



32  
Jay  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“ESTUDIO DE LOS EXTRACTOS DE ORGANOS  
(BIOGENOS) SOBRE EL INCREMENTO DE PESO  
Y LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE RATONES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

**FELIPE MEZA MENDEZ**

DIRECTOR DE TESIS: M.V.Z. MSc. CARLOS R. BAUTISTA G.

ASESOR ACADEMICO: MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## R E S U M E N

"Tisuloterapia" (empleo de tejidos con fines terapéuticos). Fue un método empleado a principios de siglo para el tratamiento de diversas enfermedades. Filatov propuso que la utilización de tejidos administrados a un organismo le conferían protección contra patógenos, por lo cual sugirió que estos tejidos poseían actividad biológica terapéutica. Con el objeto de determinar la acción que ejercen los extractos de hígado y bazo de cerdo sobre el incremento de peso y la respuesta inmune humoral de ratones; para lo cual se formaron 4 lotes de 16 ratones cada uno tratándose por lote de la siguiente manera: 4 tratados con 100 ul de extracto de hígado (BH), 4 tratados con 100 ul de extracto de bazo (BB), 4 tratados con PBS pH 7.2 y 4 sin ningún tratamiento. Se les suministraron las dosis subcutáneamente una vez por semana durante tres semanas. Posteriormente se inoculó dosis única IP de eritrocitos de borregos (EB) al 20% (V/V) pH 7.2, sacrificándose a los ratones a 0, 3, 5 y 7 días post inmunización de EB; ensayándose las células formadoras de anticuerpos - Anti-EB (FCE) placas de Cunningham). Al día tres postinmunización con EB se observó el pico máximo en el número de CFP. La media del grupo tratado con BH fue 673 ( $\pm$  104 EE), la de los tratados con BB fue 296 ( $\pm$  53 EE) y la del grupo con PBS 92 ( $\pm$  14 EE). La diferencia en el número de CFP entre los grupos tratados con BH y BB con respecto al tratado con PBS fue altamente significativa ( $P < 0.001$ ). No se observaron diferencias estadísticas con respecto al peso entre los grupos tratados y el testigo. Los resultados de este trabajo sugieren que los extractos de hígado y bazo de cerdo tienen un efecto inmunopotenciador sobre el sistema inmune humoral de ratones, no teniendo efecto sobre el incremento de peso.

	PAGS.
IV.- FACTORES DE CRECIMIENTO COLONIAL	35
a).- Factor de crecimiento epidérmico	
b).- Factor de crecimiento derivado del sarcoma	
c).- Factor de crecimiento derivado de plaquetas	
d).- Factor de crecimiento semejante a la insulina	
e).- Factor de crecimiento del fibroblasto	
V.- OBJETIVOS	41
VI.- MATERIAL Y METODOS	43
VII.- RESULTADOS	46
VIII.- DISCUSION	54
IX.- CONCLUSIONES	57
X.- APENDICE	58
Apéndice I A	
Apéndice II A	
Apéndice III A	
Apéndice IV A	
Apéndice V A	
XI.- LITERATURA CITADA	68

## ABREVIACIONES

Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
BAF	Factor activador de células B
BB	Extracto de bazo de cerdo (biógeno de bazo)
BCG	Bacilo de Calmette-Guerín
BDF	Factor de diferenciación de células B
BH	Extracto de hígado de cerdo (biógeno de hígado)
CFP	Célula formadora de placa
Coa	Concanavalina A
DEAE	Dietilaminoetilcelulosa
DNA	Acido desoxinucleico
EB	Eritrocitos de borrego
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FAL	Factor activador del linfocito
FCCT	Factor de crecimiento de las células T
FGF	Factor de crecimiento del fibroblasto
FTS	Factor tímico sérico
HP-1	Pico 1 cooperador
IGF-1	Factor de crecimiento semejante a la insulina
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
INIFAP - SARH.	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, dependiente de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
IP	Intraperitoneal
IRD	Inmunodifusión radial doble

KHF Factor cooperador de células asesinas  
LAF Factor activador del linfocito  
LPS Lipopolisacárido  
MAF Factor activador de los macrófagos  
MHC Complejo mayor de histocompatibilidad  
MIF Factor inhibidor de la migración de los macrófagos  
MP Proteína mitógena  
MSA Factor de actividad estimulante  
MVE Anhídrido divinil eter maléico  
NK Célula asesina natural  
PBS Solución amortiguadora de fosfatos  
PDGF Factor de crecimiento derivado de las plaquetas  
PHA Fitohemaglutinina  
PPD Derivado purificado de la proteína (tuberculina)  
Q<sub>x</sub> Ubiquinona  
RNA Ácido ribonucleico  
SCIF Factor estimulador de células citotóxicas secundarias  
SDS Dodecilsulfato de sodio  
SGF Factor de crecimiento derivado del sarcoma  
SSF Solución salina fisiológica  
TCGF Factor de crecimiento de células T  
TNF Factor nitrógeno de timocitos  
TRF-III Factor III de reemplazo de linfocitos T  
TRFM Factor de reemplazo de linfocitos T derivado de macrófagos  
TRFT Factor de reemplazo de linfocitos T derivado de cultivos de linfocitos T  
TSF Factor estimulador de timocitos

## I.- INTRODUCCION

### 1.- Semblanza histórica

La "Tisuloterapia" (La doctrina de los estimulantes biógenos), fue un método propuesto por Filatov en el año de 1933 (21), para el tratamiento de diferentes enfermedades el cual adquirió gran difusión en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) y poco, si no es nada, en el mundo occidental.

Fundamentalmente la "Tisuloterapia" consiste en el empleo, con fines terapéuticos, de tejidos que se encuentran en estado de supervivencia, es decir, en proceso de vida disminuida o retardada.

La idea de que tales tejidos conservados posean actividad biológica terapéutica surgió durante la solución de un problema de extraordinaria importancia: la lucha contra la ceguera y la invalidez, consecutivas a la opacidad de la córnea (21).

Inicialmente la realización de un transplante de córnea de un donador a un receptor solucionaba el problema; pero muy pronto, surgió una nueva dificultad: era insuficiente el número de ojos de los que fuese posible extraer una córnea. Además era pequeña la cantidad de ojos extirpados a enfermos con motivo de afecciones graves de este órgano y las córneas de los ojos de los animales no eran utilizables.

Mientras tanto el número de personas que requerían un transplante ascendía en el mundo a varios millones. Surgió entonces la idea de utilizar ojos de cadáveres. Anteriormente algunos oculistas habían empleado la córnea de ojos de cadáveres, pero los resultados no habían sido alentadores, hubo que abordar de una forma nueva este problema; en primer -

término se estableció que no era indispensable extraer el ojo del cadáver inmediatamente después de su muerte, sino que esto podía hacerse - transcurridas algunas horas, con la particularidad que tales órganos pudieran conservarse durante varios días en locales fríos (a la temperatura de 3 a 4°C sobre cero) (21). Secundariamente se comprobó que las - córneas procedentes de cadáveres injertaban magníficamente en los orificios de la opacidad corneal. De esta manera se descubrió una rica fuente de material para injerto de cornea, con lo que la operación pudo practicarse a gran escala.

Por otra parte, se sabía que el crecimiento interrumpido de los cultivos envejecidos podía estimularse de nuevo sembrando en éstos otro - trozo de tejido de la misma especie histológica y zoológica. Se cortaron capas superficiales de la opacidad corneal en un reducido espacio - cerca del injerto enturbiado y se implantó, en el defecto corneal, un nuevo trozo de las capas superficiales de la córnea humana, de similar tamaño. Este método de trasplante dió notables resultados.

Todas las conclusiones obtenidas por Filatov le permitieron hacer la primera generalización importante, que constituyó el fundamento de la hipótesis del tratamiento de tejido separado del organismo para su - transplantación, tanto si es de origen autónomo o heterogéneo (es decir, del propio enfermo, de otro individuo o de otro animal), al ser mantenido a baja temperatura se encuentra en estado de supervivencia (21).

En tales trozos de tejido separados del organismo, se suspende la circulación sanguínea y, por lo tanto, la nutrición de las células; la respiración tisular se dificulta extraordinariamente, se perturba la - inervación y por consiguiente, se altera el trofismo. Además, aunque



la temperatura baja defiende en cierto modo al tejido conservado de la influencia de los microorganismos, inhibe al mismo tiempo todos los procesos bioquímicos que operan en el tejido a temperatura más elevada, - mientras no se separe del organismo. Al encontrarse en este nuevo estado cualitativo y adaptarse a las nuevas condiciones de su existencia, el tejido libera o produce sustancias especiales, que poseen propiedades curativas (21).

Hay muchas razones para admitir que el tejido separado del organismo y conservado en frío se reorganiza bioquímicamente, originando ciertas sustancias que, en las citadas condiciones desfavorables, estimulan sus procesos vitales; por lo que se puede llegar a la siguiente conclusión:

"Cualquier tejido humano o animal, separado del organismo y mantenido en condiciones desfavorables, pero que no causen su muerte, sufre una transformación bioquímica y genera sustancias especiales, los estimulantes biógenos, que mantienen las reacciones vitales de los tejidos que las producen".

## 2.- Tejidos y órganos empleados frecuentemente en la "Tisuloterapia".

Entre los más frecuentemente usados se tienen:

- a. Piel
- b. Músculos
- c. Bazo
- d. Testículo
- e. Cerebro
- f. Nervios
- g. Sangre

- h. Hígado
- i. Cuerpo lúteo
- j. Glándula mamaria
- k. Membrana coroides
- l. Placenta

De los órganos y tejidos antes mencionados se tiene un mayor conocimiento del hígado (67), bazo (21) y hemolizado o sangre (4, 28, 30, 31, 6 y 68).

### 3.- Fundamentos teóricos de la "Tisuloterapia" (21).

Los postulados fundamentales, base teórica del método tisuloterapéutico, se reducen a los ocho puntos siguientes:

a).- Los tejidos animales o vegetales, separados del organismo, al someterse a la influencia de un medio que dificulte sus procesos vitales, sufren una alteración bioquímica, merced a la cual se forman en dichos tejidos sustancias estimulantes de sus procesos bioquímicos. Estas sustancias, que facilitan a los tejidos el mantenimiento de sus procesos vitales en condiciones desfavorables, fueron denominadas por Filatov "Estimulantes biógenos" o más concretamente "Estimulantes de origen biológico".

b).- Los estimulantes biógenos al ser introducidos en un organismo por una u otra vía (implantación de tejidos enriquecidos con ellos o mediante la inyección de sus extractos), activan en éste los procesos vitales. Al incrementar el metabolismo del organismo intensifican sus funciones fisiológicas, aumentan su resistencia los factores patógenos y refuerzan las propiedades regenerativas.

c).- Los estimulantes biógenos también se originan en el cuerpo íntegro durante los procesos de su alteración bioquímica, cuando aquel se

biógenos constituyen, por su naturaleza, seguramente un complejo sistema de sustancias: de ese complejo se han separado algunos componentes que pueden incluirse en los siguientes grupos de ácidos orgánicos:

- i. Al grupo de los ácidos dicarbónicos alifáticos.
- ii. Al grupo de hidroxiácidos dicarbónicos de la misma serie.
- iii. Al grupo de hidroxiácidos y ácidos aromáticos no saturados.
- iv. Al grupo de los ácidos aromáticos de peso molecular elevado.

NOTA: La anterior información fue tomada del libro "La Tisuloterapia" de V.P. Filatov (21), la cual es la única disponible en el mundo occidental sobre los estimulantes biógenos.

