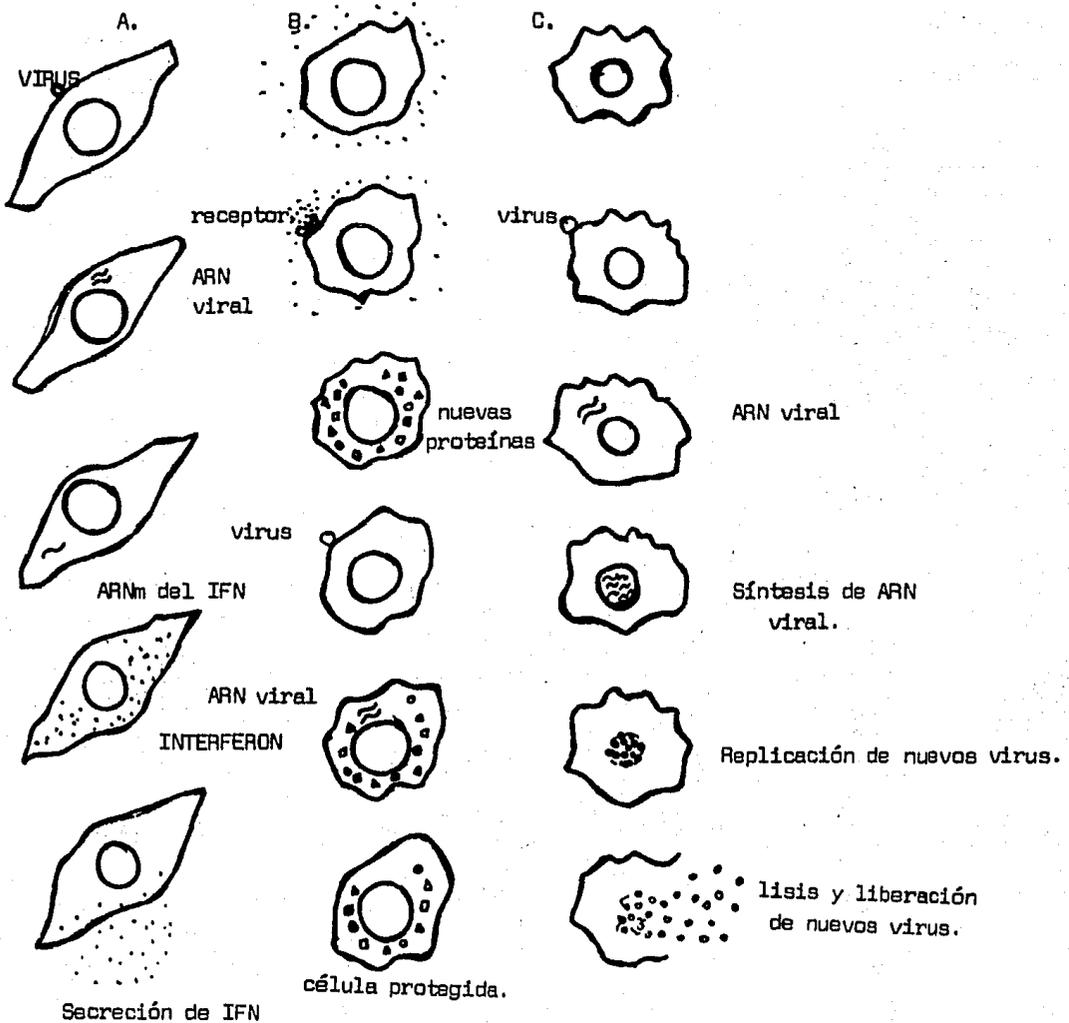
La razón de que el efecto protector del IFN no esté limitado a un sólo tipo de virus (como sería el papel de un Ac) es que el IFN no actúa atacando al virus; el IFN interactúa con la célula, a la cual protege, - como explica Stewart II (108), la formación del IFN es inducida cuando - un virus introduce su material genético (ADN o ARN) dentro de la célula. La presencia del material extraño (probablemente en forma de doble cadena de ARN) provoca en la célula la síntesis y secreción de moléculas de - IFN. El IFN secretado se enlaza a un receptor específico en la superfi- cie de otras células y ésto - hace, al parecer , que se inicie una serie de diferentes proteínas (algunas de las cuales han sido identificadas).

La proteína (IFNC. de esta manera induce en la célula la resistencia a los efectos que ocasiona comúnmente una infección viral: multiplicación del virus, lisis de las células y liberación de la nueva progenie de virus. Mucho falta aún por aprender sobre el modo de acción del IFN, pero los experimentos de Merigan y otros han sido de gran ayuda a este respec- to.

Como tanto se ha dicho, el IFN presenta múltiples actividades bioló- gicas además de su papel como antiviral. Dos de ellas son de gran interés por sus implicaciones en la terapia: una es la inhibición del crecimiento celular y otra es su capacidad de estimular a ciertas células del sis- tema inmune en los mamíferos : los linfocitos llamados "células asesinas ", que tienen un papel importante en la destrucción de células extrañas y quizá de células cancerígenas . Uno o ambos efectos se han podido demos- trar , según explica Strander en sus estudios llevados a cabo en el -- Instituto Karolinska, sobre el papel del IFN en la regresión de algunos tumores.

SINTEISIS Y ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL INTERFERON.

- A. La proteína (IFN) es producida y secretada por la célula infectada por el virus. Es aparentemente la presencia de cadenas dobles de ARN lo que inicia el proceso de síntesis de ARNm de IFN, que posteriormente permite la transcripción a IFN.
- B. El IFN secretado se enlaza a un receptor molecular específico en la superficie de otra célula. Esto origina una serie de cambios en la actividad celular, incluyendo la síntesis de proteínas capaces de resistir la infección viral.
- C. Cuando la célula no es protegida y ocurre en ella una infección viral, los virus son replicados en ella y producen la lisis y liberación de nuevos virus.



PRODUCCION DE IFN TIPO II (INMUNE) EN RESPUESTA A MITOGENOS.

En 1965 Wheelock (6) describió la presencia del IFN como una sustancia que aparecía en el sobrenadante de cultivos celulares de leucocitos humanos estimulados con un mitógeno inespecífico, una fitohemaglutinina (PHA). El IFN producido en tales cultivos en respuesta a mitógenos tiene muchas propiedades físicas y químicas, así como biológicas, comunes al IFN producido "in vitro" por leucocitos humanos en respuesta a virus (como la sensibilidad a tripsina, a ADN asa y el coeficiente de sedimentación). Sin embargo, también hay notables diferencias entre ambos tipos de IFN. El IFN producido en cultivos celulares durante la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos, o por linfocitos sencivilizados con bacterias o Ags virales, es el que ahora se conoce como IFN inmune o tipo II; el IFN producido por numerosos tipos celulares en respuesta a virus o poliribonucleótidos sintéticos se conoce como del tipo I o IFN clásico.

El origen celular preciso del IFN estimulado por mitógenos no fue determinado en los primeros estudios, mientras los linfocitos fueron conocidos por ser afectados por PHA, con potenciadores de la síntesis de ARN, de nuevas proteínas y de síntesis de ADN (Epstein 1964), los resultados indicaban que los linfocitos fueron las células responsables de la producción de IFN en respuesta a PHA.

Stewart II (172) ha llevado a cabo extensos estudios para determinar las condiciones óptimas para la producción "in vitro" del IFN por leucocitos, desarrollando nuevas técnicas para la producción de poblaciones puras de linfocitos y macrófagos, por aislamiento de poblaciones puras de linfocitos T por medio del paso a través de una columna de fibra de vidrio y por aislamiento y purificación de poblaciones de linfocitos T y B por su diferente afinidad hacia compuestos fluorescentes.

En otros estudios con mitógenos, se encontró respuesta positiva de producción frente a PHA y el IFN producido demostró ser sensible a la --

tripsina, no sedimentar por ultracentrifugación y no ser afectado por -- ARNasa y ADNasa. Su actividad permanecía constante después de exponerlo 18 horas a pH= 2.

Hay evidencias de que tanto los linfocitos T como los B son capaces de producir IFN al ser inducidos por mitógenos. Se han encontrado otros agentes capaces de afectar la producción de IFN como el Dibutiril-AMPC, las prostaglandinas, la toxina del cólera y otros agentes que estimulan el AMPC y que pueden suprimir la producción de IFN linfocítico inducido por mitógenos.

PRODUCCION DE IFN TIPO II O INMUNE EN RESPUESTA A ANTIGENOS.

Green y cols. (174) demostraron que los cultivos de leucocitos obtenidos de individuos con respuesta cutánea positiva al derivado de protefina purificada (PPD) o presentando una reciente inmunización con el toxoide del tétanos o de la difteria, podían responder a estos Ags con la proliferación de linfocitos y la producción de IFN. Esta fue la primera demostración de que la inducción inmuno-específica de IFN puede ocurrir "in vitro" en células humanas frente a Ags no virales. Posteriormente Milstone y Waksman (175) demostraron que el IFN de ratón producido por células sensibilizadas se produce antes de el humano.

De nuevo el IFN tipo I demostró ser estable a pH ácido, y se demostró que los linfocitos humanos son una buena fuente de IFN al inducirse por Ags como el PPD. En estudios posteriores se han empleado otros Ags, como los preparados a partir de virus del Herpes simplex. Numerosos Ags bacterianos y virales, así como complejos AG-Ac pueden inducir la producción de IFN tipo II en linfocitos sensibilizados, y los macrófagos también incrementan "in vivo" la producción de IFN por medio de linfocitos.

IFN CLASICO TIPO I DE ORIGEN LINFOCITICO.

Una de las características del IFN tipo I es que puede ser inducido

en un amplio grupo de diferentes tipos de células. En 1966 Wheelock (6) dio evidencias de que tanto los linfocitos humanos como las células mononucleares son responsables de la producción del IFN tipo I. La producción de IFN ocurre considerablemente antes en la respuesta "in vitro", tanto frente a mitógenos como a Ags, y los títulos de producción son mayores.

Cultivos puros de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférico por medio del paso de ésta a través de una columna de vidrio-silicón,-- una excelente fuente de IFN. Los linfocitos separados por medio del gradiente de Ficoll han demostrado ser también efectivos para producir IFN.

En resumen, los linfocitos humanos tienen un buen poder de producción de IFN tipo I en respuesta a varios virus y la respuesta ocurre -- considerablemente antes "in vitro", siendo además más rápida frente a virus que frente a mitógenos y Ags, dando además mayores títulos.

PURIFICACION DEL INTERFERON.

A la fecha, han sido publicadas numerosas revisiones respecto a la purificación y caracterización del IFN (Merigan- 28, Rodgers-34, Hajnicka-47, Stinebring-69, Berg-83, Pestka-103 y otros).

La mayoría de ellos comienzan con una larga explicación sobre el porqué ha sido tan increíblemente lento el avance en esta área, y esto es debido a que no obstante que la actividad del IFN es extremadamente grande, la cantidad de IFN como proteína pura en los preparados crudos de IFN es extremadamente pequeña. Básicamente, este problema se ha presentado a todos los investigadores que comenzaron con preparados de moderada actividad, y después de la purificación prácticamente no encontraron más que restos de la proteína, con lo que se concluyó que la actividad específica del IFN era mayor que la cantidad de proteína detectable. Fantès (176) llevó a cabo una recopilación de varios procedimientos empleados para la purificación que abarca la mayoría de los cono-

cidos hasta 1973, concluyendo con los progresos logrados hasta entonces. Afortunadamente, no es necesario volver a sufrir las frustraciones del pasado para lograr la purificación del IFN humano, ya que ahora parece ser que se tienen buenas bases para resolver la mayoría de las cuestiones sobre la actividad y propiedades del IFN puro homólogo.