## II.- INMUNOMODULACION

El sistema inmune es un sistema homeostático muy complejo formado por una red de células que interactúan entre sí; es esencial para la vida, le permite a los seres vivos preservar su identidad. Para sobrevivir, un organismo necesita distinguir entre las moléculas propias y las extrañas, a fin de aceptar las primeras y rechazar las segundas. En algunos estados, como cuando penetran desde el exterior organismos extraños, o en el curso de mutaciones somáticas, el sistema inmune funciona para descubrir y destruir componentes que podrían lesionar la integridad del organismo. Sin embargo, algunos trastornos del sistema no permite una función óptima y, por lo tanto, la enfermedad maligna o la infección eliminan al organismo. En tales casos es necesario intentar potenciar la función inmune para ayudar al huésped con cáncer u otra enfermedad a combatir la invasión del agente agresor. Pero, como ocurre en la mayor parte de los sistemas biológicos, la inmunidad es una arma de dos filos. Como protege al organismo de invasores extraños, también combate injertos de órganos y médula ósea que pueden estar salvando al paciente en situaciones clínicas que ponen en peligro su vida. En estos casos, el sistema inmune debe suprimirse para permitir que los injertos pasen a formar parte del organismo (3, 18 y 23).

### A).- INMUNOPOTENCIACION.

Una de las modalidades más nuevas y más excitantes en la terapéutica en el campo de la inmunología es la inmunopotenciación. Puede definirse como el aumento de las respuestas específicas o inespecíficas del huésped gracias a una serie de sustancias biológicamente activas.

Los descubrimientos de inmunología básica que han permitido distin-

guir sistemas que operan por la vía de los linfocitos T o linfocitos B, además de una serie de observaciones clínicas, han establecido los conceptos fundamentales de estimular la capacidad del huésped inmunológicamente deprimido para responder a los antígenos tumorales o antígenos de otros agentes infecciosos. Este proceso puede actuar aumentando o restableciendo el sistema inmunológicamente comprometido e incluye mecanismos específicos e inespecíficos y puede utilizar tanto la inmunidad activa como la pasiva. Actualmente se insiste en el empleo de la inmunopotenciación y de la estimulación del sistema inmune del huésped contra su propia neoplasia (3).

#### 1.- Inmunopotenciación específica.

Utilizando el conocimiento de que los tipos celulares que intervienen en las respuestas inmunológicas a antígenos extraños actúan de manera muy específica, se están ensayando métodos que puedan transferir o conferir especificidad inmune al huésped, y utilizarse contra su propio tumor (3, 23).

Aunque se están empleando diversos métodos, todos se hayan en etapa experimental y de ensayo clínico. Entre los materiales utilizados están el factor de transferencia y RNA-inmune. Estas sustancias tienen una ventaja sobre la transferencia adoptiva de células del huésped recuperado al paciente portador de un tumor, pues así se eliminan los problemas de una posible reacción de injerto-contra-huésped, por los linfocitos inmunocompetentes.

##### a).- Factor de Transferencia.

El factor de transferencia es un extracto sin células, producido por la congelación y descongelación de linfocitos, que transfiere hiper-

sensibilidad de tipo tardío, e inmunidad mediada por células de individuos que responden a ciertos antígenos, por ejemplo PPD (sensibles a la tuberculina), a individuos que no pueden hacerlo.

Se ha comprobado que esta transferencia es específica para ciertos antígenos, y no es un efecto inmunoadyuvante. El factor de transferencia fue descrito originalmente por Lawrence en 1950 (18). Se comprobó que era un material que resistía a la DNAasa, termolábil y dializable. Hoy en día se piensa que se deriva de los linfocitos T y actúa sobre ellos para ejercer su acción específica. Los ensayos más prometedores con factor de transferencia se han efectuado para restablecer la inmunidad en enfermedades de deficiencia inmune como el síndrome de - Wiskott-Aldrich y en casos de candidiasis generalizada (18). El uso del factor de transferencia en inmunología tumoral no ha proporcionado ningún éxito real (18). Los experimentos clínicos que sugerían que el factor de transferencia podía ser prometedor incluían preparar el factor de transferencia de un gemelo idéntico sano que respondía a los antígenos tumorales del sarcoma para actuar sobre células tumorales del gemelo que sufría el tumor permitió que sus células fabricaran MIF (factor inhibidor de la migración de los macrófagos) para las células tumorales in vitro después de tres dosis, aunque previamente no había respondido al tumor. Sin embargo, no se comprobó regresión tumoral con tratamiento de factor de transferencia; este punto no se conoce bien y se requieren otras investigaciones (18).

b).- RNA-inmune.

Este mediador específico se obtiene a partir de una extracción fenólica en caliente de linfocitos inmunes. Algunos trabajos sugieren que el RNA puede transferir especificidad inmunológica, se llevaron a cabo

estudios en modelos animales en los que utilizaron linfocitos alógenos para células tumorales, después se extrajo el RNA de estos linfocitos. Estos estudios sugieren que se logra la regresión tumoral en los animales que recibieron RNA-inmune (3). Otros trabajos utilizando RNA-inmune procedente de pacientes con tumores malignos también han sido prometedores. El RNA-inmune se ha preparado de linfocitos de animales que muestran capacidad aumentada de destruir específicamente las células tumorales que se utilizaron como antígeno original. El RNA-inmune es susceptible a la RNasa pero no lo es para la DNasa a las proteasas (3).

## 2.- Inmunopotenciación inespecífica (23).

La utilización de los mecanismos inmunológicos específicos ha brindado un enfoque al parecer útil para los problemas relacionados con enfermedades y neoplasias. Recientemente se ha investigado mucho con materiales que confieren al receptor la capacidad de responder intensamente a antígenos que no muestran reacción cruzada, por ejemplo antígenos tumorales y funcionan como estimuladores inespecíficos o coadyuvantes inespecíficos los que parecen producir sus efectos de diferentes maneras, incluyendo las siguientes:

- Prolongación de la liberación del antígeno. El antígeno inyectado subcutáneamente en emulsiones con agua o con aceite (o sea, adyuvante incompleto de Freud) aumenta netamente la duración de la desintegración del antígeno.

- Desnaturalización del antígeno. Algunos antígenos, en especial las proteínas séricas como las gamma-globulinas, son tolerógenos en su forma natural, pero inmunógenos si se desnaturalizan o se destruyen en partículas.

- Reclutamiento de células reactivas para antígeno. Se desarrollan granulomas a nivel de la inyección del adyuvante y se exponen macrófagos y células linfoides a una elevada concentración de antígeno.

- Proliferación y diferenciación de células inmunológicamente competentes. Un lipopolisacárida (LPS), como ejemplo de un mitógeno selectivo de las células B, o la vitamina A, que aumenta la proliferación de las células en las áreas dependientes de T de los ganglios linfáticos que drenan la zona y otros adyuvantes, probablemente brinden un estímulo inmune general por virtud de su capacidad de estimular la proliferación y la diferenciación de linfocitos.

- Estimulación de la inmunidad mediada por células, además de formación de anticuerpos. Aunque la mayor parte de los adyuvantes no aumenta la hipersensibilidad tardía para los antígenos proteínicos, el adyuvante completo de Freud, en contraste con el incompleto, facilita el desarrollo de tales respuestas contra proteínas séricas.

a. Microorganismos y compuestos de origen microbiano.

El sistema inmune de los animales superiores está rodeado de la presencia de microbios. No es sorprendente, pues, que las estructuras microbianas, especialmente los compuestos de la pared celular, atraigan las respuestas inmunológicas involucrando tanto los mecanismos humorales como los celulares.

Los parásitos microbianos pueden ser clasificados de acuerdo a su localización o ciclos reproductivos en: extracelulares, intracelulares facultativos e intracelulares obligados (75). El primer grupo de organismos (cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos) no poseen la instrumentación bioquímica para escapar de los mecanismos fagocíticos cuando estos han sido fagocitados por las células de defensa. En contraste,



los organismos intracelulares facultativos e intracelulares obligados tienen la capacidad de replicarse dentro de las células e incluso dentro de las células e incluso dentro de los macrófagos no obstante ser fagocitados.

La resistencia contra los organismos no es, pues, producida por la opsonización del organismo invasor, con activación del complemento por parte de las opsoninas y fagocitosis de las mismas mediante el receptor Fc, sino por mecanismos más complejos (23).

i) BCG, Corynebacterium parvum y componentes derivados de las bacterias.

Esta bien establecido el hecho de que en animales infectados con bacilo tuberculoso se despierta un incremento en la resistencia al patógeno Brucella abortus, una bacteria relacionada (18).

Por otro lado, también se han descrito muchas otras reacciones cruzadas que permiten proteger al hospedador de diferentes patógenos (8, 9, 18).

El fenómeno de inmunidad celular adquirida puede ser entendido como un mecanismo de defensa en el cual una clona específica de linfocitos es comisionada para habilitar a los macrófagos a incrementar su potencial microbicida y destruir a patógenos intracelulares y facultativos (51).

Es bien conocido que infecciones con microorganismos intracelulares como por ejemplo el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), Salmonella enteritidis o protozoarios como Besnoitia jellisoni pueden incrementar la resistencia de animales experimentales contra las enfermedades neoplásicas (38).

Además de los organismos de vida intracelular, bacterias destruidas o componentes de la pared celular han demostrado ejercer efectos simila-

res sobre el macrófago in vivo. Esto es, aunque no en una forma clara, Corynebacterium parvum (18), Bordetella pertusis (9), Mycobacterium butyricum (37, 38), o productos microbianos del BCG extraídos con metanol (23) actúan de un modo parecido activando la respuesta inmune contra microorganismos intracelulares iguales al BCG. Todos ellos parece que activan al macrófago por medio de la vía macrófago-linfocito T, presumiblemente con las células T cooperadoras, que son especialmente activadas con los determinantes antigénicos de la preparación microbiana.

Una repetida exposición de la clona surgida de las células T cooperadoras a los antígenos proporcionados por el crecimiento intracelular del parásito o mediante organismos muertos inyectados repetidamente podrían general eventualmente, la necesidad de numerosas señales que traerían consigo la conversión del macrófago en célula con la capacidad de destruir no solo los patógenos intracelulares sino también células tumorales (37, 41).

De una larga serie de experimentos in vitro se puede sospechar que de hecho es el macrófago activado el que después de una apropiada estimulación ejerce el incremento de las propiedades microbicidas restringiendo así la supervivencia y proliferación intracelular del parásito, destruyendo algunas células neoplásicas por un mecanismo extracelular no fagocítico (38, 39, 40, 45).

Ruco y Meltzer (64) presentaron datos que indican que solo los macrófagos jóvenes, positivos a la peroxidasa, son capaces de convertirse en tumoricidas. Además, de acuerdo con estos autores, la máxima activación de los macrófagos para convertirlos en tumoricidas requiere una secuencia de señales (65).

En experimentos con macrófagos peritoneales de ratón in vitro, la primera señal fue producida por los sobrenadantes de linfocitos los cuales eran ricos en factor activador de los macrófagos (MAF). Aunque solamente, después de proveer de una segunda señal por antígenos bacterianos, los macrófagos ejercieron su máximo potencial tumoricida (65).

Usando macrófagos alveolares de ratas, Sone y Filder (73) encontraron que estas células pudieron responder a cualquiera de las dos señales, al MAF al igual que los antígenos bacterianos o incluso solamente al muramildipéptido. No fue necesario un tratamiento combinado de macrófagos con un antígeno bacteriano y con un sobrenadante rico en linfocinas; aunque se observó un efecto sinérgico cuando el MAF fue adicionado a las células junto con o antes del componente bacteriano. La exposición del macrófago al antígeno bacteriano antes del contacto con las linfocinas no resultó en una mayor respuesta del macrófago que la observada después de solo la linfocina. Conjuntamente, estos datos indican que parece ser que por lo menos existen dos vías por las cuales el macrófago puede ser activado: 1) un contacto directo con microbios intracelulares o preparados derivados de tales microorganismos y 2) a través del contacto con linfocinas. La utilización correcta de estas dos vías de activación puede resultar en un efecto sinérgico sobre el macrófago.

El muramildipéptido representa la mínima estructura con la cual se puede subsistir al Mycobacterium bovis o al BCG, aunque, el solo dipéptido no tiene actividad per se sobre el sistema inmune, este puede ser muy efectivo cuando esta conjugado a un acarreador de multi-pili (DL-alanil)-poli (L-lisina) (24) o incorporado a liposomas (74).