Podemos decir que el presente, la combinación de dos métodos básicos que utilizaban individualmente, combinados dan un buen IFN purificado. Estos dos métodos, ambos accesibles, uno basado en la purificación físico-química de la proteína y el otro empleando técnicas inmunológicas, - son los más importantes, por lo que explicaremos brevemente en qué consisten.

a. Métodos Físicoquímicos de purificación.

Desde que se supo a ciencia cierta que el IFN era una proteína, se han empleado métodos químicos en los diversos esquemas de purificación del IFN. Estos fueron resumidos por Fantes (176) y ha sido poco el progreso sobre la purificación desde entonces a la fecha, ya que parecen -- encontrarse nuevos problemas antes de resolver los antiguos; como se dijo antes, el principal problema radica en la elevada actividad específica del IFN aún en cantidades no detectables físicamente. A través de la experiencia se ha eliminado la necesidad de detectar físicamente a la proteína y el problema consiste en partir de una cantidad adecuada de material para obtener después de la purificación una cantidad detectable de la pureza obtenida.

Tres descubrimientos han permitido el desarrollo de los métodos físicoquímicos para la purificación:

1. Los métodos para incrementar los niveles de IFN producidos por medio de la inducción por "priming" o cebado (Ver Cap. de Inducción) y la superinducción. Estos métodos han sido empleados para incrementar el rendimiento de las células de 100 a 1000 veces en los cultivos celulares humanos y de ratón.
2. La demostración de que la purificación de IFN requiere de un período inicial a gran escala.

3. La demostración de que el IFN puede ser reactivado después de su disociación bajo condiciones de desnaturalización, permitiendo así la aplicación de la electroforesis en SDS/ poliacrilamida para el aislamiento del IFN.

Estos descubrimientos se han empleado para obtener mayores cantidades de IFN en cultivos celulares humanos y de ratón, obteniéndose títulos hasta de 10^5 U/ml en varios laboratorios. Con esta elevada actividad del IFN se facilitan cálculos para predecir las cantidades necesarias para iniciar la purificación con buen resultado.

Como prácticamente todos los estudios sobre purificación en los últimos años han estado referidos a ratones y humanos, haremos una revisión de cada uno de estos sistemas.

INTERFERON DE RATON.

Los avances recientes en la purificación de IFN de ratón por métodos físico-químicos se resumen en la siguiente tabla (Obtenida del libro "IFN -- and Inducers" de Stewart II 56), donde puede observarse la actividad específica obtenida en los diferentes preparados y el progreso en los años señalados.

T A B L A I.

Progreso en la purificación del IFN de ratón por métodos Físico-químicos.

AÑO.	METODO DE PURIFICACION	ACTIVIDAD ESPECIFICA. (U/mg).
1972	SE/Sephadex; PAGE	10^6 U/mg de proteína .
1973	CM/Sephadex	3×10^6 U/ mg.
	Acetato de zinc; SE/Sephadex	2×10^6 U/mg .
	SE/Sephadex; DEAE/Celulosa y CM / Sephadex	10^7 U/mg.

AÑO	METODOS DE PURIFICACION	ACTIVIDAD ESPECIFICA.
1973	SE/Sephadex; PAGE Acetato de zinc; CM/Sephadex PAGE	10^7 U/mg de protefina. 10^7 U/mg .
1974	Acetato de zinc; DEAE y CM/Sephadex PAGE	3×10^8 U/mg.
1975	Acetato de zinc; SP/Sephadex; PAGE (NH_4) ₂ SO ₄ ; Biogel-P150 CM/Sephadex.	3×10^8 U/mg. 3×10^8 U/mg.
1976	Affigel-202 BSA- agarosa	1×10^8 U/mg. 3×10^8 U/mg.

Muchos investigadores iniciaron sus esquemas de purificación para llegar sólo a cantidades apenas detectables de protefina antes de obtener cantidades razonables de protefina (IFN). Stanceky y Paucker (177) purificaron IFN de ratón a partir de células L, por medio de cromatografía por SE/Sephadex y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), que contenía 10^6 U/mg de protefina; también obtuvieron similares resultados por cromatografía con CM/Sephadex. Otros investigadores obtuvieron IFN bastante purificado por combinación de precipitación con acetato de zinc, cromatografía con CM/Sephadex y PAGE, como es el caso de Gresser (154) que obtuvo títulos de 10^7 U/mg de protefina.

La medición más elevada de la actividad específica del IFN se reportó de 1.5×10^9 unidades internacionales /mg de protefina; este IFN se obtuvo de células de Newcastle, pero el IFN obtenido no era homogéneo.

Recientemente se demostró que el IFN de ratón puede desnaturalizarse en condiciones de disociación con soluciones detergentes aniónicas o catiónicas en caliente, y restaurarse a su forma original al remover las moléculas detergentes (Stewart II 36).

Otro método de purificación a gran escala es el descrito por Davey y cols. (178), quienes encontraron que el IFN crudo de ratón podía enlazarse a

albúmina inmovulizada en agarosa y después eluirse por levantamiento con una fuerza iónica, recobrando su actividad después de purificado, hasta de 3×10^8 U/mg de proteína.

Un hallazgo significativo de este estudio fue que el IFN de ratón - fue separado en dos fracciones de diferente actividad, que tenían distinta afinidad por el absorbente, confirmando los datos sobre la heterogeneidad del IFN en una misma especie. La aparente capacidad de este procedimiento para separar las dos fracciones nativas, puede ser de valor en las posteriores caracterizaciones de estos IFNs.

Estos informes muestran que hay diferentes formas de IFN de ratón - que pueden separarse por este procedimiento, permitiendo incluso seleccionar el IFN molecular que se desee purificar.

INTERFERON HUMANO.

Los métodos fisicoquímicos que han sido empleados para la purificación del IFN humano han demostrado que el IFN humano leucocitario y el fibroblástico no pueden ser purificados por el mismo esquema, revelado nuevamente las diferencias aparentes de estos interferones; por esta razón, su purificación debe tratarse separadamente. Un resumen de los progresos en las técnicas de purificación del IFN humano leucocitario y fibroblástico por métodos fisicoquímicos se muestra en la siguiente tabla, tomada del libro de Stewart II (56).

T A B L A III.

Progreso en las técnicas de Purificación por métodos Fisico- Químicos del IFN humano.

METODO DE PURIFICACION	ACTIVIDAD ESPECIFICA APROXIMADA.
<u>IFN leucocitario Humano.</u>	Unidades por miligramo . de protefna.
(NH ₄) ₂ SO ₄ ; CM-DEAE-celulosa, Sephadex G- 50 .	2 x 10 ⁶ U/mg.
KSCN-ácido; precipitación ácido etanol. Cromatografía por a.a. hidrofóbicos.	10 ⁶ a 10 ⁷ U/mg.
SDS- Sephadex G-100	4 x 10 ⁵ U/mg.
	5 x 10 ⁷ U/mg.
<u>IFN Fibroblástico Humano.</u>	
Vidrio-poro controlado.	10 ⁶ U/mg.
Cromatografía por a.a. hidrofóbicos.	4 x 10 ⁶ U/mg.
Cromatografía con Con A- agarosa .	5 x 10 ⁷ U/mg.
(NH ₄) ₂ SO ₄ pH= 2; Bio-Gel P 150	2 x 10 ⁸ U/mg.
CM- Sephadex; SDS- PAGE	2 x 10 ⁸ U/mg.

IFN Humano Leucocitario.

Virtualmente , toda la producción de IFN humano leucocitario en la década pasada y anterior (60'-70's) se obtenía a partir de leucocitos, bajo la dirección del Dr. Cantell, en Helsinki Finlandia, y prácticamente toda la purificación y caracterización de los IFNs obtenidos estuvo bajo la dirección del Dr. Cantell o bien utilizando el IFN que él generosamente proporcionaba a otros investigadores. Cantell y sus asociados (179) han desarrollado metodologías para la producción en gran escala y purificación de IFN humano leucocitario. La rutina de purificación consiste en una precipitación ácida con tiocianato de potasio (KSCN) para concentración, solubilización en etanol y precipitación selectiva del IFN después de las otras proteínas por pequeños incrementos del pH hasta la neutralidad. Este procedimiento incrementa la pureza de los preparados de IFN crudo, que se presentan ligeramente amarillentas, con una actividad antiviral específica de 10^4 a 10^5 U/mg de proteína y de 10^6 a 10^7 U/mg de IFN. Son estos los preparados que se han empleado en una gran cantidad de estudios en el mundo.

El IFN leucocitario ha sido purificado en un grado de pureza similar empleando una combinación de métodos; precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con CM-DEAE- celulosa y filtración en gel. En estudios posteriores, Paucker (183) observó que el IFN leucocitario humano podía retornar a su forma original. activa después del tratamiento con SDS; al purificarlos en columnas de Sephadex -G 100 conteniendo SDS , este autor reportó una purificación de 50 veces en un sólo paso, de una preparación previamente purificada que contenía albúmina sérica para su estabilidad, y obtuvo una actividad específica de 5×10^7 U/mg de proteína.

Es interesante el hallazgo adicional de que cuando se efectuaba la filtración a través de SDS-Sephadex se obtenía una fracción de aproximadamente 26 000 daltons, y la cromatografía del mismo IFN en SDS- hidroxipatita produjo dos fracciones de 20 000 y 16 000 daltons. Stewart II y Desmyter (181) reportaron que el método de SDS-PAGE resuelve dos fracciones moleculares --

moleculares distintas de IFN leucocitario humano, con pesos aproximados de 21 000 y de 15 000. La fracción homogénea del IFN con peso aproximado de 20 000 ha sido también reportada por otros autores, por lo que estos hallazgos (de una sola fracción y de dos fracciones para el mismo IFN) hacen evidente la existencia de heterogenicidad en una misma especie.

Este hecho presenta el nuevo problema de diferenciar la fracción a purificar, que puede basarse en sus diferentes propiedades tanto electrostáticas como de hidrofobicidad.

IFN Fibroblástico Humano.

Hace unos pocos años se inició el trabajo de los investigadores que demostraron que el IFN leucocitario y el fibroblástico tenían diferente estabilidad, y comparando ambos tipos descubrieron que el leucocitario es más estable que el fibroblástico a la desnaturalización por SDS o por agitación. Estos estudios marcan la clara diferencia para los métodos de purificación que se emplean en cada caso. Adicionalmente se reportó más tarde que también presentan diferencias en su enlace frente a varios absorbentes, mostrando así que no es posible purificarlos por los mismos métodos.

Jankovsky y cols (182) reportaron que el IFN fibroblástico puede unirse a BSA-Agarosa y CH-Sepharosa y el leucocitario no, lo que hizo suponer que el IFN fibroblástico puede ser una glicoproteína y el leucocitario no.