Hibbs y colaboradores (41) han demostrado que infecciones crónicas

de ratones con organismos intracelulares por ejemplo: Toxoplasma gondii o Besnoitia jellisoni se incrementa en gran forma la resistencia de los ratones a otros organismos intracelulares pero tiene efecto negativo en las infecciones por bacterias extracelulares, por ejemplo por Streptococcus pneumoniae. Mientras que el Toxoplasma gondii da una protección del 90% al 100% contra parásitos intracelulares, se incrementa la letalidad contra parásitos extracelulares, por ejemplo con Listeria monocytogenes. El porque de estos efectos no es claro.

Se ha informado, por otro lado, que los macrófagos peritoneales de ratones infectados crónicamente con Toxoplasma gondii, Trypanosoma brucei o Besnoitia pueden suprimir las respuestas tanto de linfocitos T como de B (19, 59). Se han descrito algunos mecanismos bioquímicos por los cuales puede atribuirse una influencia supresora del macrófago del macrófago activado sobre la respuesta inmune. Ellos incluyen la síntesis y liberación de prostaglandinas (33, 46), la secreción de interferones (70), la secreción de arginasa (10) y la producción de proteínas de baja densidad, fracciones que inhiben la estimulación de los linfocitos por mitógenos o aloantígenos (18). La relevancia de estos mecanismos in vivo no es bien conocida.

b) Polisacáridos y compuestos relacionados de origen microbiano.

Muchos de los polisacáridos, los cuales han ganado interés como potentes agentes inmunoestimulantes, fueron aislados de levaduras y macromicetos. De las 7 estructuras que los constituyen solo una es el producto de la síntesis enzimática: el beta-2,6-fructano el cual es preparado a partir de la sacarosa. Los otros tienen algunas formas en común; todas tienen 1, 3-beta-D-glucano o mananas como los mayores elementos estructu-

rales. Cuando estas estructuras son suministradas a animales de experimentación, frecuentemente ratones, intraperitoneal o intravenosamente los glucanos protegen a los animales de los efectos letales de muchas infecciones de origen bacteriano, viral o fúngico (16, 52).

Los efectos inmunológicos observados en animales experimentales después de una aplicación oral implica parámetros bioquímicos de activación de macrófagos, inmunidad humoral y proliferación celular tal como es demostrado en un trabajo (17). Se cree que el efecto de estas sustancias es sobre los linfocitos T y los macrófagos.

#### i) Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas tienen una gran variedad de funciones sobre las células de los mamíferos.

Son moléculas complejas constituidas de 3 regiones:

a) Polisacárido O, el corazón.

b) Polisacárido, puente

c) Lípido A (11)

Experimentos recientes han demostrado que el lípido A es el que tiene actividad mitogénica (11).

La actividad mitogénica del LPS sobre los linfocitos B derivados de la médula ósea representa el mayor efecto biológico del LPS sobre la célula involucrada en la respuesta inmune (26, 34). El LPS ha sido identificado como un poderoso adyuvante en la respuesta de anticuerpos (11), aunque, bajo ciertas circunstancias las puede suprimir (11). El LPS es también un potente inmunógeno in vivo puesto que a bajas dosis puede inducir una respuesta específica de anticuerpo (60, 62).

La observación de que la adición del LPS a células esplénicas esti-

mula la secreción de inmunoglobulinas 19S en sobrenadante de cultivos - celulares, combinado con la demostración de un incremento de células con secreción de anticuerpos contra antígenos no relacionados con el LPS - pruebas que el LPS no solamente induce la proliferación de células B sino su diferenciación en células productoras de anticuerpos. Si se eliminan los macrófagos del medio mediante una columna de Sephadex G-10 esto no interfiere en la activación policlonal de células por LPS (42).

Cuando el LPS es administrado algunos días antes a la inyección del antígeno, se observa una depresión en la respuesta de anticuerpos. El mecanismo celular de la supresión de la respuesta inmune por LPS no está bien caracterizado. Resultados experimentales indican que las células B obtenidas de ratones tratados con LPS son capaces de suprimir la respuesta de anticuerpos de células esplénicas normales in vitro (62). Recientemente fue observado que los bazo obtenidos de ratones tratados con LPS contenían poblaciones de células T supresoras (18). Además las células B de ratones tratados con LPS fueron incapaces de cooperar con células T normales en una respuesta in vitro a eritrocitos de borrego (18, 78). Estos resultados claramente enfatizan la complejidad de los mecanismos celulares que operan en la supresión inducida por LPS a la respuesta de anticuerpos.

ii) Bestatina (20, 69, 71).

La Bestatina, un metabolito de bajo peso molecular del Streptomyces olivoreticuli, potencia las respuestas tanto humorales como celulares in vivo e in vitro (6) y tiene un efecto muy fuerte en el control de las metástasis del linfoma murino. La Bestatina parece que induce la actividad tumoricida mediada por el macrófago en los ratones.

La administración oral a pacientes con cáncer aumenta la actividad de las células NK e incrementa el número de células T en sangre periférica. Además la Bestatina parece que induce la liberación de la interleucina-2 (IL-2) de los linfocitos e impide el desorden metabólico que estos pudieran tener al contacto con sustancias agresoras (71).

### iii) Ubiquinonas (5).

Las ubiquinonas son un grupo de benzoquinonas solubles en lípidos las cuales son importantes constituyentes de los sistemas biológicos de óxido-reducción. El número de isoprenos acarreados por un tipo particular de ubiquinonas es expresado como  $Q_x$ , donde el subíndice x indica el número de residuos de isopreno que contiene la ubiquinona. Debido a la liposolubilidad de algunos isoprenos, la solubilidad del agua desciende conforme se incrementa la cadena de los isoprenos.

La ubiquinona  $Q_8$  fue descubierta por Block y cols. (5) y ésta ejerce una fuerte protección a ratones contra infecciones letales de Streptococcus pyogenes, Escherichia coli, E. insidiosa y Salmonella thyphimurium. El efecto protector puede ser correlacionado con un incremento en la depuración de la bacteria patógena de la sangre del ratón infectado. Se cree que su mecanismo de acción es sobre receptores de superficie del macrófago incrementando con esto su poder fagocitario (18).

### c).- Hormonas tímicas (22).

Muchos factores con actividad asociada a las hormonas tímicas han sido aislados y descritos incluyendo a la timosina, factor tímico sérico (FTS) y timopoyetina. La timosina, una hormona tímica, es una mezcla de 7 diferentes dipéptidos con actividad biológica muy variada, promueve la diferenciación de las células T y también puede tener otros efectos sobre la inmunidad mediada por células; las otras hormonas tímicas parecen ser

comparables en actividad pero diferentes en estructuras. Si bien en animales experimentales han demostrado poca o nula toxicidad se han reportado reacciones adversas a la timosina en algunos pacientes (2). Por su baja reactividad se usa frecuentemente la timosina bovina en la inmunoterapia (18).

Los factores tímicos han sido usados muy frecuentemente en pacientes con deficiencias de células T, reportándose en algunos casos mejorías (23).

Basicamente las hormonas tímicas tienen actividad inmunológica pues permiten la conversión de precursores Null o células T (22).

d).- Sustancias anti-virales.

Interferones.

Dada su estructura, origen y función, los interferones se dividen hoy en clásicos o del grupo I, cuya producción se induce por infecciones virales y que se subdividen en alfa, producidos por los granulocitos, y beta secretados por los fibroblastos. El grupo II está representado por un grupo muy similar entre sí: los interferones gamma, que tienen la capacidad de regular la respuesta inmune y que son producidos por los linfocitos T bajo el estímulo antigénico o por mitógenos (27, 63 y 81).

i) El interferón gamma es uno del gran número de mediadores solubles de la inmunidad celular (linfocinas) producido por linfocitos como un resultado del fenómeno de reconocimiento inmune. El término de interferón "tipo II" ha sido propuesto para el interferón inmune debido a que es antigenicamente diferente del interferón inducido por virus o denominado "tipo I" (63).

A pesar de que el mecanismo de acción del interferón o los interfe-



rones no está totalmente esclarecido, sí se conocen algunos aspectos importantes referentes a él. Parece que existen receptores específicos en la membrana celular que permiten que su unión con ello transmita un mensaje al interior de la célula (79).

Basado en su propiedad antiviral, se encontró que el interferón - gamma es 100 veces más activo que el interferón alfa en inducir la activación de las células T o incrementar la población de las células NK (79).  
e).- Compuestos químicos sintéticos.

En contraste con los compuestos de origen microbiano, las sustancias sintéticas con efecto en el incremento de la respuesta inmune pueden ser descritos mediante compendios bastante extensos.

La selección de los compuestos presentados a continuación está basada en dos criterios: la disponibilidad de datos y la calidad de sus resultados inmunológicos.

#### i) Levamisol

El levamisol es un derivado sintético del tetramisol el cual ha sido extensamente usado en medicina humana y veterinaria, ya que ha mostrado tener un poder importante en incrementar la respuesta inmune. Su efecto se ejerce en aquellas circunstancias en las cuales hay una inmunodeficiencia moderada, que puede llevarse a estado normal con el empleo de esta droga. Cuando la respuesta inmune es normal, el empleo del levamisol carece de resultados útiles. De acuerdo con lo anterior el levamisol puede ser considerado como un verdadero inmunomodulador (55).

Estudios recientes sugieren que el metabolito, el DL-2-oxo-3-(2-mercapto etil-) 5-fenil imidazolína, es el compuesto activo sobre el sistema inmune (3).

El mecanismo de acción primario del levamisol puede ser que facilita la participación de los monocitos en las respuestas inmunes celulares (23) aparentemente por un incremento en la quimiotaxis del monocito (18). En suma, ha sido reportado el incremento en la síntesis de DNA de los linfocitos T, al igual que un incremento en sus respuestas proliferativas a mitógenos, también como la producción de mediadores de la inmunidad in vitro (58).

ii) NPT 15392 y NPT 16416.

Las hipoxantinas derivadas del NPT 15392 y NPT 16416 suelen ser mencionadas como moléculas de isoprinosina porque ellas también contienen una purina como principio activo y porque su acción parece ser similar al de la isoprinosina (36). El NPT 15392 es la eritro-9(2-hidroxi-3-nauril)-hipoxantina. En concentraciones entre 0.01 a 0.1 ug/ml el compuesto aumenta la formación de linfoblastos (35). El compuesto también incrementa la respuesta mitogénica de los linfocitos de pacientes con cáncer. El NPT 15392 en dosis de 0.01 a 10 mg/kg podría restaurar las funciones inmunes suprimidas en una variedad de enfermedades del ratón. Los parámetros que se ven alterados después de la depresión son los siguientes: hipersensibilidad retardada, respuesta de linfocito sanguíneo a Concanavalina A (Con A) y el número de células formadoras de placa de bazos de animales con procesos tumorales (35).

Similarmente, en pacientes con cáncer, una sola dosis simple de 0.4 a 0.7 mg/kg incrementa el número de células T al igual que el porcentaje de eritrocitos y rosetas autóloga (marcadores de inmadurez), y los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA) (23).

En NPT 16416 (7,8-dihidrotiazol (3-2-e)) hipoxantina, incrementa la

formación de rosetas de los linfocitos de sangre humana con eritrocitos de borrego a una concentración entre 0.05 a 1ug/ml. El compuesto es presumiblemente clasificado como el único inmunopotenciador con efectos similares a las hormonas del timo (80).

iii) Isoprinosina

La isoprinosina (inosiprex, metisoprino1) es un complejo que tiene inosina y la sal del paracetamino benzoato de  $N_1$ -N-dimetil amino-2-propanol en una relación molar de 1:3 (13).

El compuesto parece que estimula primeramente a los linfocitos T los cuales presentan antígenos  $OK_3^+$ ,  $OKM$  y  $OKT_2^+$  (13, 14). In vitro, la isoprinosina a una concentración de 10ug/ml estimula varios parámetros bioquímicos de los macrófagos como la fagocitosis y la quimiotaxis (12) y permite un incremento de la interleucina 2 (IL-2) y por ende una producción de la respuesta a mitógenos.

La eficacia de la droga depende de la presencia de la inosina. El otro constituyente tiene como finalidad permitir la incorporación de la inosina por el linfocito (13, 14).

iv) Anhídrido divinil éter maléico (MVE).

El MVE es un copolímero que ha sido extensamente estudiado en animales debido a sus propiedades inmunorreguladoras. Este compuesto y una serie de compuestos similares se ha reportado que tienen actividad antitumoral mediante la regulación de las células T, B, macrófago y funciones celulares de las células NK; estos polímeros han mostrado que tienen propiedades antivirales, inducen la producción de interferón, y actúan como adyuvantes para células tumorales y vacunas virales (61). Los pri-

meros polímeros tuvieron gran toxicidad, pero descubrimientos recientes de productos de polímeros han hecho que dicha toxicidad sea eliminada (18).

v) Anzimexon

La azimexona es la 2-(2-ciniridinil-(1)-2-(2-carbamoylaziridinil-(1) )-propano. Este producto nuevo se encuentra en investigación clínica. Se ha reportado que la azimexona a una concentración de 0.001 a 0.01 ug/ml aumenta la proliferación de las células T inducida por PHA y especialmente induce la proliferación de macrófagos mediada por linfoquinas. Puesto que ambas actividades se ven inhibidas a altas concentraciones esto podría permitir especular el hecho de que la inducción de células supresoras pudiera ocurrir (23).

Los efectos farmacológicos observados in vivo incluyen el incremento de la hipersensibilidad retardada, incremento en la destrucción mediada por macrófagos, producción de anticuerpos timodependientes, respuestas linfoproliferativas, inducción de la actividad de las células NK e incremento de la granulopoyesis (18).

vi) Dietiltiocarbamato.

El dietiltiocarbamato sódico ha demostrado incrementar las respuestas mediadas por el linfocito T sin afectar la función de las células B. Cuando es purificado, el compuesto muestra efectos tóxicos en animales solo después de la administración diaria de 200 mg/kg por más de tres meses. Las propiedades inmunopotenciadoras del dietiltiocarbamato en animales experimentales pueden ser resumidas de la siguiente manera: en un gran rango de dosis, el dietilcarbamato permite un incremento en el número de células formadoras de placa. Incrementa la respuesta de los

linfocitos T a Concanavalina A y fitohemaglutinina e hipersensibilidad tardía contra los eritrocitos de borrego. También se ha mostrado que tiene efecto restaurador en animales sometidos a medicamentos inmunosupresores (1).

f).- Derivados de inmunoglobulinas.

i) La tuftsina es un tetrapéptido con remarcable capacidad inmunestimulante, es generada en el suero mediante dos divisiones enzimáticas partiendo de la molécula madre, un inmunoglobulina citofílica y representa 289 de los 292 residuos de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada. La tuftsina acentúa el número de actividades asociadas con el macrófago, el neutrófilo, incluyendo motilidad, fagocitosis, funciones inmunogénicas, aumento de la producción de anticuerpos, actividad bactericida y efectos antitumorales en sistemas de animales (56).

TABLA 1. ALGUNOS INMUNOMODULADORES DE INTERES TERAPEUTICO (23).

C A T E G O R I A	EJEMPLO	POSIBLE MODO DE ACCION
1. Immunopotenciación específica		
a. RNA-Immune	RNA-alogénico RNA-Xenogénico	Estimulación de la inmunidad anti-tumoral mediada por células.
b. Factor de Transferencia	Extracto dializable del leucocito.	Incrementa la inmunidad celular
2. Immunopotenciación inespecífica		
a. Microbiana (adyuvantes)	BCG, C. parvum, LPS, Bestatina, Ubiquinonas	Estimulación de la inmunidad mediada por células y del sistema reticuloendotelial.
b. Hormonas tiroideas	Factor tiroideo, sérico, Timopoyetina, Timosina	Estimulan la maduración y diferenciación de las células pre-T.
c. Compuestos químicos sintéticos	Levamisol NPT15392 NPT16416 Metisoprinol MVE Azimexon Dietiltiocarbamato	Restaura la inmunidad mediada por células Estimula las células T y NK Estimula las células B y T Incrementa la inmunidad celular Estimula la función del inmunocito Estimula a células B y T Incrementa las respuestas mediadas por las células T
d. Sustancias antivirales	Interferón-gamma	Estimula a las células NK y la actividad antiviral.
e. Derivados de Igs.	Tuftsina	Estimula la función del macrófago.

TABLA 1. ALGUNOS INMUNOMODULADORES DE INTERES TERAPEUTICO (23).

C A T E G O R I A	EJEMPLO	POSIBLE MODO DE ACCION
1. Inmunopotenciación específica		
a. RNA-immune	RNA-alogénico RNA-Xenogénico	Estimulación de la inmunidad anti-tumoral mediada por células.
b. Factor de Transferencia	Extracto dializable del Teucoccto.	Incrementa la inmunidad celular
2. Inmunopotenciación inespecífica		
a. Microbiana (adyuvantes)	BCG, C. parvum, LPS, Bestatina, Ubrquinonas	Estimulación de la inmunidad mediada por células y del sistema reticuloendotelial.
b. Hormonas tíficas	Factor tímico, sérico, Timopoyetina, Timosina	Estimulan la maduración y diferenciación de las células pre-T.
c. Compuestos químicos sintéticos	Levamisol NPT15392 NPT16416 Metisoprinol MVE Azimexon Dietiltiocarbamato	Restaura la inmunidad mediada por células Estimula las células T y NK Estimula las células B y T Incrementa la inmunidad celular Estimula la función del inmunocito Estimula a células B y T Incrementa las respuestas mediadas por las células T
d. Sustancias antivirales	Interferón-gamma	Estimula a las células NK y la actividad antiviral.
e. Derivados de Igs.	Tuftsina	Estimula la función del macrófago.

### III.- INTERLEUCINAS

Las linfocinas son glicoproteínas las cuales son secretadas por las células mononucleares y linfocitos como respuesta a un estímulo antigénico. Estas glicoproteínas presentan actividades bioquímicas sobre tres parámetros: crecimiento, diferenciación y funciones efectoras. Realizando dichas funciones de una manera estrictamente localizada o en una forma generalizada, también puede actuar de una manera antígeno específica e inespecífica. El papel que juegan las linfocinas en la diferenciación y función del sistema inmune hoy en día es conocido aunque no del todo. Parece ser cierto que estas sustancias son instrumentos reguladores dentro del sistema inmune (44) y en esta propiedad reside su gran importancia terapéutica. Las concentraciones de estas sustancias en los fluidos sanguíneos o en los fluidos sanguíneos o en los medios de cultivo son tan bajos que su purificación es extraordinariamente difícil (7, 53, 66).

#### a).- Actividad biológica de las interleucinas.

Tradicionalmente se han usado las lectinas concanavalina A (Con A) y fitohemaglutinina (PHA), con el objeto de evaluar la competencia inmunológica de los linfocitos. En estudios recientes in vitro, se ha reconocido la necesidad de un cofactor mitogénico para que funcione la lectina; este factor es producto de la estimulación de una célula accesoria que pertenece a la estirpe de los monocitos-macrófagos. Este factor que es liberado por el estímulo de endotoxina sobre los monocitos-macrófagos y excretado en el medio de cultivo, recibió el nombre de factor activador de linfocitos (FAL), en la actualidad se conoce como interleucina 1 (IL-1). La actividad mitogénica de este producto se midió al ponerlo en contacto con timocitos de ratón no activados, resultando una débil acción mitogénica.



ca, en cambio, al ponerlo en contacto con timocitos activados con ConA, la acción fue extraordinaria. Esta acción sinérgica de IL-1 y timocitos estimulados fue la base para el ensayo de su presencia, así como para reconocer que en el medio que rodeaba a las células mononucleares de la sangre periférica ya estimuladas, contenía otro factor distinto a la IL-1, que permitió el crecimiento en cultivo continuo de células T humanas normales. Este factor inicialmente se llamó de crecimiento de células T (FCCT), posteriormente fue designado como interleucina-2(IL-2) (7).

Por ahora se sabe que la habilidad de una lectina para estimular la mitogénesis de las células T es dependiente de múltiples interacciones celulares, mediada, por lo menos, por dos distintos factores solubles. Una pequeña población de células T cooperadoras, estimuladas simultáneamente con lectina y con IL-1, liberan IL-2. La producción de este factor aumenta marcadamente por la acción fundamental de la interleucina 1 más que por la acción de las lectinas, actuando solas.

En una etapa concomitante requerida para la mitogénesis, una población de linfocitos T adquiere receptores específicos para la IL-2 después de la estimulación con lectina, lo que induce a adquirir una apariencia morfológica blastógena. Estas células blásticas responden a la IL-2 a través de receptores específicos y pueden ser mantenidos en cultivo continuo probando que la IL-2 está presente.

Las interleucinas son, como ya se dijo anteriormente, glicoproteínas; la IL-1 producida por monocitos tiene un peso molecular de 12,000 daltons y un punto isoeléctrico de pH 7.0. La IL-2 humana es producida por los linfocitos periféricos de la sangre. Su peso molecular varía de

13,000 a 16,000 daltons y su punto isoeléctrico es de pH 6.8 (66).

Los estudios más novedosos de la actividad biológica de la IL-1 permiten establecer que este factor puede ser mediador central de ciertos aspectos de la inflamación, tener efecto sobre el sistema nervioso, médula ósea, hígado y tejido conectivo. La actividad pirogénica del llamado pirógeno endógeno es probablemente debida al efecto de la IL-1. Al administrarse por vía intravenosa, la IL-1 estimula y aumenta el número de granulocitos en la sangre periférica y produce un aumento en los niveles plasmáticos del fibrinógeno (66).

Así pues la IL-1 induce muchas de las funciones asociadas con la inflamación: fiebre, granulocitosis (proteína C reactiva, fibrinógeno). La IL-1 es un factor efectivo del crecimiento de los fibroblastos humanos. Los macrófagos han sido bien caracterizados en su papel dentro de la cicatrización de heridas, de tal manera que la IL-1 parcialmente regula la formación del tejido, aumentando la liberación de proteasas de los fibroblastos durante la fase temprana de la reparación tisular. Las células epidérmicas también pueden liberar un mediador con actividad biológica y bioquímica semejante a la IL-1 (66).

La IL-2 tiene como actividades biológicas un efecto mitogénico no específico sobre las células T activadas, habilitada aparentemente para aumentar la respuesta de anticuerpos en los ratones atímicos deficientes de células T y capacidad para inducir células T citotóxicas que pueden ser mantenidas en cultivos continuos en presencia de IL-2, sin perder su citotoxicidad o antigenicidad específica (53). Estos datos indican que la IL-2 no sólo restablece la inmunocompetencia de los sistemas de células T deficientes, sino que puede ser usada para preparar cultivos con-

tinuos de células T, para una caracterización biológica y posiblemente con propósitos terapéuticos. Los cultivos de células citotóxicas con especificidad conocida, pueden tener aplicaciones clínicas, como en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con tumores y que pueden crecer en grandes cantidades en presencia de IL-2. Es posible que se puedan utilizar células citotóxicas administradas por vía endovenosa a los pacientes, con la esperanza de controlar las micrometástasis.

Las interleucinas son moléculas inmunorreguladoras de extraordinaria importancia, la lista de sus actividades biológicas crecerá en un futuro próximo; es posible igualmente que pronto se conozcan sus secuencias de aminoácidos, su sitio activo, la organización sintética de péptidos con actividad semejante a la glucoproteína natural, y su caracterización dentro de la gran familia de potencializadores del crecimiento tisular epidérmico, nervioso, etc. (66).