Sin embargo, si se recuerda, ambos IFNs presentan el mismo enlace frente a BSA-agarosa, según otros autores. Jankovsky también informó que ambos IFNs pueden ser enlazados a Dextrana azul inmovilizada en agarosa, pudiendo después eluirse el IFN leucocitario con sales y el fibroblástico con etilén-glicol. Estos datos sugieren que el IFN fibroblástico estaba adherido por un enlace hidrofóbico y el leucocitario por enlace electrostático. El más alto nivel de purificación del IFN fibroblástico fue logrado por Stewart II y Knight (56), empleando una combinación de procedimientos

físico-químicos similares a los empleados para la purificación del IFN de ratón, obteniéndose cantidades detectables físicamente y de actividad de 2×10^8 U/mg de proteína, empleando para ello SDS-PAGE, y encontrando una sola proteína que correspondía a la actividad antiviral, con peso molecular de 20 000 daltons; la prueba de Schiff demostró que ésta es una glicoproteína y se obtuvo un IFN homogéneo, lo cual ha sido confirmado por otros autores.

B. Purificación por cromatografía de Afinidad con Acs Anti- IFN.

Una alternativa obvia en los esquemas de purificación basados en las propiedades físico-químicas del IFN, como solubilidad, tamaño y carga, es el método basado en su antigenicidad. Muchos Acs presentes en bajas concentraciones pueden purificarse por técnicas de Acs específicos covalentemente enlazados a un soporte en base sólida; lo tardado del desarrollo y aplicación de esta técnica en la purificación puede deberse a las primeras suposiciones de la limitada antigenicidad del IFN y la dificultad de la separación inicial directa de los Acs contra el IFN de una masa de Acs específicos para otros - para otros inmunógenos diferentes al IFN, presentes en el inóculo. Muchos intentos tempranos para estimular Acs frente al IFN resultaron infructuosos, + originando la prematura suposición de que el IFN era pobremente antigénico (Isaacs). En retrospectiva, es obvio que estos resultados negativos pueden atribuirse a las cantidades extremadamente pequeñas de IFN en un inóculo (Estos primeros investigadores no tenían medios para saber que el IFN podía tener una altísima actividad en una muestra no detectable físicamente). Sin embargo, Paucker y Cantell (183) demostraron que empleando preparaciones lo suficientemente potentes de IFN y con un esquema apropiado de inoculación repetido por varios meses, era posible obtener un antisuero de cobayos capaz de neutralizar la actividad de IFN de ratón; después, los Acs fueron estimulados en cobayos y en conejos con IFN de ratón y pollo. Se reportó que mientras que los conejos podían estimular la producción de Acs neutralizantes contra el IFN xenogénico (humano y de ratón), aparentemente no producían Acs homólogos contra IFN de

conejo. La falta de inmunogenicidad para IFN homólogo fue descrita por otros autores y también en el caso de IFN humano no han sido reportados casos de Antigenicidad homóloga para el IFN,

Es de interés, sin embargo, que el IFN humano puede ser antigénico en conejos. Las cantidades disponibles de IFN para inyección en las etapas de inmunización han evolucionado notablemente desde los primeros estudios de antigenicidad: con el IFN. Por ejemplo, la primera respuesta de Acs para el IFN se llevó a cabo inyectando semanalmente mil U/de IFN ratón por un período de cinco meses y esquema similar en conejos para el IFN humano, obteniéndose Acs capaces de neutralizar 10 U de IFN en diluciones de 1:10 y 1:200.

Más recientemente, Berg y cols (184) obtuvieron Acs contra el IFN inyectando semanalmente a conejos con 8 millones de U por un período de 3 meses; los Acs obtenidos presentaron actividad neutralizante de hasta una dilución de 1:30 000 (cobayos), 1:150 000 (conejos) y de 1:200 000 (ovejas).

Una observación importante de estos investigadores respecto al uso de antisueros para la purificación a gran escala, fue que el antisuero anti/IFN INMOVILIZADO tenía una mucho mayor capacidad de enlace al IFN que la capacidad de neutralización del IFN; ellos calcularon que un litro de antisuero con título de neutralización de 10^5 podía, cuando se inmovilizaba en agarosa, enlazarse a más de 10^8 U de IFN. Así, es posible de producir sueros contra el IFN y de este modo emplearlos para la purificación del mismo.

Un resumen de la aplicación de la cromatografía de afinidad para la aplicación de IFN se presenta en la tabla siguiente (Tomada de Stewart II 56).

T A B L A IV.

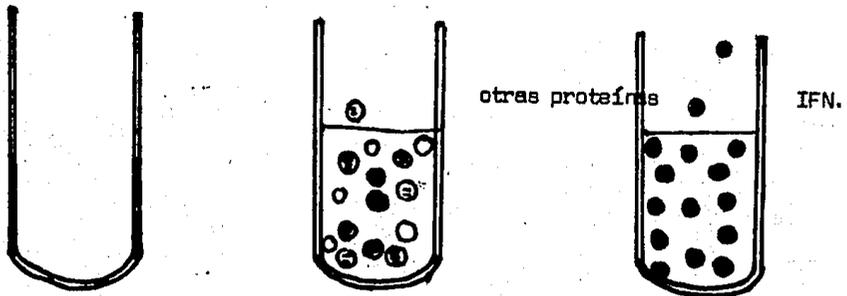
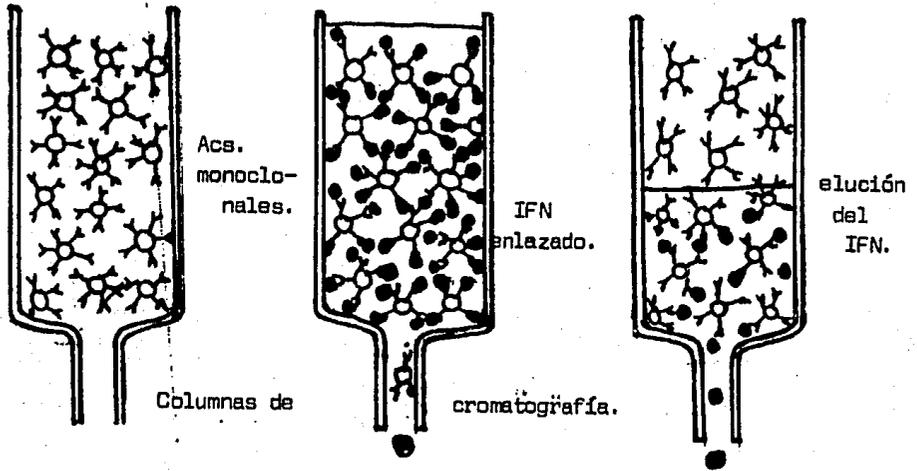
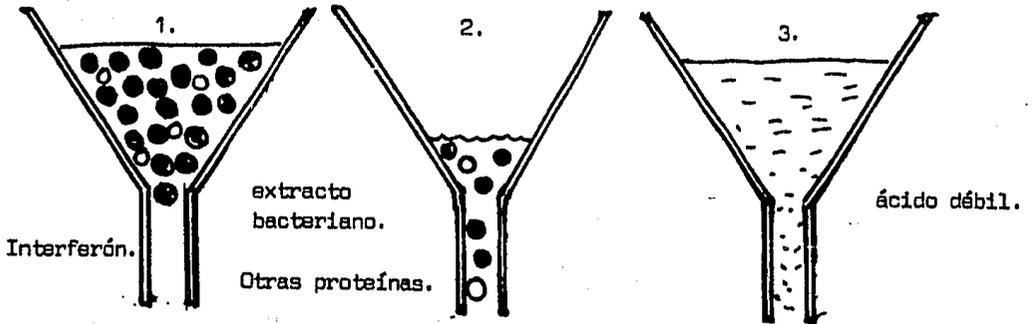
Purificación de IFN por cromatografía de Afinidad de Acs.

IFN (Especie)	Fuente de Acs	Factor de purificación	Actividad específica*.
Fibroblastos de embrión de ratón.	Carnero	31 a 1990 veces.	6×10^3 a 4×10^5
Hígado de ratón.	Carnero	85 veces .	4×10^5 U/mg.
Células L de ratón.	Carnero	20 a 50 veces.	1 a 3×10^8 U/mg.
Suero de ratón.	Carnero	391 veces	3×10^3 U/mg.
Leucocitario Humano.	Conejo	680-1470 veces.	4×10^6 a 3×10^7 .
Fibroblástico Humano.	Conejo	1800-3600 veces.	5×10^6 a 10^7 U/mg.
Leucocitario Humano,	Carnero	Varios miles de veces.	Mayor de 2×10^5 .

* Actividad específica en U/mg. de proteína.

El IFN humano ha sido también cromatografiado por procedimientos de afinidad con inmunoabsorbentes. Ambos IFNs, leucocitario y fibroblástico, pueden purificarse en columnas que contengan enlazados Acs anti-IFN, pudiendo después separarse los Acs contra otras proteínas por medio del paso de una solución de gamma globulinas a través de la columna de agarosa, quedando lista así para el IFN. Se observó que la afinidad por el IFN puro es mucho más lábil en el fibroblástico que en el leucocitario; nuevamente se observó que el IFN leucocitario presenta heterogenicidad al eluirse, en este caso dos fracciones diferentes, por las globulinas anti-IFN en un gradiente de pH.

1. La mezcla de IFN, extracto bacteriano y otras proteínas se pasa por una columna de esferas recubiertas de Acs. monoclonales anti-IFN alfa.



2. Las moléculas de IFN alfa se enlazan a los Acs específicos y todos los restos pasan la columna y son eliminados.

3. Agregando una solución ácida débil, las moléculas de IFN alfa se eluyen y se colectan en forma concentrada y pura...

Esta discusión sobre los métodos de purificación a gran escala de IFN nos ha mostrado los métodos virtualmente útiles para dicho fin; como se mencionó en principio, actualmente se trabajan ambos métodos en combinación para obtener mejores resultados. Por ejemplo, se obtiene el IFN más altamente purificado por métodos físico-químicos y se enlaza covalentemente a agarosa, mientras que por otro lado se inocula IFN crudo para obtener suero que contiene muchas impurezas. Cuando el antisuero anti/IFN se pasa a través de la columna que tiene unido el IFN puro, los Acs anti-IFN específicos se enlazan al IFN y se eluyen después por un lavado ácido; y luego son inmovilizados en una columna de agarosa y la columna resultante contendrá Acs IFN específicos que pueden emplearse para purificar preparados crudos de IFN.

Alternativamente, el IFN purificado por métodos físico-químicos puede ser empleado como inmunógeno para obtener Acs que se inmovilizan y emplean para la purificación a gran escala de preparaciones crudas de IFN.

Como hemos mencionado, entre los problemas de purificación, se añade el problema de la heterogenicidad de él o los IFNs, ya que hay evidencias de que el IFN por sí mismo existe en varias formas en una sola especie dada y cabe preguntar, si son producidos por diferentes genes o bien presentan diferentes post-transcripciones modificadas de un mismo gen. Los informes recabados indican que hay varias formas moleculares de IFN producidas por una misma especie y son básicamente:

- Determinaciones del peso molecular donde se ha demostrado la existencia de por lo menos 2 formas diferentes de IFN humano leucocitario.
- Estabilidad del IFN. Como se recordará, Salvin y Younger propusieron una clasificación para el IFN debido a sus resistencias al pH=2 para el tipo I, y el lábil al ácido como el tipo II, lo que significa que hay por lo menos 4 formas moleculares distintas.
- Afinidad del IFN frente a diferentes ligandos; como vimos antes, el IFN fibroblástico se puede unir a BSA inmovilizado en agarosa, no así el leucoci-

tario; lo mismo existe una diferencia en afinidad frente a CH-Sepharosa, Con A, Dextrana azul, SDS-PAGE y otros.

- Especificidad de especie. Los datos acumulados indican que el IFN puede presentar actividad en células heterólogas y que poblaciones de peso molecular distinto, como el IFN tipo I y tipo II, varían en su rango de actividad específica.

- Heterogeneidad antigénica. Como ya se dijo antes, los Acs producidos por un animal inoculado con IFN heterólogo, no neutralizan todos los IFNs del mismo animal que los produjo, ya que por ejemplo, el antisuero anti-IFN tipo I no neutraliza el IFN tipo II.

Estas evidencias indican que una especie es capaz de producir no uno - varios IFNs diferentes que tienen características típicas en cada caso, y -- presentan diferentes estructuras primarias y son probablemente producidos -- por genes diferentes, o bien son productos de post-transcripciones en los -- patrones genéticos claves.

Además el IFN intracelular puede diferir del secretado por una célula y puede haber interconversión de un IFN a otro, lo que permite que las formas heterogénicas de IFN se homogeneicen para facilitar la purificación. (Allen-90, Nagata-88, Salit-81, Havell-67 y otros).

En suma, se ha establecido que una especie animal dada es capaz de producir una variedad de especies moleculares de IFN, pero no es aún bien conocido el significado de este hecho, si lo tiene.

C. Producción en masa del IFN humano.

Una gran parte del IFN empleado en estudios clínicos se ha obtenido, co mo ya se decía antes, de leucocitos, que se obtienen de sangre humana por centrifugación a bajas velocidades. Este proceso produce una capa rica en células rojas, una capa rica en células blancas (en el centro) y el plasma en la parte superior. La fracción rica en leucocitos es inducida a producir IFN

del tipo alfa por infección con el virus Sendai.

El tipo bata es producido en cultivos de fibroblásticos en monocapa inducidos por poly (rI).Poly(rC) y superinducidos inhibidores de la síntesis de ARN y de proteínas, pero la desventaja de este sistema es la limitada vida media de los fibroblastos; su capacidad de producir IFN decrece después de 50 pases (resiembras).

El IFN también puede producirse en gran cantidad empleando líneas celulares estables. Células linfoblastoideas dan en principio el IFN alfa, y las fibroblastoideas el tipo bata.

Muchas de estas células pueden subcultivarse e inducirse para producir IFN indefinidamente. Un gran avance en la tecnología de producción de IFN -- ocurrió a principios de 1980. Empleando la tecnología de la combinación y recombinación del ADN, fueron aislados genes del IFN humano, se insertaron dentro de la bacteria para sintetizar IFN humano biológicamente activo (Lengyel 99). El método empleado para obtener los primeros plásmidos bacterianos (pequeños fragmentos de ADN bacteriano) específicos para la producción de alfa IFN humano en *E. coli*, que consiste en los pasos siguientes:

ARN^m (ácido desoxiribonucleico mensajero), es aislado de leucocitos humanos infectados por el virus Sendai, separados por un gradiente de centrifugación de sucrosa. La fracción con la mayor actividad de ARN^m del IFN se identificó con una prueba de aislamiento en oocitos de rana. El ARN^m en esta fracción fue empleado como un "templete" (acoplador) para la síntesis de cadenas dobles de ADN complementarias, y el ADN complementario fue insertado en los plásmidos bacterianos (PBR 322), los cuales se emplearon para la transformación de *E. coli*.

Las clonas (grupos de células que derivan de un sólo individuo) de *E. coli* transformadas (cerca de 5000) fueron divididas en grupos de 500. Estas fueron ensambladas con segmentos complementarios de ADN para el ARN^m del IFN por una prueba de hibridización-transcripción. Para este propósito, el

ARNm de los leucocitos inducidos fue hibridizado por un plásmido de ADN para cada uno de los grupos, y el ARNm fue recuperado por una técnica de transcripción a oocitos.

Uno de los grupos de ARNm de IFN hibridizado se separó en varios subgrupos para ensayos. De estas operaciones resultó el aislamiento de un plásmido híbrido con un inserto complementario de ARNm de IFN.

Este inserto (que contenía 320 pares de bases) resultó más corto que el ARNm de IFN esperado, por lo que se empleó para buscar otros más largos. Una vez que se encontró que había un inserto lo suficientemente largo (910 bases), se consiguió que la E. coli transformada con este plásmido sintetizara un polipéptido con actividad de IFN humano en células.

No obstante que el plásmido fue construido para permitir la síntesis de IFN al fusionarlo en una parte de la proteína beta-lactamasa, la transcripción del IFN activo aparentemente comienza dentro de la región insertada del ARNm para IFN estos resultados han sido demostrados también en el aislamiento de la clona de ADnc de beta IFN expresado también en E. coli.

RENDIMIENTO DE LA PRODUCCION DE IFN EN E. COLI.

El primer ADnc de IFN contenido en plásmidos y expresado en E. coli, -- produjo pequeñas cantidades de IFN(20 000 U de IFN/litro de cultivo, aproximadamente 2 moléculas de IFN por célula). Para incrementar el rendimiento de IFN, los segmentos de ADnc de IFN fueron insertados en otros plásmidos más -- eficientes.

Esto comúnmente incluye un promotor y un sitio de enlace ribosómico y -- un operón eficiente bacteriano o viral (Ej. Lac, beta-lactamasa, trip). Así este segmento es eslabonado a una distancia apropiada del sitio de enlace ribosomal por el codon iniciador de la transcripción (ATG), seguido inmediatamente de la región codificadora del IFN (ADnc).

La inserción de 2 o 3 promotores sucesivos en la posición precedente de el sitio de iniciación de la traducción del IFN funciona como un potenciador

de la eficiencia en la expresión de plásmidos.

La síntesis eficiente de varios IFNs como alfa -1, alfa-2 y beta 1 por medio de plásmidos de expresión en *E. coli*, ha sido reportada con un rendimiento de hasta 0.6 mg de IFN (2.5×10^8 U) en un litro de cultivo.

A la fecha se realizan experimentos para la producción de IFN empleando levaduras. (Lengyel 99).

D. Método Actual de Purificación y Producción de IFN.

El Dr. Sidney Pestka (103) publicó en 1983 el método de producción de IFN que emplea actualmente para la producción en gran escala.

El Dr. Pestka inició sus trabajos en 1977 tratando de purificar alfa-IFN humano en su laboratorio en el Instituto Roche de Biología Molecular, y su primer objetivo fue el obtener grandes cantidades de IFN leucocitario crudo. Su método de preparación fue esencialmente el mismo que desarrolló años antes el Dr. Cantell; leucocitos humanos son incubados con un virus inductor, virus Sendai o Newcastle. Cantell había empleado suero humano o bovino como componente del medio de cultivo, Pestka empleó un sustituto de proteína de leche (caseína), ya que siendo una proteína simple era más fácil de remover en los concentrados finales que las múltiples proteínas que componen el suero. El halló que el rendimiento en la producción era mucho mayor empleando leucocitos de pacientes con leucemia mielógena crónica, en vez de leucocitos normales. Después de la incubación durante la noche, las células y los virus son separados por centrifugación; el sobrenadante contiene el IFN crudo junto con otras proteínas, y en cada paso se hacen pruebas para determinar la actividad del IFN en términos de "actividad específica". El ensayo común consiste en medir la inhibición de la destrucción celular frente a un virus, lo que toma 3 días. Familletti y Rubinstein del mismo laboratorio, han encontrado un método para acortar el tiempo a menos de 16 horas, lo que acelera el proceso de purificación.

Conociendo los problemas comunes a la purificación, Pestka decidió em-

plear la técnica llamada de cromatografía líquida de alta resolución.

Los métodos cromatográficos comunes involucran en general la absorción de la mezcla en un soporte sólido y la elución de las diferentes fracciones con un solvente. En la cromatografía líquida de alta resolución la mezcla inicial se absorbe en partículas esféricas (perlas) muy finas empacadas dentro de la columna, y el solvente es burbujeadado a través de ella. El alcohol etílico, aceptado como un buen solvente, no funcionó por lo que probaron con solventes menos polares, tomando como ideal al n-propanol; éste fue burbujeadado dentro de la columna y eluyó sucesivamente a las proteínas que se colectaron en tubos. En cada fracción obtenida se ensayó la actividad del IFN. Las fracciones relativamente ricas en actividad se colocaron en una nueva columna y se volvieron a purificar. Alternando el proceso normal de cromatografía con el proceso inverso, en el que las perlas se recubren con grupos hidrofílicos y el solvente es menos polar, lograron purificar el IFN con menos pasos y una pureza de hasta 80 000 veces.

La actividad específica del IFN purificado dio hasta 400 millones de U por mg de proteína, y se obtuvo una sola fracción homogénea de aproximadamente 17 500 daltons.

Durante el proceso de purificación se observó que diferentes fracciones obtenidas presentaban actividad de IFN, lo que indicaba que se había aislado no una sino 2 proteínas, y la posterior caracterización demostró que esto era verdad. Cuando se trataron estas proteínas con tripsina (enzima que rompe las cadenas de aminoácidos -a.a.- en subunidades en sitios específicos), se obtuvo suficiente cantidad de IFN, se analizó su secuencia de a.a. y se observó que son especies distintas.

Había evidencias de que diferentes preparaciones crudas de IFN presentaban diferente carga eléctrica, pero no se atribuía a diferentes secuencias de a.a. El IFN se conocía como una glicoproteína (proteína que contiene cadenas de carbohidratos enlazadas) y debido a esta característica se atribuía la diferente carga.

Varios autores han demostrado que no todos los IFNs presentan glucosación, por lo que el dogma de que todos los IFNs son glucoproteínas es inválido. Se comprobó entonces que el alfa IFN es una familia de proteínas muy parecidas, como explica su trabajo Nagata (88). Así, el alfa-IFN fue el primero en ser purificado y secuenciado.

Regresando al problema de la obtención de suficientes cantidades de IFN puro con pruebas de pureza, para pruebas clínicas, Pestka y cols. (103) trataron de obtener más por inducción de leucocitos, pero encontraron un método mejor, que se había desarrollado a principios de los años 70's, sobre técnicas de recombinación de ADN, por medio del cual se podía aislar e insertarse un gene de una proteína particular contenida en el ADN dentro de una bacteria (*Escherichia coli*) y ser clonado o replicado en varias copias semejantes y posteriormente expresado: transcribirse en una proteína. Ellos realizaron experimentos para obtener suficientes genes particulares del IFN para estudiar posteriormente la bacteria capaz de fabricar el IFN. Actualmente Pestka y cols. han dado los primeros pasos al respecto. Originalmente comenzaron el proceso de clonación de los genes por medio del aislamiento, a partir de células que producen múltiples proteínas deseadas (IFNs), del ARNm de tal proteína. El ARNm es el ácido nucleico dentro del cual el gene del ADN es traducido por la maquinaria celular para formar o fabricar la proteína.

Se ha optimizado la producción de IFN por medio de ARNm en leucocitos, induciéndolos y preparando posteriormente ADN complementario para el ARN, para acoplarlo al ADN y obtener plásmidos (pequeñas porciones de ADN bacteriano, circulares). Con estos ensayos se obtuvo gran cantidad de plásmidos recombinantes, cada uno acarreando una copia de ADN (ADNc) de varios ARNm de leucocitos inducidos.