Es posible utilizar todo este conocimiento en hechos prácticos, midiendo de una forma indirecta la capacidad inmunológica, por medio de la producción de IL-1 por los monocitos-macrófagos o IL-2 por las subpoblaciones de linfocitos T, con objeto de medir sus niveles séricos o en otros líquidos orgánicos, permitiendo comprender el complejo de inmunodeficiencias adquiridas de un huésped determinado que se pueda beneficiar, en un futuro cercano, con la restitución de los factores deficientes que coadyuven a una mejor respuesta.

TABLA 2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA IL-1 (66)

- Producida por macrófagos ( $4 \times 10^6$  macrófagos pueden producir 1 mg de IL-1 en 24 horas).
- No está restringida por MHC.
- No tiene restricción de especie.
- Aumenta la proliferación de timocitos inducida por mitógeno e IL-2.
- Induce la producción de IL-2 y factor quimiotáctico.
- Promueve la diferenciación de linfocitos T.
- Incrementa la estabilidad de las rosetas E.
- Favorece la expresión de receptores para el antígeno.
- Incrementa la reactividad de los linfocitos.
- Aumenta la viscosidad de los lípidos de membrana de células T, con lo que favorece una mayor capacidad de unión con el antígeno.
- Aumenta la proliferación de linfocitos B.
- Promueve la maduración de las células pre-B.
- Incrementa la expresión de receptores de inmunoglobulina y producción de anticuerpos.
- Induce la producción de prostaglandinas por células de la región del centro de fiebre hipotalámico.
- Induce el crecimiento de fibroblastos, así como producción de colágena y prostaglandinas.
- Induce la producción en los hepatocitos, de proteína de fase aguda (amiloide A, fibrinógeno y proteína C reactiva).

SINONIMIAS ASOCIADAS A LA IL-1 (66)

- Proteína mitógena (MP)
- Pico 1 cooperador (HP-1)
- Factor III de reemplazo de linfocitos T (TRF - III)
- Factor de reemplazo de linfocitos T derivado de macrófagos (TFGM)
- Factor activador de células B (BAF)
- Factor de diferenciación de células B (BDF)
- Factor activador de linfocitos (LAF)

**TABLA 3 PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE LA IL-1 (66)**

	<b>Ratón (P<sub>3</sub>88D<sub>1</sub>)</b>	<b>Humano</b>
<b>Naturaleza química</b>	<b>Proteína</b>	<b>Proteína</b>
<b>Peso molecular</b>	<b>12-16 kilodaltons</b>	<b>12-15 Kilodaltons</b>
<b>Puntos isoeléctricos</b>	<b>4.9 - 5.1</b>	<b>5.2, 5.9 y 7.0</b>
<b>Estabilidad en rangos de pH</b>	<b>3.0 - 11.0</b>	<b>3.0 - 11.0</b>
<b>Estabilidad en rangos de temperatura</b>	<b>-70 a 56°C</b>	<b>-70 a 56°C</b>
<b>Sensible al tratamiento con:</b>	<b>Proteasa</b>	<b>Quimiotripsina</b>
	<b>Papaína en presencia de urea 8 M</b>	<b>Pronasa SDS</b>
<b>Contenido de productos de la región I del MHC</b>	<b>no</b>	<b>no</b>
<b>Actividad biológica a concentraciones</b>	<b>10<sup>-10</sup> M</b>	<b>10<sup>-10</sup> M</b>

TABLA 4 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA IL-2 (66)

- Promueve y mantiene cultivos de largo término de células T citotóxicas.
- Estimula la replicación de líneas de linfocitos T murinos.
- Estimula la proliferación in vitro de timocitos en presencia de PHA y Con A.
- Induce la aparición de linfocitos T citotóxicos en cultivos de células de ratones atímicos.
- Estimula la respuesta contra eritrocitos de borrego en cultivos de células de ratones atímicos.
- Promueve el crecimiento de linfocitos T a partir de cultivos de médula ósea.
- Se absorbe en linfocitos T activados.
- Aumenta la citotoxicidad natural de los linfocitos normales.

SINONIMIAS ASOCIADAS A LA IL-2

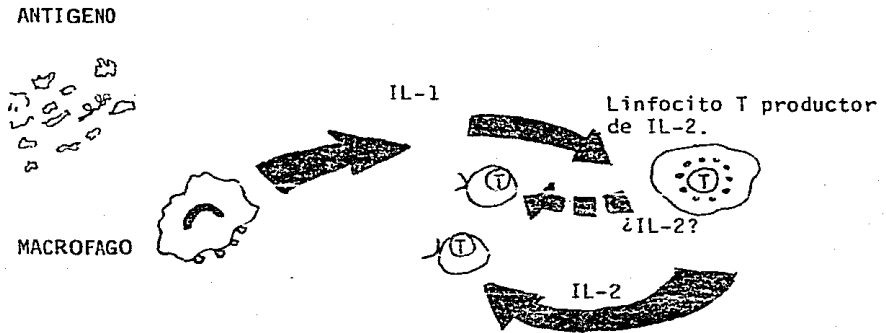
- Factor estimulador de timocitos (TSF).
- Factor mitógeno de timocitos (TMF).
- Factor de crecimiento de células T (TCGF)
- Factor coestimulador.
- Factor cooperador de células asesinas (KHF)
- Factor estimulador de células citotóxicas secundarias (SCIF)
- Factor de reemplazo de linfocitos T derivado de cultivos de linfocitos T (TRFT).

**TABLA 5. PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE LA IL-2 (66)**

	Ratón (LBRM-33)	Rata	Humano
<b>Naturaleza química</b>	<b>Proteína</b>	<b>Proteína</b>	<b>Proteína</b>
<b>Peso molecular</b>	<b>20 - 35 kd</b>	<b>15 - 17 kd</b>	<b>12 - 20 kd</b>
<b>Puntos isoeléctricos</b>	<b>4.3,4.9 y 5.4</b>	<b>5.4 y 5.5</b>	<b>7.0-7.5</b>
<b>Elución salina en DEAE celulosa pH 7.4</b>	<b>0.185 M NaCl</b>	<b>0.05 M NaCl</b>	<b>0.05M NaCl</b>
<b>metil-Sepharosa pH 6.0</b>	<b>0.05 M NaCl</b>	—————	<b>0.225 M NaCl</b>
<b>Sensibilidad a protea- sas (Tripsina, quimio- tripsina, subtilisina, leucina aminopeptidasa)</b>	<b>Si</b>	—————	<b>Si</b>
<b>Sensibilidad a nuclea- sas (DNAasa 1, RNAasa A)</b>	<b>No</b>	—————	<b>No</b>
<b>Sensibilidad a 2-mercapto- etanol</b>	<b>No</b>	—————	<b>No</b>
<b>Estabilidad a temperatura</b>	<b>70° C/15min.</b>	—————	<b>70° C/15 min</b>
<b>Sensibilidad a neuramini- dasa</b>	<b>No</b>	—————	<b>No</b>
<b>Estabilidad en SDS</b>	<b>0.1 %</b>	—————	<b>0.1 %</b>
<b>Estabilidad en urea</b>	<b>6.0 M</b>	—————	<b>6.0 M</b>
<b>Estabilidad en ditrio- treitol 50 nm</b>	<b>Si</b>	—————	<b>Si</b>
<b>Estabilidad en rangos de pH</b>	<b>2.2-10</b>	<b>2.0-9.0</b>	<b>2.2-10</b>
<b>Contenido de productos de la región MHC</b>	<b>No</b>	<b>No</b>	<b>No</b>

FIGURA 1

MODELO DE INTERRELACION ENTRE IL-1 E IL-2  
EN RESPUESTA A UN ANTIGENO ESPECIFICO (60).





#### IV.- FACTORES DE CRECIMIENTO COLONIAL

a).- Factor de crecimiento epidérmico (EGF).

El factor de crecimiento epidérmico fue identificado hace más de 20 años por S. Cohen, con base en una información hecha mientras trabajaban en la purificación de enzimas de las glándulas mandibulares del ratón (32).

Cuando el extracto crudo de un órgano o de una glándula fue inyectado en ratones neonatos, este extracto trajo como resultado la apertura prematura de los ojos al igual que de la erupción dental; estos eventos ocurrieron después de 6 días de nacidos, en comparación de 11 a 13 días con los testigos no tratados. Los datos obtenidos dieron las bases para un bioensayo el cual trajo como resultado la purificación del factor de crecimiento epidérmico del ratón (mEGF).

El mEGF es una cadena polipeptídica simple compuesta por 53 aminoácidos con un punto isoelectrico de 4.6 y un peso molecular de 6045 daltons. Esta presente en las glándulas mandibulares como un complejo de alto peso molecular en el cual la cadena polipeptídica del EGF está unida a una esterase arginina específica por el enlace proteico del  $\text{Ca}^{++}$ . Este enlace proteico esta involucrado en la producción del EGF activo de su precursor de alto peso molecular (9000 daltons) (32).

Con base en estudios de radioinmunoensayo, se ha aislado de la saliva humana un factor con todas las propiedades biológicas del mEGF, el cual ha sido designado como el factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), aunque es capaz de competir de la misma forma que el mEGF por los sitios receptores presentes en el fibroblasto, el hEGF difiere del

mEGF en su reacción con los anticuerpos anti-mEGF pues no presenta - reacción cruzada (32, 47).

Por otra parte se ha observado que la urogastrona y el mEGF tiene similar función pues se ha demostrado que la urogastrona puede inducir la maduración temprana del ojo del ratón neonato y el mEGF puede bloquear la liberación del HCl de la mucosa gástrica, lo que podría hacer suponer que ambos presentan el mismo precursor.

El EGF ha demostrado ser un potente mitógeno de una variedad de células de origen mesodérmico y ectodérmico en cultivo. Las células de origen mesodérmico, que se ven influenciadas por el EGF, son las células de la granulosa, células del endotelio corneal, células del músculo vascular liso, condrocitos y fibroblastos.

Si el EGF es administrado a cultivos antes de que las células pierdan la capacidad de sintetizar DNA y mueran, el EGF permite que el tiempo de vida de las mismas se incremente de una forma considerable no observándose ningún efecto si es administrado después de que la célula deja de producir DNA o muere (32, 47, 77, 80).

b).- Factor de Crecimiento Derivado del Sarcoma.

Carpenter en 1975 y Todaro en 1978 observaron que una variedad de células transformadas por el virus del cáncer murino o felino (MSV), perdían la capacidad para enlazar al EGF a sus receptores de superficie celular, aunque las células transformadas por el virus DNA del sarcoma aviar o infectadas con un virus RNA no transformante mostraron un enlace normal del el EGF. Con base en esta observación, Todaro propuso que el decremento de los niveles del enlace EGF encontrado en las células transformadas por el MSV podría reflejar un efecto indirecto del gene del

virus sobre la síntesis, degradación y localización de los receptores funcionales del EGF. Una posibilidad alternativa es la producción del EGF endógeno o una sustancia relacionada que enlace a los receptores del EGF inducida por las células con MSV (32).

Se ha demostrado que el factor de crecimiento derivado del sarcoma (SGF) en realidad es un grupo de varios polipéptidos que aparentemente tienen los siguientes pesos moleculares 25000, 12000 y 7000 daltons (32). Las características del SGF son las de promover el crecimiento de fibroblastos en una o más capas celulares, por lo que dicho factor podría ser considerado como un carcinógeno por si mismo (32).

c).- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

El cultivo in vitro de muchas células requiere la presencia de suero. Consecuentemente se han hecho muchas investigaciones que tienen como objetivo identificar varios factores en el suero que estimulan el crecimiento celular in vitro. Un importante paso en las investigaciones de factores de crecimiento sin duda ha sido la observación de que el más potente mitógeno presente en el suero es derivado de las plaquetas (57).

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un péptido catiónico con peso molecular de 13,000 daltons (57). Retiene su actividad después de estar en su punto isoeléctrico o haber sido pasado por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Es inactivado por reducción con 2-mercaptoetanol o por digestión con tripsina, tiene actividad biológica a concentraciones tan bajas como  $1\text{ng/ml}$  ( $10^{-10}\text{M}$ ), en cultivo de células BALB/c 3T3. El PDGF es almacenado en los gránulos

alfa de las plaquetas y actúa induciendo la respuesta proliferativa de las células en cultivo de forma análoga a la observada en los fenómenos de coagulación y agregación plaquetaria (57). Por otra parte, algunos investigadores han reportado que el PDGF tiene efectos quimiotácticos sobre los polimorfonucleares (15).

d).- Factor de Crecimiento semejante a la Insulina.