Los plásmidos se introdujeron dentro de células de *E. coli*, y clonas individuales, fueron aisladas a partir de las células. El siguiente problema consistió en identificar, en la vasta gama de plásmidos obtenidos, aquellos con ADN codificador del IFN.

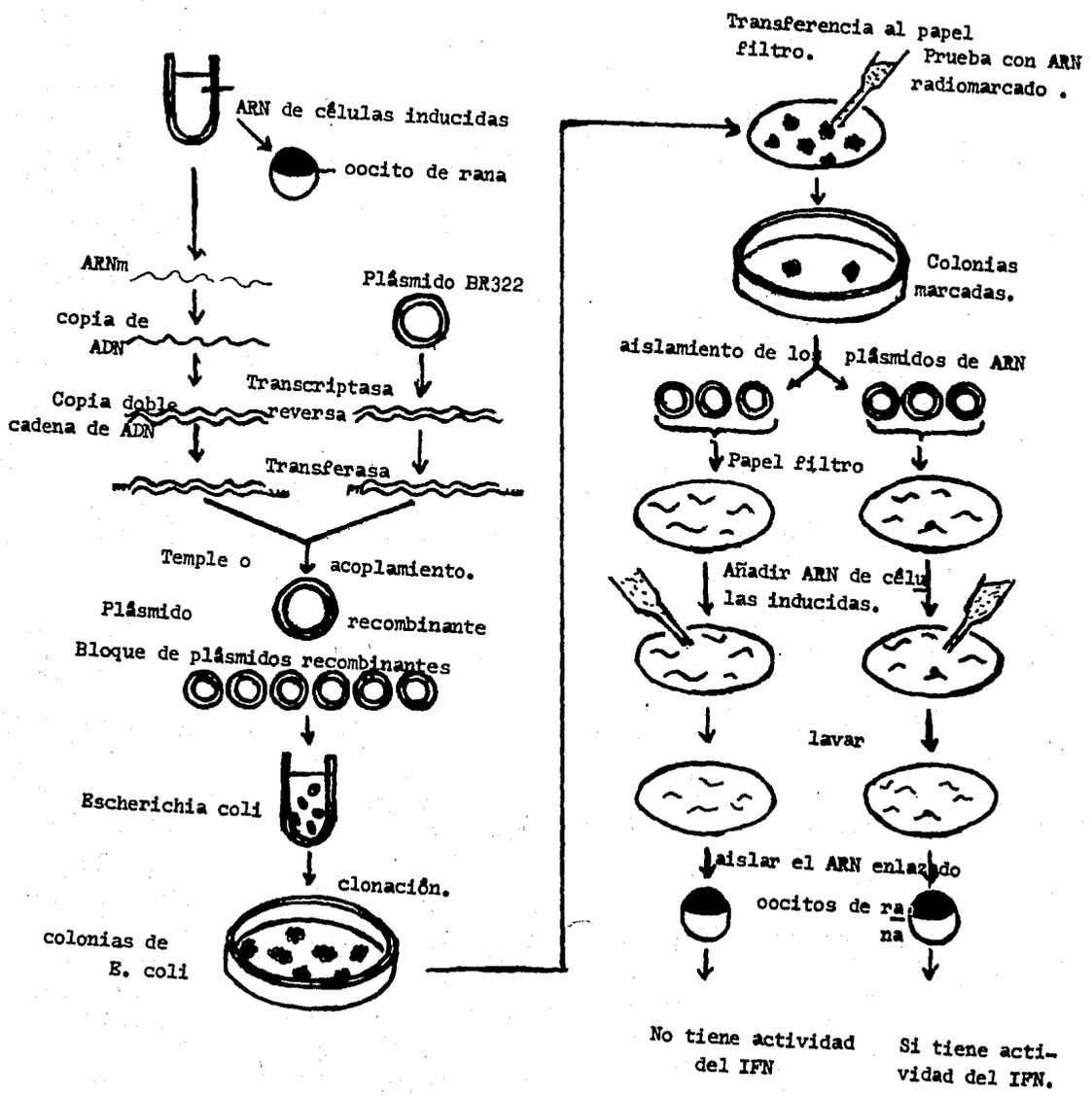
ADN y ARN son cadenas formadas por unidades llamadas nucleótidos, y es la secuencia de ellos la que codifica la información genética. El ARN transcrito por el desdoblamiento del ADN es complementario a él en su respuesta, y si se hibridiza con él nos da dos cadenas con pares enlazados teniéndose una doble cadena. El ARNm del IFN puede marcarse con un isótopo a radiactivo para después buscar el ADN cuya identidad se revela por autoradiografía.

Si se recuerda, los investigadores no tenían ARN puro, ya que comenzaron con una mezcla de ARNs cuya actividad podía demostrarse hasta después de la transcripción del ARN, por lo que emplearon 2 procesos indirectos para obtener el deseado. En primer lugar, ellos hicieron un escrutinio de todas las colonias bacterianas para hallar las que presentaban plásmidos con ADNc a partir del ARN de células inducidas; así descartaron más del 90% de las colonias de bacterias cuyos plásmidos no acarreaban ADNc y por lo tanto no podían codificar IFN.

En el segundo paso se trató de identificar los plásmidos buscados en el 10% restante de colonias, aplicando el ARNm de leucocitos inducidos a lotes combinados de plásmidos de ADN en las colonias. Algunos ADNs que fueron hibridizados con el plásmido de ADN se separaron de esta manera, y los grupos positivos se examinaron clona por clona para confirmar. Finalmente encontraron un recombinante, el plásmido 104, que tiene la mayor secuencia de ADN capaz de codificar para el alfa-IFN humano. Encontraron también otro plásmido, el 101, que lleva la secuencia para el beta-IFN (lo que fue sorprendente, ya que el ARNm se aisló de leucocitos y no de fibroblastos). Por lo que quedó claro que un tipo particular de célula puede fabricar más de un IFN.

El plásmido 104 fue insertado en la E. coli y la bacteria procedió a sintetizar grandes cantidades de IFN humano; la cantidad de IFN por litro de cultivo es comparable a la producida por los leucocitos de 100 donadores de sangre.

CLONACION DEL GEN DEL INTERFERON.



Clonación del Gen del IFN.

La clonación comienza con la inducción de leucocitos para producir IFN. El ARNm de las células es probado en su actividad de IFN en oocitos de rana. Si un lote demuestra actividad de IFN, el ARN es copiado a ADN; se forma una segunda cadena con ADN polimerasa.

El ADN copiado (ADNc, se trata con transferasa terminal para producir terminales fijas, mientras tanto, un vector, el plásmido BR322 es abierto y se sintetizan las partes terminales de la cadena. El ADNc es templado o acoplado con el plásmido de ADN para hacer la terminal fija de plásmidos recombinantes, que se introducen en las células de E. coli. Clonas de células idénticas crecen de células individuales de E. coli.

Para encontrar una clona con los plásmidos que con seguridad acarrean el ADN del IFN las colonias, replicadas en papel filtro, son probadas con ARN marcado radiactivamente obtenido de células inducidas, así, al hibridarse con el ADN permitan identificar el ADN que codifica la producción de la proteína inducida. (IFN).

El plásmido de ADN de las colonias marcadas es segmentado en fragmentos lineales, grupos de ellos se colocan en papel filtro. El ARN de células inducidas se añade entonces y se hibridizan con el ADN codificador de proteínas este ARN se separa del ADN y es probado en oocitos para identificar el plásmido de ADN codificador de IFN .

Se repite el proceso para clonas individuales en los grupos positivos.

El IFN a- leucocitario recombinante, como se ha designado, tiene características similares al producido por las células humanas. En los primeros experimentos sirvió para prevenir algunas infecciones virales, como encefalomiocarditis en monos, antes de que este producto bacteriano se probara en el hombre, ya que primero se tuvo que lograr una rigurosa purificación para remover las proteínas bacterianas contaminantes. Pestka lo hizo por medio de Acs monoclonales. Como sabemos un Ac es una proteína del sistema inmune que reconoce y se enlaza a una proteína extraña o Antígeno (Ag).

Hasta 1975 fue posible preparar grandes cantidades de Acs monoclonales (Acs dirigidos contra un Ag específico). La probabilidad de purificar el IFN obtenido con Acs monoclonales fue probada enlazando los Acs específicos para el interferón en perlas empacadas en columnas de cromatografía; para purificar el IFN bacteriano se coloca el extracto de las células en la columna y sólo el IFN se enlazó a los Acs, los otros componentes, incluyendo las endotoxinas bacterianas se eliminaron de la columna, y luego se pasó a través de la columna una solución ácida para eluir el IFN puro.

La posibilidad de grandes cantidades de IFN disponible, abrió las puertas para los estudios clínicos, ya que el IFN así obtenido libra las principales dificultades como son: el alto costo y escasa obtención; además, se habría la posibilidad de administrar dosis altas al ser lo suficientemente puro. Después de las pruebas animales el producto bacteriano producido por "Hoffmann La Roche Inc." fue aprobado para estudios en humanos en 1981, y Jordan y Gutterman del Hospital Anderson iniciaron los estudios clínicos para establecer la seguridad, toxicidad, y efectos del IFN A recombinante en pacientes con cáncer.

Más de 500 pacientes han sido tratados con este IFN, y los más frecuentes efectos locales observados son similares a los que producía el IFN crudo, dolores musculares, fatiga, anorexia y leves trastornos gastrointestinales; los pacientes parecen desarrollar tolerancia a estas molestias, pero la fatiga y anorexia se incrementan con la dosis y duración del tratamiento.

Hubo disminución de la cuenta de células sanguíneas pero fue regresiva en pocos días, y en pocos casos apareció elevación de las enzimas del hígado pero no ocasionó trastornos en la función hepática.

Muchos estudios han sido llevados a cabo para determinar la efectividad del IFN como antitumoral. En un grupo de pacientes con cáncer avanzado se observó regresión del tumor en casos de cáncer de riñón, melanoma maligno, mieloma múltiple y otros.

El dato más reciente acerca de la aplicación del IFN en estudios clínicos se lleva a cabo en EUA y algunos países europeos, donde a la fecha se aplica como único tratamiento para el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) que es en nuestros días un problema de salud que ha tomado magnitudes importantes. No obstante los estudios aún se encuentran en fase experimental por lo que faltan datos más concretos.

Debe esperarse un poco más de tiempo para dar datos más concretos y seguros ya que falta aún mucho por investigar. En el futuro, se pueden buscar nuevos genes y armar nuevos plásmidos para obtener otros IFNs, que en lo posible nos permitan optimizar sus efectos particulares.

CAPITULO VI.

PERSPECTIVAS EN LOS PROXIMOS CINCO AÑOS. INGENIERIA GENETICA.

A lo largo de los capítulos anteriores nos hemos referido a los diferentes aspectos que conforman el sistema del interferón. Nos resta únicamente mencionar las posibilidades de progreso en esta área, que ha sido de gran interés para un sinnúmero de investigadores a lo largo de casi treinta años.