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina o somatomedinas son una familia de polipéptidos los cuales han sido aislados del plasma humano. Estos incluyen: Factor de crecimiento semejante a la insulina IGF1, formalmente conocido como NSILA I, IGF II, somatomedina A, somatomedina C y factor de actividad estimulante (MSA). Todos tienen en común las siguientes propiedades: están constituidos por una cadena polipeptídica simple con un peso molecular de 7,500 daltons, tienen una actividad semejante a la insulina cuando son ensayados en adipocitos in vitro y todos pueden estimular los procesos anabólicos en el cartílago in vitro. Actúan con los receptores para insulina y en el plasma se encuentran asociados a acarreadores de proteínas globulares.

El MSA estimula la oxidación de la glucosa en los adipocitos (células lipoides) in vitro al igual que la incorporación de la uridina y sulfato en cultivo celular. En el cartílago las somatomedinas estimulan un crecimiento generalizado el cual incluye la proliferación de los condrocitos al igual que la síntesis de la colágena y proteoglicanos (32).

El factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) es un péptido que tiene un peso molecular de 13,400 daltons y un punto isoeléctrico de 9.6. Como su nombre lo indica, estos factores muestran efecto mitogéni-

co en cultivos de fibroblasto, al igual que una variedad de células derivadas del mesodermo, incluyendo: granulosa, corteza adrenal, músculo liso vascular y células endoteliales vasculares y corneales (32).

### **H I P O T E S I S :**

Los extractos de órganos de cerdo (hígado y bazo) tienen un efecto inmunopotenciador sobre el sistema inmune humoral; al igual que incrementan el peso corporal al ser suministrados en forma experimental a ratones.

## V. OBJETIVOS

- 1) Determinar el efecto que tienen los extractos de órganos (hígado y bazo de cerdo) sobre el incremento de peso de ratones.
- 2) Mediante pruebas inmunológicas (prueba de Cunningham) estudiar el efecto que tienen los biógenos sobre la respuesta inmune humoral de ratones.

DISERO EXPERIMENTAL (FIGURA 2)  
 EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE HIGADO Y BAZO (BIOGENOS) DE CERDO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DEL RATON

LOTES DE ANIMALES* (ratones hembra de 21 días de edad)	EB <sup>a</sup>	0	3	5	7
			DIAS POST - INOCULACION		
LOTE A (n = 16)					
LOTE B (n = 16)					
LOTE C (n = 16)					
LOTE D (n = 16)					
		0	7	14	15
				18	20
					22

SACRIFICIO Y ENSAYO CFP  
 CFP  
 CFP  
 CFP

D I A S

TRATAMIENTO DE RATONES

\* Los animales se dispusieron por lote (A, B, C y D) de la siguiente manera:

- 4 Tratados con 100ul de extracto de hígado de cerdo (BH) una vez por semana durante tres semanas.
- 4 Tratados con 100ul de extracto de bazo de cerdo (BB) una vez por semana durante tres semanas.
- 4 Tratados con 0.1 ml de PBS pH 7.2 una vez por semana durante tres semanas.
- 4 Sin ningún tratamiento (es decir sin tratamiento con extracto de órgano ni PBS).
- a Se inoculó dosis única de eritrocitos de borrego (EB) 0.2 ml al 20% (v/v) en PBS pH 7.2 por vfa intraperitoneal.

P A R A M E T R O S

Experimento 1

- Respuesta inmune humoral
- 1) Placas hemolíticas de Cunningham (CFP) anti-EP.

Experimento 2

- Incremento de peso.



## VI. MATERIAL Y METODOS

### 1.- Preparación de extractos de órganos.

La preparación se llevó a cabo mediante el método propuesto por V.P. Filatov con modificación hecha por Sardiñas Moreson, la cual es citada con detalle en el apéndice I A (21, 68).

### 2.- Unidades experimentales.

En todos los experimentos fueron empleados ratones hembra de 21 días de edad cepa Balb/c, C 57 ó DBA/2 sanos, obtenidos del bioterio del INIFAP, SARH (Palo Alto, D.F.).

### 3.- Tratamiento de las unidades experimentales.

Se formaron cuatro lotes (A, B, C y D) de 16 ratones cada uno dispuestos de la siguiente manera:

- 4 tratados con 0.1 ml del extracto de hígado de cerdo (BH).
- 4 tratados con 0.1 ml del extracto de bazo de cerdo (BB).
- 4 tratados con 0.1 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 (grupo testigo).
- 4 Sin tratamiento.

El porque de este grupo era controlar al diluyente (PBS) y así evitar o en su caso determinar si el PBS tenía o no acción sobre el incremento de peso o la respuesta inmune humoral.

Los extractos y la solución fueron suministrados subcutáneamente una vez por semana durante tres semanas, midiéndose en cada caso el peso por unidad para un posterior tratamiento estadístico de los datos.

### 4.- Inmunización con eritrocitos de borrego (EB).

Pasado el lapso indicado, fueron inmunizados intraperitonealmente

Los ratones hembra de los lotes A, B, C y D, exceptuando los no tratados, con una dosis única de 0.2 ml de EB al 20% (V/V) en PBS (pH 7.2).

#### 5.- Obtención de células de bazo.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a los 0, 3, 5\* y 7 días postinmunización de EB.

Se les extrajeron los bazos, se determinó la viabilidad celular por la técnica de la exclusión del azul de Tripan (54) y se contaron las células en un hemocitómetro (25) al fin de tener una concentración final ajustada de  $10^6$  células viables/ml la que fue empleada en la prueba de Cunningham (54).

#### 6.- Ensayo de las placas hemolíticas de Cunningham.

Matriz líquida (método del portaobjetos) (54).

El ensayo fue realizado con cada una de las unidades experimentales (n = 64) (ratones hembra) por cuatriplicado, es decir, cuatro veces por cada ratón, según técnica establecida en la literatura con algunas modificaciones (24, 43, 54).

Para una información mas detallada consultar el apéndice V A.

#### 7.- Efecto de los extractos de órganos sobre el incremento de peso.

Con el fin de ver la actividad de los extractos de hígado y bazo de cerdo sobre el incremento de peso se siguió con otro grupo experimental de la misma cepa (n = 64), el mismo tratamiento de las unidades experi-

---

\* Un experimento previo con ratones de la misma cepa, demostró que el día óptimo de respuesta a los eritrocitos de borrego (EB) fue el quinto días postinmunización (Tabla 6 y Figura 3).

mentales del punto 3 de material y métodos, determinándose el peso de cada ratón hembra semanalmente durante 7 semanas y posteriormente los datos obtenidos experimentalmente, se sometieron a tratamiento estadístico.

#### 8.- Análisis estadístico de los datos experimentales.

Se empleó la prueba de significancia de medias, mediante el análisis estadístico de "t" Student; porcentaje de incremento ( $\Delta$  %) del peso promedio por tratamiento (76).

## VII. RESULTADOS

La concentración de proteínas de los extractos de órganos utilizados fue determinada por el método de Lowry (50).

+ hígado 2.5 mg/ml

+ bazo 3.8 mg/ml

### a) Efecto de los biógenos (extractos de hígado y bazo de cerdo) sobre la respuesta inmune humoral (placas de Cunningham).

Los datos mostrados en la tabla 7 y en la figura 4 indican que el día de la inmunización los grupos de los ratones tratados, testigos y sin tratamiento no exhibieron células formadoras de placa (CFP) productoras de anticuerpos anti-EB. Posteriormente, en los días 3 y 5 postinmunización de dosis única de EB al 20% (V/V) en PBS pH 7.2 I.P., fueron observadas diferencias en el número de CFP entre los ratones tratados y los testigos.

Al día 3 postinmunización de EB se observó el pico máximo en el número de células formadoras de placa (CFP/10<sup>6</sup> células viables de bazo/ml).

La media ( $\bar{x}$ ) del grupo tratado con extracto de hígado fue 673 ( $\pm 104$  de error estándar (E.E.)), la de los tratados con extractos de bazo fue 296 ( $\pm 53$  E.E) y la del grupo testigo fue 92 ( $\pm 14$  E.E). La diferencia en el número de CFP entre los grupos tratados con extracto de hígado y bazo con respecto al grupo testigo fue altamente significativa ( $P < 0.001$ ).

Al día 5 postinmunización se observó una respuesta máxima del grupo testigo (tratado con PBS pH 7.2) con una media de 510 ( $\pm 70$  E.E) y un decremento en los grupos tratados con biógeno de hígado 435 ( $\pm 149$  E.E) y

biógeno de bazo 275 ( $\pm$  110 E.E). No observándose diferencias estadísticas. Asimismo al día 7 postinmunización, no se detectaron diferencias estadísticas en ninguno de los grupos (tabla 7).

El pico máximo de respuesta al tercer día postinmunización en el grupo tratado con el extracto de hígado la media fue 673 ( $\pm$  104 E.E) y fue muy semejante a la media presentada por el grupo testigo al quinto día 510 ( $\pm$  70 E.E). Observándose una ligera diferencia estadística ( $P < 0.50$ ).

La respuesta máxima observada con el grupo tratado con extracto de bazo fue al tercer día postinmunización en donde se obtuvo una media de 296 ( $\pm$  53 E.E) y esta fue menor que la presentada al quinto día por el grupo testigo 510 ( $\pm$  70 E.E). Se observó una diferencia estadística altamente significativa ( $P < 0.001$ ).

El porcentaje de mortalidad fue del 0% para todos los grupos experimentales tanto tratados como testigos.

Mediante la técnica de inmunodifusión radial doble no se detectaron títulos de anticuerpos contra los extractos de bazo e hígado de cerdo en los sueros de los ratones tratados.

b) Efecto de los extractos de hígado y bazo de cerdo sobre el incremento de peso de los ratones.

Con base en el modelo experimental empleado y bajo las condiciones de trabajo utilizadas, no fue posible detectar diferencias estadísticas significativas en el promedio  $\pm$  error estándar ( $\bar{x} \pm$  E.E) de los pesos (en gramos) de los ratones hembra tratados con extracto de hígado y bazo de cerdo con respecto al grupo testigo y a los no tratados tablas 8 y 9.

T A B L A 6

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE CELULAS FORMADORAS DE PLACA (PLACAS DE CUNNINGHAM) PARA DETERMINAR EL TIEMPO OPTIMO, EN LOS RATONES UTILIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.

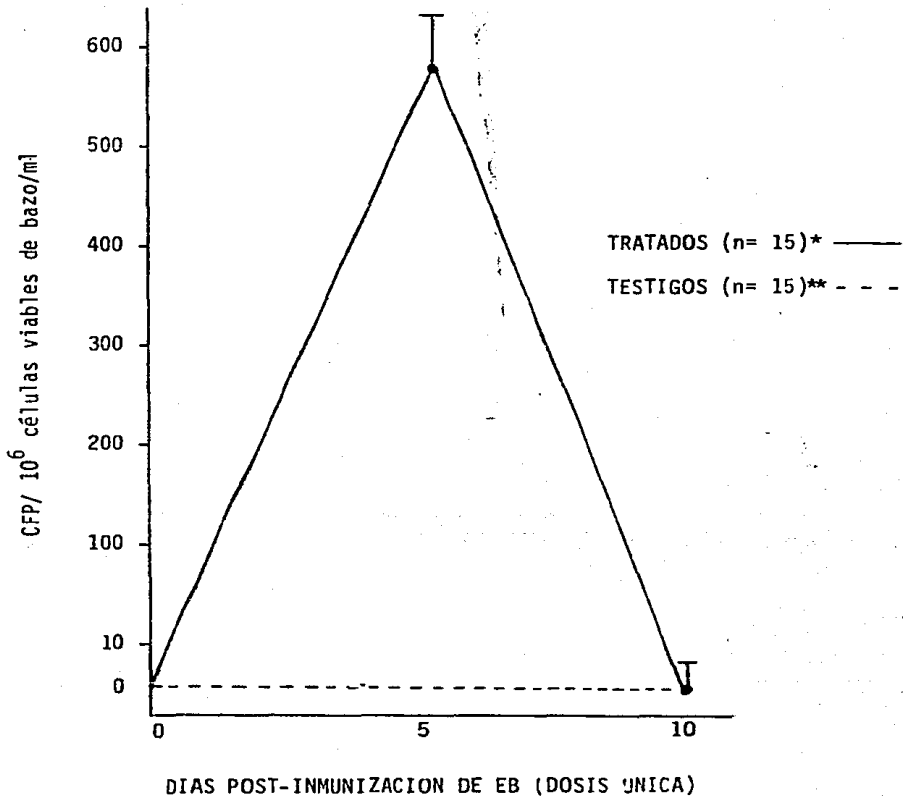
G R U P O	CFP / $10^6$ células viables de bazo/ml	(MEDIA $\pm$ E.F)
	Días post - inmunización	
	0	5
	0	10
RATONES INMUNIZADOS CON EB <sup>a</sup> ( n = 15)	0	597 $\pm$ 57
RATONES TESTIGOS <sup>b</sup>	0	0
		11 $\pm$ 6
		0

a<sup>o</sup> Dosis única de eritrocitos de borrego (EB) 0.2 ml al 20% (v/v) en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 suministrados intraperitonealmente.

b Tratados con 0.2 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2

FIGURA 3

CELULAS FORMADORAS DE PLACA (CFP) DE RATONES HEMBRA INMUNIZADOS  
CON ERITROCITOS DE BORREGO (EB) VIA INTRAPERITONEAL.

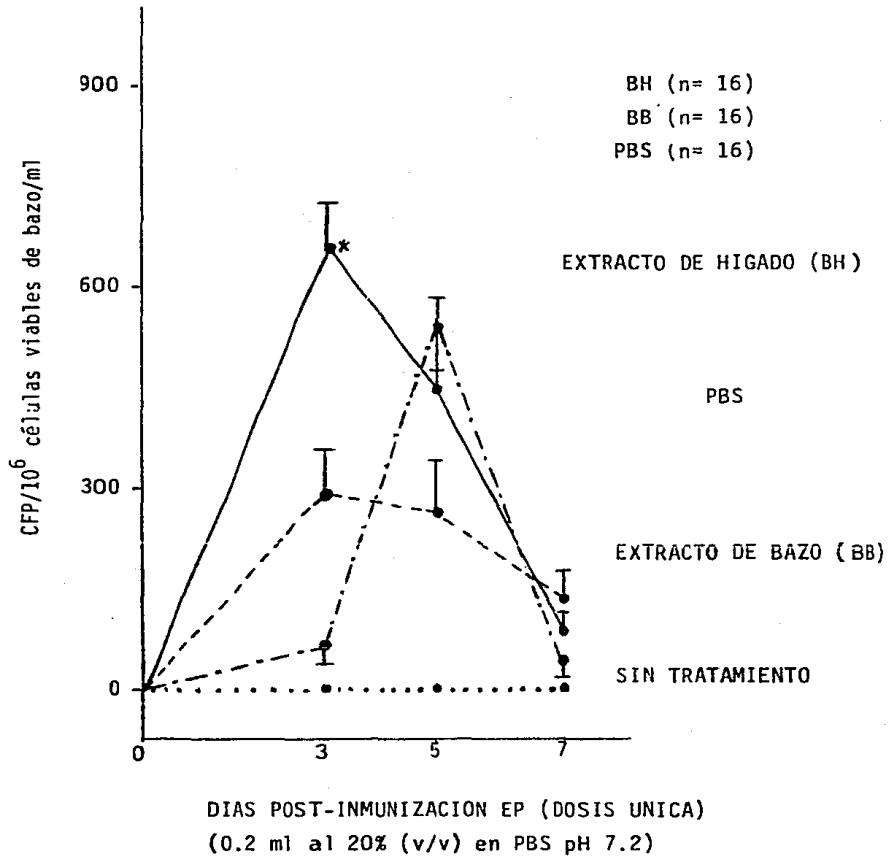


\* EB 0.2 ml al 20% (v/v) en PBS pH 7.2 I.P

\*\* 0.2 ml de PBS pH 7.2 I.P

F I G U R A 4

NUMERO DE CELULAS FORMADORAS DE PLACA EN RATONES HEMBRA TRATADOS CON EXTRACTOS DE HIGADO Y BAZO DE CERDO (BIOGENOS) Y PBS CON RESPECTO AL TIEMPO POST-INMUNIZACION CON ERITROCITOS DE BORREGO (EB).



\* DIFERENCIA ESTADISTICA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA CON RESPECTO AL TESTIGO (P < 0.001).



T A B L A 7

CELULAS FORMADORAS DE PLACA (CFP/10<sup>6</sup> células viables de bazo/ml) ANTI-ERITROCITOS DE BORREGO (EB) EN RATONES HEMBRA TRATADOS CON LOS EXTRACTOS (BIOGENOS) DE HIGADO Y BAZO DE CERDO (PROMEDIO Y ERROR ESTANDAR).

T R A T A M I E N T O	CFP/10 <sup>6</sup> células viables de bazo/ml	(Media ± E.E)
	0	5
	3	7
	Días post-immunización de EB <sup>a</sup>	
EXTRACTO DE HIGADO	0	673 ± 104*
		435 ± 149
EXTRACTO DE BAZO	0	296 ± 53
		275 ± 110
PBS ( TESTIGO ) <sup>b</sup>	0	92 ± 14
		510 ± 70
SIN TRATAMIENTO	0	0
		0
		106 ± 41
		179 ± 35
		71 ± 27

a Dosis única de eritrocitos de borrego (EB) 0.2 ml al 20% (v/v) en PBS pH 7.2 vía I.P.

b Tratados con 0.2 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 7.2).

\* Diferencia estadística altamente significativa con respecto al testigo (P < 0.001)

T A B L A 8

PROMEDIO Y ERROR ESTANDAR DE LOS PESOS (EN GRAMOS) DE LOS RATONES HEMBRA TRATADOS CON LOS EXTRACTOS (BIOGENOS) DE HIGADO Y BAZO DE CERDO CON RESPECTO AL TESTIGO TRATADO CON SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PH 7.2

S E M A N A	( MEDIA $\pm$ ERROR ESTANDARD )		
	EXTRACTO DE HIGADO <sup>a</sup>	EXTRACTO DE BAZO <sup>b</sup>	PBS <sup>c</sup>
0 TRATAMIENTO (BASAL)	10.74 $\pm$ 0.52	11.34 $\pm$ 0.51	10.48 $\pm$ 0.29
1 TRATAMIENTO	14.67 $\pm$ 0.91	15.89 $\pm$ 0.67	15.24 $\pm$ 0.49
2 TRATAMIENTO	18.77 $\pm$ 0.98	18.93 $\pm$ 0.59	18.69 $\pm$ 0.49
3	20.77 $\pm$ 0.86	22.79 $\pm$ 0.54	21.32 $\pm$ 0.49
4	24.10 $\pm$ 0.71	24.81 $\pm$ 0.58	23.3 $\pm$ 0.37
5	25.69 $\pm$ 0.66	25.51 $\pm$ 0.58	24.81 $\pm$ 0.29
6	25.98 $\pm$ 0.61	26.85 $\pm$ 0.60	26.19 $\pm$ 0.36

a y b Tratados con 100ul del extracto correspondiente por vía subcutánea/animal, una vez por semana durante tres semanas.

c Tratados con 0.1 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2. Por vía subcutánea/animal una vez por semana durante tres semanas.

T A B L A 9

PORCENTAJE DE INCREMENTO EN PESO DE LOS RATONES HEMBRA TRATADOS CON LOS EXTRACTOS DE ORGANOS ( BIOGENOS ) DE HIGADO Y BAZO DE CERDO CON RESPECTO AL TIEMPO Y AL TESTIGO TRATADO CON SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PH 7.2 (PROMEDIO Y ERROR ESTANDAR).

S E M A N A	EXTRACTO DE HIGADO <sup>a</sup>		EXTRACTO DE BAZO <sup>b</sup>		PBS <sup>c</sup>
	0		0		
0	TRATAMIENTO	0	0	0	0
1	TRATAMIENTO	35.55 ± 3.91	41.31 ± 4.34	45.38 ± 2.29	
2	TRATAMIENTO	76.98 ± 8.54	69.80 ± 5.80	78.47 ± 2.70	
3		96.39 ± 4.36	105.01 ± 6.85	106.11 ± 7.85	
4		128.48 ± 7.29	123.11 ± 7.35	124.76 ± 6.47	
5		143.94 ± 7.73	129.74 ± 9.11	136.74 ± 6.15	

a y b Tratados con 100ul del extracto concentrado correspondiente por vfa subcutánea por ratón, una vez por semana.

c Tratados con solución salina amortiguadora de fosfatos PH 7.2 0.1 ml por vfa subcutánea/ratón una vez por semana durante tres semanas.

## VIII. DISCUSION

Los resultados del presente estudio indican que el extracto de hígado de cerdo incrementa notablemente la respuesta inmune humoral en ratones durante un corto lapso determinado mediante la técnica de las células - formadoras de anticuerpos lo cual esta de acuerdo con los datos reportados por V.P. Filatov (21).

Tratar de discernir la naturaleza química o el modo de acción de los biógenos es algo por demás complicado y esta fuera en los propósitos de este estudio, lo único que se puede hacer son aproximaciones con base en conocimientos bien establecidos tratando de encontrar una posible correlación entre estos y los biógenos.

Se ha demostrado que existen sustancias de origen bacteriano las cuales tienen efectos inmunopotenciadores sobre el sistema inmune (18, 21). Estas tienen la particularidad de actuar a distintos niveles del sistema inmune y actúan a concentraciones relativamente bajas.

Considerando que el órgano pudiera haber sufrido una contaminación bacteriana, los productos de la degradación podrían estar presentes en el órgano y ser precisamente estos y no el biógeno los que produjeron el efecto mitogénico.

Un constituyente con propiedades inmunorreguladoras bien conocidas es el lipopolisacárido (LPS) el cual se encuentra presente en la pared de las bacterias gram-negativas; se ha mostrado en diferentes experimentos (11, 58, 60), que el LPS al ser suministrado antes que el antígeno (Ag) tiene efectos inmunosupresores impidiendo la respuesta. Si el extracto de hígado hubiese tenido LPS hubiera suprimido la respuesta a los

eritrocitos de borrego lo cual hubiera manifestado un decremento en el número de las células formadoras de placa (CFP), cosa que discrepa con los resultados obtenidos en los cuales se observó un incremento en la respuesta, al menos hasta el tercer día postinoculación de EB, para luego volver a niveles semejantes a los del grupo testigo.

Es bien conocido que existen factores liberados por los linfocitos T llamados interleucinas los cuales tienen un amplio campo de acción en las respuestas inmunológicas: estos actúan a bajas concentraciones ( $10^{-10}$  M) y tienen múltiples funciones ( tablas 2-5).

A primera instancia se podría inferir que los extractos tienen actividad similar a las interleucinas pero esta actividad puede ser descartada por el hecho de que estas son inactivadas a temperaturas superiores a 70°C (66) ya que de acuerdo al método de obtención del biógeno descrito en el apéndice I A, los extractos de hígado son sometidos a 120° C durante una hora sin que por esta razón se pierda su actividad inmunopotenciadora.

Se ha demostrado que existen factores de crecimiento los cuales tienen una gama bastante amplia de funciones entre las cuales destaca su actividad mitogénica sobre células de cultivos celulares y su actividad inmunorreguladora (15). Podría pues existir cierta correlación de éstos con los extractos de hígado, discrepando solamente en que los métodos de obtención de los factores de crecimiento requieren de una tecnología bien establecida, la obtención de los extractos de órganos es sencilla y se puede llevar a cabo en laboratorios modestos no implicando gastos elevados en su obtención.