Como se puede observar, los estudios acerca del IFN son muy vastos, y son muchos los investigadores y países interesados en su producción y empleo para fines terapéuticos, por lo que los estudios son cada vez más profundos y complejos. A lá fecha, se continúa trabajando con las técnicas de ingeniería genética, y se realizan pruebas para optimizar la producción de IFN humano en bacterias y levaduras. Los estudios sobre la genética del IFN están — muy avanzados, ya que a la fecha no sólo se sabe que el cromosoma que contiene los genes que codifican al IFN es el número 5 en su brazo largo, y que en el brazo pequeño del cromosoma se localiza el regulador o modulador de la producción, sino que se tienen ya delimitadas las franjas donde están los genes y ya incluso se ha planteado un modelo sobre la regulación genética - del sistema del IFN.

Con esta información y los resultados, así como los estudios que continúan efectuándose, es probable esperar que en un lapso de unos cuantos años se logre obtener IFN en cantidades costeables para su aplicación a nivel más comercial y no sólo de investigación, como ocurre actualmente en la mayoría de los países, ya que son muy pocos los que cuentan con suficiente producción para que sea aplicado en forma terapéutica y profiláctica a un número elevado de pacientes.

Otro punto muy importante que se encuentra también en fase experimental y seguramente dará datos muy importantes, es su aplicación a los problemas del cáncer, en los que el IFN ha demostrado ser no solamente un inhibidor del crecimiento celular, sino que parece ser un buen profiláctico y ayu

dar a la regresión de los tumores ya declarados. Como ya hemos dicho, son muchas las enfermedades virales en las cuales el IFN ha sido probado; así, enfermedades virales como la hepatitis, encefalomiocarditis, rubeola congénita y otras serán posiblemente más controladas con ayuda del IFN.

Como puede verse, son muchas las posibilidades de aplicación del IFN en la clínica, por lo que es de augurarse que con los experimentos que tienen como finalidad la producción óptima y los que se encaminan a sus usos y efectos, en un futuro próximo se tengan mejores noticias acerca de él. Cabe también mencionar que los estudios respecto a las diferentes especies o tipos de IFN en una misma especie, son un tema que presenta muchas incógnitas

Finalmente, debemos esperar los datos e informaciones más sobresalientes y actuales acerca del IFN en el próximo Congreso sobre el IFN que se llevará a cabo en La Habana, Cuba, donde seguramente se expondrán los hallazgos más importantes en los principales países que trabajan al respecto. En este Congreso se informará de todos los avances que ha ahbido desde la última reunión de 1983, y es muy factible que en él se de una respuesta a varias de las incógnitas que tenemos a la fecha, dado que cuando se realice (1986) habrán pasado tres años y seguramente en ese tiempo han sido terminados muchos de los trabajos que aún estaban en fase de experimentación.

Como un comentario final, debe decirse que el tema aún tendrá mucho que darnos, ya que el IFN es un sistema por demás interesante y complejo, y si pensamos en la amplia gama de posibilidades que nos ofrece, nos da la razón del porqué, pese a haberse descubierto hace ya casi 30 años, aún hay tantos investigadores trabajando para complementar la información sobre el mismo, sin importarles las muchas veces que llegan a la solución de un problema para encontrar uno nuevo. Así pues, es deseable esperar que en los próximos el IFN producirá noticias para los científicos y sobre todo para los enfermos, para quienes representa en muchos casos la única solución a su enfermedad.

BIBLIOGRAFIA.

1. ISAACS A. LINDENMANN J.: Interferon System. Proc. Roy. Soc. B. 147:258 (1957).
2. ISAACS A. Metabolic effects of IFN in chick fibroblast. Virology 10: 144 (1960).
3. Ho M .: Interferons . New Engl. J Med. 266:1258 (1962).
4. CANTELL K. PAUCKER K. Studies on viral interference in two lines of - HeLa cells. Virology 19:81 (1963).
5. JOHNSON T C . MC LAREN L C. Plaque developmente and induction of IFN - synthesis by RMC poliovirus. J Bacteriol. 90:565 (1965).
6. WHEELOCK E F. IFN like virus inhibitor inducer in human leucocytes by phytohemagglutinin . Science 49:310 (1965).
7. MERIGAN T C. GREGORY D F. PETRALI J K.: Physical properties of human IFN prepared in vivo and in vitro. Virology 29: 515 (1966).
8. GHOSH S N .GIFFORD G E.:Effect of IFN on the dinamics of thimidine --- incorporation and thymidine kinase induction in fibroblast cultures. Virology 27:186 (1965).
9. HALLUM J V. YOUNGER J S. STINEBRING W R.:IFN activity associated with high molecular weight proteins. Virology 27:429 (1965).
10. KLEINSCHMIDT W J. MURPLY E B. Investigations of IFN induced by statolon Virology 27:484 (1965).
11. YOUNGER J S. STINEBRING W R. TAUBE S E. : Influence of inhibitors of - protein synthesis on IFN formation in mice. Virology 27:541 (1965).
12. BURKE D C. MORRISON J M.: IFN production in chick embryo cells. The role of DNA. Virology 28:108 (1966).
13. WAGNER R R. HUANG A S.: Inhibition of RNA and IFN synthesis in Krebs- 2 cells infected with vesicular estomatitis virus. Virology 28:1 (1966).

14. ISAACS A. ROTEM Z. FANTES K H . An inhibitor of the production of IFN (blocker). *Virology* 29:248 (1966).
15. YOUNGER J S. STINEBRING W R.: Comparison of IFN production in mice by bacterial endotoxin and statolon. *Virology* 29:310 (1966).
16. MARCUS P.I. SALB J M. Molecular basis of IFN action:inhibition of viral RNA translation. *Virology* 30:502 (1966).
17. VILCECK J.:Potentiation of the action of IFN by extracts of *Escherichia coli*. *Virology* 31:552 (1967).
18. LEVINE S. MAGEE W E. HAMILTON R D. MILLER O V.: Effect of IFN on early enzyme and viral DNA synthesis in vaccinia virus infections. *Virology* 32:33 (1967).
19. TRUDEN J L.SIGEL M M. DIETRICH L S.: An IFN antagonist:its effect of IFN action in mungo- infected Erlich ascites tumor cells. *Virology* 33:95 (1967).
20. MERIGAN T C. FINKELSTEIN M S.: Interferon stimulating and *in vivo* antiviral effects of various synthetic anionic polymers. *Virology* 35: 363 (1968).
21. YOUNGER J S. HALLUM J V.:IFN production in mice by double stranded synthetic polynucleotides:induction or release? *Virology* 35:177 (1968).
22. HALLUM J V.YOUNGER J S. MERIGAN T C.: Molecular species of circulating IFN in mice injected with Newcastle virus. *Virology* 34:802 (1968).
23. DE CLERCQE, DE SOMER P.SCHONNE E; Concentration of IFN by nucleic acid precipitation. *Virology* 37:283 (1969).
- 24.KATO N. EGGERS H J.:A factor capable of enhancing IFN synthesis. *Virology* 37:545 (1969) .
25. BAUSEK G H. MERIGAN T C.: Cell interaction with a synthetic polynucleotide and IFN production *in vitro*. *Virology* 39:491 (1969).
26. HO M. YANG H K.:The mechanism of stimulation of production by a complexed polyribonucleotide . *Virology* 40:693 (1970).

27. CARTER W A.:IFN evidence for subunit structure. Proc. Nat. Acad. Sci. 67:620 (1970).
28. MERIGAN T C.:IFN stimulated by double stranded RNA. Nature 228:219 (1970).
29. TAN Y H. ARMSTRONG J A. HO M.:Intracellular IFN: Kinetics of formation and release. Virology 45:837 (1971).
30. STEWART II W E. DE CLERCQ E. BILLIAU A. DESMYTER J. DE SOMER P.:Increased susceptibility of cells treated with IFN to the toxicity of polyribosinic poly cytidylic acid. Proc. Nat. Acad. Sci. 69:1851 (1972).
31. STEWART II W E. CORDELL B. TAYLOR M W.: Effect of viral double stranded RNA on mammalian cells in culture: cytotoxicity. J. Virol. 12:360 (1973).
32. KLEINSCHMIDT W J.:Biochemistry of Interferon and its inducers. Ann Rev. Biochemistry 41:517 (1972).
33. DE CLERCQ E. STEWART II W E. DE SOMER P.: Poly (rI) more important than Poly (rC) in the IFN induction process by Poly (rI)-Poly (rC). Virology 54:278 (1973).
34. RODGERS R. MERIGAN T C.: IFN production by individual cells. Virology 57:467 (1974).
35. BERMAN B. VILCECK J.:Cellular binding characteristics of human IFN. Virology 57:378 (1974).
36. STEWART II W E.:Distinct molecular species of IFN. Virology 61:80 (1974).
37. DORNER F. SCRIBAM WEIL R.:IFN:evidence for glycoprotein nature. Proc. Nat. Acad. Sci. 70:1981 (1973).
38. HAVELL E D. VILCECK J. FALCOF E. BERMAN B.:Suppression of human IFN production by inhibitors of glycosylation. Virology 63:475 (1975).
39. VENGRIS V E. STOLLAR B D. PITHA P M.: IFN externalization by producing cells before induction of antiviral state. Virology 65:410 (1975).

40. WIEBE M E. JOKIJK T W.:The mechanism of inhibition of reovirus replication by IFN. *Virology* 66:229 (1975).
41. DIANZANI F. BARON S.: Unexpectedly rapid action of human IFN in physiological conditions. *Nature* 257:682 (1975).
42. MARCUS P I. SEKELLICK M J.:Cell killing by viruses. *Virology* 69:378 (1976).
43. PITHA P M. ROWE W P. OXMAN M N.: Effect of IFN on exogenous ,endogenous and cronic leukemia virus infection. *Virology* 70:324 (1976).
44. SEGHAL P B. TAMM I. VILCECK J.:Regulation of human interferon production I and II. *Virology* 70:532). (1976).
45. VENGRIS V E.REYNOLDS F H. HOLLENBERG M D. PITHA P M.: interferon action role of membrane gangliosides . *Virology* 72: 486 (1976).
46. SAMUEL C H E.FARRIS D A.: Mechanism of interferon action: species specificity of IFN. *Virology* 77:556 (1977).
47. HAJNICKA V. FUCHSBERG N. BORECKY L.:Affinity chromatography of mouse -- IFN: a modified purification procedure utilizing specifically purified antibodies. *Acta Virol.* 20:326 (1976).
48. ISHITSUKA H. NOMJRA Y. TAKANO K.: A simple and efficient microassay - method of titration of IFN . *Microbiol. Immunol.* 21: 583 (1977).
49. RATHOVA V. KOCISKOVA D. BORECKY L.:Levels of complement during interferon induction. *Arch. Immunol Ther. Exp.* 25:707 (1977).
50. FRIEDMAN R M.: Antiviral activity of interferon. *Bacteriol Rev.* 41: 543 (1977).
51. MARCUS P I. SEKELLICK M J.: IFN action III. The rate of primary transcription of vesicular stomatitis virus is inhibited by IFN action. *J. Gen. Virol.* 38:391 (1978).
52. KRONENBERG L H.:IFN production by individual cells in culture. *Virology* 76:634 (1971).
53. CANTELL K.: Prospects for the clinical use of exogenous IFN. *Med. -- Biol?* 55:69 (1977).

54. BORECKY L. FUCHSBERG N. HAJNICKA GONDOVA V. CLAMPOR F. ALTANER C.: The cell growth inhibitory effect of IFN. Studies of a resistant cell line. *Neoplasma* 24: 125 (1977).
55. NEUMANN HAEFELIN D. SUNDMACHER R. SKODA R. CANTELL K.: Comparative evaluation of human leucocyte and fibroblast IFN in prevention of herpes simplex virus. *Infect. Immun.* 17:468 (1977).
56. STEWART II W E. :Interferon and their actions. C R C . Press Inc. (1977).
57. ABOUD M. SWOOR R. SALZBERG S.: Effect of IFN on exogenous murine leukemia virus infection. *Virology* 84:134 (1978).
58. HAJNICKA V. FUCHSBERG N. BORECKY L.: Purification of mouse IFN on specific purified immunoadsorbent. *Arch. Inmun Ther. Exp.* 25:619 -- (1977).
59. CANTELL K. HIRVONEN S. Large scale production of human leucocyte IFN containing 10^8 units per ml. *J. Gen. Vir.* 39:541 (1978) .
60. STRANNEGARD O. LARSSON I. LUNDGREEN E. MIORNER H. PERSSON H.: Modulation of immune responses in newborn and adult mice by IFN. *Infect. Immun.* 20:334 (1978).
61. FUCHSBERG N. BORECKY L.: Quantitative immunoelectrophoresis of human interferon, a new approach to characterization of IFN preparations. *Acta virol.* 22:238 (1978).
62. SEHGAL P B. LYLES D S. TAMM I.: Superinduction of human fibroblast IFN production. *Virology* 89:186 (1978).
63. LIN L S. STEWART M. CHUDZIO T. STEWART II W E.:Characterization of -- the size and charge heterogeneties of human leucocyte IFN populations. *Arch Virol.* 56:269 (1978).
64. SCOTT G M. CARTWRIGTH T. LE DU G. DICKER D.: Effects of human fibroblast IFN on vaccination in volunteers. *J. Biol. Stand.* 6873 (1978).
65. STEBBING N. DAWSON K M. LINDLEY I J D.:Requirement for macrophages for IFN to be effective against encephalomyocarditis virus infection. *Infect. Immun.* 19:5 (1978).

66. EMODI G. RUFLI T.:Antiviral action of IFN in man. Use of IFN in varicella zoster in man. Text Rep. Biol Med. 35:511 (1978).
67. HAVELL E A. HAYES T G. VILCECK J.:Synthesis of two distinct IFN by human fibroblast. Virology 89:330 (1978).
68. GREENBERG S B. HARMON N W. JOHNSON P E. COUCH R B.: Antiviral activity of intranasally applied human leukocyte IFN. Antimicrob. Agents — Chemother. 14:596 (1978).
69. STINEBRING W R. CHAPPLE P J.: Human IFN production and clinical use. Adv. Exp. Med. Biol. 110:1-221 (1978).
70. MILES D L. MILES D W. EYRING H.:IFN induction :a conformational hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:1018 (1979).
71. SEHGAL P B. TAMM I.:Two mechanisms contribute to the superinduction of poly(I),poly (C) induced human fibroblast IFN production. Virology 92:240 (1979).
72. MATTHEWS T H J. LAWRENCE M K.:Serum IFN assay as a possible test for - virus infections of man. Arch. Virol. 59:35 (1979).
73. ERSHOV F I. SOKOLOVA T M. TAZULAKHOVA E B.:Comparative analysis of IFN and antiviral protein messenger ARNs. Acta Virol. 23:32 (1979).
74. MORGAN M J. MENY J M.:Susceptibility of various cells treated with IFN to the toxic effect of poly (rI)poly(rC) treatment. Gen. Virol 43:253 (1979).
75. SONNENFELD G. MERIGAN T C.:The role of IFN in viral infections. Semin. Immunopathol. 2:311 (1979).
76. STEWART II W E. LIN L S.:Antiviral activities of IFN. USA Pharmacol. Ther. 6:443 (1979).
77. JAMESON P. GROSSBER G S E.:Production of IFN by human tumor cells. Arch. Virol. 62:209 (1979 †).
78. CEMBRZYNSKA N M. BLACH O Z.:Interferon. Acta.Biol Med Ger. 38: 775 (1979).
79. TAKENAKA H.:The role of IFN in viral infection of the upper respiratory

- tract . Excerpta Médica Secc. 47 11:4 (1980):
80. YONEHARAS. IWAKURA Y. KAWADE Y.:Rapid purification of mouse L cell IFN labeled with radioactive aminoacid by immune precipitation. Virology 100:125 (1980).
 81. SALIT M G. OGBURN C A.:Human leukocyte IFN:Separation of biologically different species by modification of carbohydrate moieties. Arch. -- Virol. 63:133 (1980).
 82. OTTO M J. SEDMAK J J.:Enzymatic modifications of human fibroblast and leukocyte IFNs. J. Virol. 35:390 (1980).
 83. BERG K. HERON I.: The complete purification of human leukocyte IFN. SCand. J. Immunol. 11:489 (1980).
 84. KRIM M.:Towards tumor therapy with IFN in vivo effects. Blood 55:875 (1980).
 85. FAUCONNIER B. RUFFAULT A.:Human spleen°.A new and potent source of -- human IFN. Excerpta Médica Secc. 47 11:272 (1980).
 86. RUBIN B Y. GUPTA S L.:Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:5928 (1980):
 87. BORDEN E C. HAWKINS M J.:Interferons for human neoplastic and viral diseases. Compr. Ther. 6:6 (1980).
 88. NAGATA S. MANTEI N. WEISSMANN CH.:The structure os one of the eight -- or more distinct chromosomal genes for human interferon-alfa. Nature 287:401 (1980).
 89. SEDMAK J J. GROSSBERG S E.: IFN stabilization and enhacement by rare earth salts. J. Gen. Virol. 52:195 (1981).
 90. ALLEN G. FANTES K H.: A family of structural genes for human lymphoblastoid IFN. Nature 287:408 (1981).
 91. DANIEL M D. TAMULEVICH R. BEKESIJG.: Selective antiviral activity of human IFNs on primete oncogenic and neurotropic herpesviruses. Int. J. Cancer. 27: 113 (1981).

92. RUFFAULT A. HEGARRT A. SAUVEGER F. LE DEAUT P.: Experience with the - use of spleens for the production of alfa-IFN. Ann. Virol. 132 E: 115 (1981).
93. BILLIAU A. HEREMANS H. VERVERKEN D.: Tissue ditribution of human IFN after exogenous administration in rabbits, monkeys and mice. Arch. Virol. 68:19 (1981).
94. HAYES T G.: Differences between human alfa (leucocyte) and beta (fibroblast) IFNs. Arch. Virol. 67:267 (1981).
95. GUPTA S L. RUBIN B Y. HOMES S L.: Regulation of IFN action in human fibroblast. Virology 111:331 (1981).
96. FUJITA T. KOHNO S.: Studies of IFN priming:cellular response to viral and nonviral inducers and requirement of protein synthesis. Virology 112:62 (1981).
97. VONK W P. HEKMAN RACP. TRAFMAN J.: Properties of Poly(I).Poly(C) induced mouse L cell IFN. Behav. Brain Res. 3:388 (1981).
98. SEHGAL P B.: Regulation of the stability of human beta IFN RNAm in poly (I).poly(C) induced diploid fibroblast. Virology 112:738 (1981).
99. LENGYEL P.: Biochemistry of Interferon and their action . Ann. Rev. Biochem. 51:251 (1982).
100. WALLACH D.: IFN induced resistance to the killing by NK cells. Cell Immunol. 75:390 (1983).
101. WALLACH D. HAHN T.: Enhanced release of liphotoxins by IFN/ treated - c ells. Cell. Immunol. 76:390 (1983).
102. VANDENBUSSCHE P. KUWATA T. VERHAEGEN LEWALLE M.: Effect of IFN on two human choriocarcinoma derived cell lines. Virology 128:474 (1983).
103. PESTKA S.: The purification and manufacture of human interferons. SCientific American 249:36 (1983).
104. SALVIN S B. RIBI E. GRANGER D' L. YOUNGER J S.: Migration inhibitory - factor and type II IFN in the circulation of mice. J. Immunol. -- 114:354 (1975).

105. RUBINSTEIN M. PESTKA S H.: IFN production in E. coli cell culture. Arch. Biochem. Biophys. 210:319 (1981).
106. VILCEK A. FRIEDMAN . KLEIN E. KRAWAWT.: Cellular Mechanism of IFN production. J. Gen. Virology 56:765 (1970).
107. SOKOLOVA T M. KISIING U. ERSHOV F I.: Nonspecificity action of antiviral proteins.(AVP). Exp. Med. Virology. 85:788 (1978).
108. STEWART II W E. LIN L S.: Antiviral activities of IFN. Excerpta Médica Secc. 47 10:646 (1980).
109. DE MAEYER GUIGNARD J.: Int. messenger RNA: translation in heterologous cells. Nat. Process Sci. 69:1203 (1972).
110. LEE S H S. O'SHAUGHNESSY M V. ROZEE K R.: IFN induced growth depression in diploid human cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139:1438 (1972).
111. ISACCS A. BURKE D C.: Mode of action of IFN. Nature 182:1073 (1958).
112. FRIEDMAN R M.: Effect of IFN treatment on IFN production. J. Immunol. 96:872 (1966).
113. LEVY H B. BUCKLER C E. BARON.: Effect of IFN on early IFN production. Science 152:1274 (1966) .
114. PAUCKER K. BOXACA M.: Cellular resistance to induction of IFN. Bacteriol. Rev. 31:145 (1967).
115. BILLIAU A. JONIAU M. DE SOMER P.: Mass production of human IFN in diploid cells stimulated by Poly I-C. Gen. Virol. 19:11 (1973).
116. LINDHAL P. LEARY P. GRESSER I.: Enhancement by IFN of expression of surface antigens on murine leukemia cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 70:2785 (1973).
117. HO M. AMSTRONG J A.: Interferon. Annual Review Microbiol. 29:131 (1975).
118. ALLEN L B. EAGLE N C. HUFFMAN J H. SHUMAN D H. MEYER R B. SIDWEIL R W. Enhancement of IFN antiviral action in L cells by cyclic nucleotides. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146:580 (1974).

119. BLATT L M. MC VERRY P H. KIM K H.: Regulation of hepatic glycogen synthetase of inhibition of the action of insulin by ouabain. J. Med. Chem. 247:6551 (1972).
120. HORAK I.: JUNGWIRTH C. BODO G.: Poxvirus specific cytopathic effect in IFN treated L-cells. Virology 45:456 (1971).
121. GAUNTT C J. LOCKART R Z. Jr.: Inhibition of mengo virus by IFN. J. Bacteriol. 91:176 (1966).
122. HUANG K Y. ELLIOTT T B.: Enhancement of lethal effects of endotoxins - by IFN inducers. J. Bacteriol 100:1110 (1969).
123. PAUCKER K. CANTELL K. HENLE W.: Quantitative studies on viral interference in suspended L-cells IV. Effect of interfering viruses and IFN on the growth rate of cells. Virology 17:324 (1962)
124. GISLER R H. LINDAHL P. GRESSER I.: Effects of IFN on antibody synthesis in vitro. J. Immunol. 438 (1974).
125. LINDAHL P. LEARY P. GRESSER I. Enhancement by IFN of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 721 (1972).
126. PACHECO D. FALCOFF R. CATMOT L. FLOCK F. WERNER G. FALCOFF E.: Inhibitory effect of IFN on DNA and RNA synthesis in murine spleen cells -- stimulated by lectines. Ann. Immunol. 127:163 (1976).
127. HUANG K Y. DONAHOE R M. GORDON F B. DRESSLER H R.: Enhancement of phagocytosis by IFN containing preparations. Infect. Immunol. 4:581 (1971).
128. BRODEUR B R. MERIGAN T C.: Suppressive effect of IFN in the tumoral response to sheep red blood cells in mice. J. Immunol. 113:1319 (1974).
129. DE MAEYER GUIGNARD J. CACHARD. DE MAEYER F.: Delayed type hypersensitivity to sheep red blood cells: inhibition of sensitization by IFN. Science 190:574 (1975).
130. MERIGAN T C.: Antivirals with clinical potential. J. Infect. Dis. 133:273 (1976).

131. PANKEY G A.:Effects of viruses on the cardiovascular system?
Ann. J. Med. Sci. 250:193 (1965).
132. AVERY R J. NORTON J D. JONES J S. BURKE D C. MORRIS S A G.:IFN inhibits transformation by murine sarcoma viruses before integration of provirus. Nature 288:93 (1980).
133. LAUFS R. STEINKE H. JACOBS C. HILFEN HAUS J. KARGE C H.:Influence of IFN on the replication of oncogenic herpes virus in tissue cultures - and in non human primates. Med. Microbiol. Immunol. 160:285 (1974).
134. KORSANTIYA B M. SMORODINTSEV A.:A transplacental transmission of endogenous IFN in pregnant mice inoculated with influenz a or Newcastle disease viruses. Nature 232: 60 (1971).
135. GRESSER L. TOVEY M G. MAURY C. CHOMOU LINKOV L.:Lethality of IFN preparations for new born mice. Nature 258:76 (1975).
136. ARVIN A M. YEAGER A S. MERIGAN T C.:Effect of leukocyte IFN on urinary excretion of citomegalovirus by infants. J. Infect. Dis. 133:205 (1976).
137. FINTER N B. MC GILL J I. COLLINS P. CANTELL K.:Optimal schedules for use of IFN in the corneas of rabbits with herpes simplex keratitis. J.Infect. Dis. 133:160 (1976).
138. NEUMANN HAEFELIN D. SUNDMACHER R. SCHODA R. CANTELL K.:Comparative evaluation of human leulocyte and fibroblast IFN in the prevention of herpes simplex virus keratitis in a monkey model. J. Inmnanol. 17:468 (1977).
139. OVERALL J C. YEH T J. KERNER.:Sensitivity of herpes simplex virus tipos I and II to three preparations of human IFN. J. Infect. Dis. 142:943 (1980).
140. GONZALEZ R. MARTINEZ J J. BELL L. MARTINEZ M. FRAGA M. SARDINAS J. / LABRADA I. GUTIERREZ E.:Evaluación experimental del IFN leucocitario bovino en terneros inoculados con herpes virus. Congreso Mundial del Interferon . La Habana Cuba (1983).

141. TAKENAKA H.:The role of IFN in viral infection of the upper respiratory tracts. *Excerpta Médica Secc. 47* 11:44 (1980).
142. DIAZ T. DORTICOS R. SELMAN E. PASCUAL M S.:Uso profiláctico de un -- preparado intranasal de IFN en afecciones virales del tracto respiratorio superior. *Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba* (1983).
143. FENNER F J. WHITE D O.:Virología Médica 2a. Edición .
La Prensa Medica Mexicana (1981).
144. LEVY H B. BAER G. BARON S. BUCKER C. GIBBS C J.:A modified polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid complex that induces IFN in primates. *J. Infect. Dis.* 132:434 (1975).
145. BANATVALA J E. POTTER J E. BEST J M.: IFN response to Sendai and Rubella viruses in human foetal cultures leucocytes and placental cultures. *J. Gen Vir.* 13:193 (1971).
146. ARMSTRONG R W. MERIGAN T C.: Varicella zoster virus:IFN production -- and comparative IFN sensitivity in human cell culture. *J. Gen. Virol.* 12:53 (1971).
147. EMODI G. RUFLI T.: Antiviral action of IFN in man :use of IFN in varicella zoster infections in man. *Excerpta Medica Secc. 47* 9.5:293 (1977).
148. WEIMAR W. STITZL BILLIAU A.: Prevention of vaccinia lesions in rhesus monkeys by human leucocyte and fibroblast IFN. *J. Gen. Virol.* 48: 25 (1980).
149. MERIGAN T C. GALLAGHER J G. POLLARD R B. ANVIN A M.: Short-course human leucocyte IFN in treatment of herpes zoster in patients with cancer. *Excerpta Medica Secc. 47* 11.8: 482 (1981).
150. O'REILLY R O. EVERSON L K. EMODI G. HANSEN.: Effects of exogenous -- IFN in citomegalovirus infections complicating bone marrow transplantation. *Clin. Immunol.* 6: 61 (1976).
151. SARMA P S. SHIV G. BARON S. HUEBNER R J.: Inhibitory effect of IFN in murine sarcoma and leukemia virus infections in vitro. *Nature* 22 :845 (1969).

152. SARMA P S. BARON S. HUEBNER R J. SHIV G.: Inhibitory effects of a — synthetic IFN inducer on murine sarcoma and leukemia virus infections in vitro. *Nature* 224: 604 (1969).
153. GRESSER I. COPPEU J. FALCOFF E. FOINTAINES D.: IFN and murine leukemia efficeicy of IFN preparations administered after inoculation of Friend virus. *Nature* 215:174 (1967) .
154. GRESSER I. BOURAGE K.: Inhibition by IFN preparations of a solid malignant tumor and pulmonary metastases in mice. *Nature New Biology* 236: 78 (1972).
155. HELLMANN K. BURRAGE K.: Control of malignant metastases by IFN. *Nature* 224: 273 (1969).
156. BART R S. KOPE A W.: Inhibition of the growth of murine malignant melanoma with synthetic double stranded ribonucleic acid. *Nature* 224: 372 (1969).
157. HAASE A T. KASEL J A. CHESSIN L N.: Adenovirus type 12 oncogenicity in hamsters:the effect of pokeweed mitogen. *J. Immunol.* 101: 806 (1968).
158. SALERNO R A. WHITMIRE C E. GARCIA I M. HUEBER R J.: Chemical carcinogenesis in mice inhibited by IFN. *Nature New Biol.* 239: 31 (1972).
159. CANTELL K. STRANDER H. HADHAZY G Y. NEVANLINNA H R.: How much IFN — can be prepared in human leukocyte suspensions. *Academic Press* N. Y. (1968).
160. FREI E. JAFFEN TATTERSALL M N H. PITMAN S. PARKER L.: New approaches to cancer chemotherapy with IFN. *N Engl. J. Med.* 292: 846 (1975).
161. MATTHEWS T H J. LAWRENCE M K.: Serum IFN assay as a possible test for virus infections of man. *Arch. Virol.* 59:35 (1979).
162. RAMIREZ . GONZALEZ GRIEGO A. LIMONTA M. BARCELONA S. FERNANDEZ N.:Uso del alfa-IFN leucocitario por vía intraperitoneal en humanos. Aspectos farmacocinéticos.. Congreso del IFN Habana Cuba (1983).

163. NESTOR C H. NURIA C. DE LA PEÑA R. LEIGUARDA.: Esclerosis múltiple, tratamiento con Hu IFN alfa. Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba (1983).
164. once M.LIMONTA N. PAZ H. URIARTE E. SELMAN R. ESCOBAR.: Tratamiento de la papilomatosis laríngea juvenil con IFN leucocitario humano. Estudios preliminares. Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba (1983).
165. MATHE G. MISSET J L.: Estudio fase I y fase II con alfa IFN. Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba (1983).
166. MATHE G. MISSET J L.: Estudio fase II con beta- IFN. Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba (1983).
167. SELMAN E. GARCIA G A. ROSAS M. CEPERO M. PENICHER M.: Uso del IFN leucocitario en cáncer de mama como alternativa en los casos que rehusan el tratamiento citostático. Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba (1983).
168. KUPIN V I.: Aplicación del IFN leucocitario humano como terapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama, melanoma y mesotelioma. Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba (1983).
169. LIMONTA M. SELMAN E. RAMIREZ U. LOPEZ P. AGUILERA A. PENTON E. BARCELONA S.: Experiencia general de la aplicación del IFN en enfermedades virales y neoplásicas en Cuba. Congreso Mundial del IFN. La Habana Cuba (1983).
170. STEWART II. LOCKART R Z.: Relative antiviral resistance induced in — homologous and heterologous cells by cross-reacting IFN. J. Virol. 6:795 (1970).
171. BARON S. BARBAN S. BUCKLER C.: Host species specificity of mouse and chicken IFN. Science 145: 814 (1964).
172. STEWART W E. II. DE CLERCQ. DE SOMER P.: Renaturation of inactivated IFNs: requirement for reduction of a major component. J. Gen. Virol. 24: 567 (1974).

173. STOBO J. GREEN I. JACKSON L. BARON S.: Identification of mouse lymphoid cells required for IFN production following stimulation with mitogens. *J. Immunol.* 112:158 (1974).
174. GREEN J. COOPERBAND R. KIBRICK.: Immune specific induction of IFN -- production in cultures of human lymphocytes. *Science* 164: 1415 (1969).
175. MILSTONE L M. WAKSMAN B H.: Release of virus inhibitor from tuberculin sensitized peritoneal cells stimulated by antigen. *J. Immunol.* 105: 1068 (1973).
176. FANTES K H.: Purification and physicochemical properties of IFN in IFN and IFN inducers. Finter N B. Ed. North Holland Amsterdam (1973).
177. STANCEK D. GRESSNEROVA M. PAUCKER K.: Isoelectric components of mouse human and rabbit IFNs. *Virology* 41:740 (1970).
178. DAVEY M W. SULKONSKI E. CARTER W A.: Purification and characterization of mouse IFN with novel affinity sorbents . *J. Virol.* 17:439 (1976).
179. CANTELL K. HIRVONENS. MOGENSEN K E. PYHALA L.: Human leucocyte IFN: production, purification, stability and animal experiments. *In Vitro* 3: 46 (1974).
180. TORMA E T. PAUCKER K.: Purification and characterization of human leucocyte IFN components. *J. Biol. Chem.* 251: 4810 (1976).
181. STEWART W E II. DESMYTER J.: Molecular heterogeneity of human leucocyte IFN: Two populations differing in molecular weight, requirements for renaturation and cross-species antiviral activity. *Virology* 67: 68 (1975).
182. JANKOWSKI W J. DAVEY M W. O'MALLEY S A. SULKOVSKY. CARTER W A.: Molecular structure of human fibroblast and leukocyte IFNs; probe by lectin and hydrophobic chromatography. *J. Virol.* 16: 1124 (1975).

183. PAUCKER K. CANTELL K.: Neutralization of IFN by specific antibody. *Virology* 18: 145 (1962).

184. BERG K. OGBURN C A. PAUCKER K. MOGENSEN K. CANTELL K.: Affinity chromatography of human leukocyte and diploid cell IFN on Shepharose-bound antibodies. *J. Immunol.* 114: 640 (1975).