Llama la atención, el hecho de que el extracto de hígado, dió mejo--

res resultados que el de bazo y que además, provenían de una especie diferente (cerdo) a la tratada (ratón). Esta diferencia en la respuesta inmune observada (tabla 7 y figura 4), se pudo deber, en parte, a que el hígado desempeña cerca de 500 funciones diferentes, algunas de las cuales son de tipo inmunitario (48) y que tiene mayor poder de regeneración que el bazo (48), lo cual implica que el hígado pudiera producir mayor número de sustancias con propiedades estimulantes de ciertas células que el bazo, al ser sometido al proceso descrito por V.P. Filatov (21) para obtener extractos de tejidos.

Por otra parte los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones experimentales empleadas, los extractos de hígado y bazo no tienen efecto sobre el incremento de peso de los ratones, lo cual no es una regla general, pues como es de suponer son muchas las variables que influyen en el experimento por lo que un conocimiento más racional y dirigido podría esclarecer si efectivamente tiene o no actividad alguna sobre el incremento de peso o simplemente podría tratarse de una cuestión de dosis.

Sardiñas en 1985 (67) reporta obtener buenos resultados con el uso del extracto de hígado en el incremento de peso de cerdos y bovinos desnutridos; en apoyo a sus observaciones se encuentran la de numerosos investigadores cubanos los cuales han reportado resultados por demás sorprendentes con el uso de otro producto biológico llamado hemolizado (4, 28, 29, 30, 31, 67 y 68).

## IX. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo confirman que tanto el extracto de hígado como el de bazo activan eficazmente la respuesta inmune humoral. No obstante, el extracto de hígado aumenta de una manera más significativa la respuesta inmune humoral del ratón. El por que de esta diferencia podría deberse a que el hígado tiene un gran poder de regeneración y este poder de regeneración es probablemente el que permita al hígado mantenerse en un estado de supervivencia más prolongado y por ende producir una mayor cantidad de biógeno. Por el contrario el bazo debido a que carece de este poder de regeneración su tiempo de supervivencia en refrigeración va a ser más corto trayendo como consecuencia una menor producción del biógeno.

Los resultados obtenidos muestran que los extractos de hígado y bazo de cerdo no tienen un efecto significativo sobre el incremento de peso de los ratones, aunque por la metodología empleada en el presente estudio no fue posible controlar todas las variables que influyen en este parámetro, por lo cual no se descarta del todo que estos extractos pudieran tener actividad sobre el incremento de peso, lo cual podría ser tema de futuras investigaciones.

El presente estudio demuestra que los biógenos tienen un efecto inmunopotenciador independiente de la especie y da la pauta a seguir para que futuras investigaciones traten de discernir la naturaleza química, el modo de acción y el nivel al que actúan estos extractos lo cual podría contribuir ampliamente en su aplicación con fines terapéuticos y ser una arma de gran utilidad en la lucha contra las enfermedades crónicas causadas por microorganismos y parásitos de los animales y el hombre.

## X. A P E N D I C E I A

### PREPARACION DE EXTRACTOS DE ORGANOS\*

Según V.P. FILATOV (21).

1. El órgano del animal recién sacrificado se colecta, se coloca en un recipiente estéril, se cubre y se conserva durante 7 días a 2-4° C.
2. Un trozo de aproximadamente 100 gramos del tejido, se lava 4 - 5 veces con agua destilada.
3. El trozo se parte en pequeños pedazos, se machaca con el mortero, agregando 10 veces su peso de agua destilada o de SSF y se deja a temperatura ambiente por 1 hora removiéndolo de vez en cuando.
4. Colocar en baño María (70 - 80° C) durante 30 minutos.
5. Filtrar a través de algodón. Hervir el filtrado durante 2 minutos y se vuelve a filtrar a través de papel.
6. Distribuir en ampulas de cristal (u otro recipiente del mismo material) que se cierran a la llama.
7. Esterilizar en autoclave durante una hora a 120° C.  
"Los extractos obtenidos de esta manera están casi libres de proteínas".  
"Los extractos pueden conservarse sin que pierdan su actividad, por lo menos 12 meses".

\* Los órganos que se han estado trabajando son: hígado, bazo y timo. El que ha producido los mejores resultados, en cuanto a ganancia de peso en los animales tratados, es el extracto de hígado (21, 67).



## A P E N D I C E I I A

### PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE CELULAS DE BAZO DE RATON (43).

#### 1.- Material y equipo.

- Ratones cepa Balb/c, C 57 ó DBA/2
- Tijeras de 7 u 8 cm, curvas y rectas, una de cada una
- Cajas de Petri de plástico de 60 x 15 mm
- Jeringas de plástico de 20 ml
- Tubos de centrifuga con tapón de plástico de 15 ml
- Pipetas Pasteur con bulbo del número 1
- Baño de hielo
- Gradillas para tubos de ensayo
- Centrifuga refrigerada
- Vortex
- Tubos de ensayo de 10 x 75 mm
- Mechero Bunsen
- Coladeras pequeñas (de las empleadas para biberones) de plástico
- Embolos de plástico
- Etanol al 70% (v/v) en agua bidestilada
- Buffer de Fosfatos salino (PBS) pH 7.2-0.15 M
- Solución salina balanceada de Hanks' pH 4.2 - 7.4 suplementada con 5% de suero fetal bovino descomplementado (56°C por 1 hora).

#### 2.- Procedimiento.

- a. Sacrificar al ratón por dislocación cervical o inhalación de CO<sub>2</sub>, introducirlo en la caja de Petri la cuál contiene etanol al 70% y humedecerlo por completo.
- b. Poner el ratón boca arriba y practicar una insición longitudinal, localizar el bazo y extirpar el órgano; pasar levemente este por la flama del mechero.
- c. Lavar posteriormente el órgano extirpado con PBS pH 7.2 para eliminar hasta donde sea posible la sangre.

- d. Introducir el órgano en una coladera de plástico pequeña y con la ayuda de un émbolo de jeringa macerar el órgano agregando 2.5 ml de PBS pH 7.2, coleccionar el homogenado en un tubo de ensayo el cual debe encontrarse en un baño de hielo. Lavar con 2.5 ml de PBS pH 7.2 la coladera y el émbolo para evitar la pérdida de células.
- e. Centrifugar la suspensión celular a 4° C por 10 minutos a 220 X g. Transcurrido este tiempo decantar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 5 ml de PBS pH 7.2 frío repetir el paso anterior una vez más.
- f. Decantar el sobrenadante y homogeneizar el paquete con la ayuda del Vortex; agregar 2 ml de agua bidestilada y contar 15 segundos antes de agregar 5 ml de solución salina balanceada de Hanks' (5% de suero fetal bovino). El paso anterior, choque hipotónico, tiene como finalidad eliminar células rojas las cuales pueden interferir en el conteo de células linfoides.
- g. Centrifugar la suspensión celular por 10 minutos a 220 Xg a 4° C, transcurrido este tiempo decantar el sobrenadante y agregar al paquete un volumen exacto de 2 ml, resuspender y almacenar a 4°C hasta su uso.

### 3.- Comentarios.

- Mantener la temperatura entre 2 - 4°C ya que temperaturas superiores afectan la viabilidad de las células linfoides.
- Obtener el órgano lo más asépticamente posible ya que la contaminación bacteriana puede influir en los resultados obtenidos.

## A P E N D I C E III A

### DETERMINACION DE LA VIABILIDAD POR EL METODO DEL AZUL DE TRIPAN (25).

El número o por ciento de viabilidad de células blancas puede ser determinado tiñiendo las poblaciones celulares con azul de tripán diferenciando las células teñidas no viables de las células no teñidas viables. La cuenta debe de ser rápida; además el colorante tiene afinidad por las proteínas, la eliminación del suero del diluyente celular podría permitir una más apropiada determinación de la viabilidad celular.

#### 1.- Material y reactivos.

- Suspensión celular
- Azul de tripán (p/v) en agua bidestilada (0.2%).
- Solución de NaCl 4.5 % (p/v) 5X
- Tubos de ensayo pequeños
- Pipetas serológicas de 1 ml
- Hemocitómetro
- Microscópio con aumento de 40 X

#### 2.- Procedimiento.

- a. El día del uso, mezclar 4 partes del colorante azul de Tripán 0.2% con una parte de solución salina 5 X.
- b. A una parte de la solución anterior adicionar una parte de la suspensión celular (Dilución 1:2).
- c. Poner las células dentro de un hemocitómetro y contar el número de células dentro de un hemocitómetro y contar el número de células blancas no teñidas (viables) y teñidas (no viables) separadamente. Para una mayor exactitud, contar más de un total de

200 células combinadas.

$$\% \text{ de c\acute{e}ls. viables} = \frac{\text{N\acute{u}mero de c\acute{e}lulas viables}}{\text{N\acute{u}mero total de c\acute{e}lulas contadas}} \times 100$$

## A P E N D I C E   I V A

CONTEO DE CELULAS NUCLEADAS OBTENIDAS DE SUSPENSIONES DE BAZO (25, 54).

El siguiente procedimiento es la estandarización de suspensiones celulares de bazo para el ensayo de rosetas.

### 1.- Material y reactivos.

- Suspensión celular
- Hemocitómetro y cubreobjetos
- Microscopio
- Pipetas Pasteur y bulbos de plástico del # 1
- Contadores
- Solución contadora: ácido acético al 3% en agua bidestilada o ácido acético al 3% con 0.01% de violeta de Genciana (Solución de Turks').

### 2.- Procedimiento.

a. Etiquetar dos tubos de 10 x 75 mm A y B pipetear 2.4 ml y 4.9 ml de la solución de Turks' a cada tubo respectivamente.

Al tubo A y B agregar 0.1 ml de la suspensión celular con lo que se tienen las diluciones A 1:25 B 1:50 llevar las suspensiones con micropipeta al hemocitómetro, dejar reposar por dos minutos.

b. Contar los cuatro cuadrados grandes de los globulos blancos. Un mínimo de 200 células debe de ser contado. Determinar el número promedio de células de los cuatro cuadrados grandes.

Este es el número de células por  $1 \text{ mm}^2$  o por  $10^{-4} \text{ cel/ml}$ .

Así que:

Cels./ml = (Número promedio de cels. por cuadrado grande) X

$$10^4 \text{ cels./ml} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

## A P E N D I C E V A

TECNICA DE LAS CELULAS FORMADORAS DE PLACA, PLACAS DE CUNNINGHAM.  
(Matriz líquida, Método del protaobjetos) (54).

No es necesario usar un gel de soporte, como el agar, para los ensayos en placa. Cunningham inicialmente propuso una modificación en la cual las células linfoides y las células rojas indicadoras eran puestas en una microcámara permitiendo su acomodamiento en una monocapa en la base de la cámara (25). El método es simple, económico y sensitivo. Las condiciones son dirigidas para ser favorables a la examinación microscópica de las células formadoras de placa (PFC) y permitiendo la observación de las rosetas y formación de placas por la misma célula. Generalmente considerado a ser el ensayo hemolítico de placas más sensitivo, este método puede también ser adaptado para estudios de micromanipulación.

### 1.- Materiales y reactivos.

#### a. Construcción de las microcámaras

- Portaobjetos de microscopio
- Cinta de doble adhesivo "Scotch" de 2-5 cm de ancho
- Mezcla fundida de iguales partes de cera de parafina y vaselina.

#### b. Ensayo

- Células rojas indicadoras lavadas (EB)
- Suero de cobayo como fuente de complemento
- Suspensión de células linfoides conteniendo células formadoras de placa (CFP)
- Solución salina balanceada de Hanks' pH 7.2 suplementada con

5% de suero fetal bovino.

- Solución 1:1 de metanol absoluto - acetona
- Placas de cultivo celular o placas de microtitulación
- Micropipetas del tipo Eppendorf o similares

## 2.- Procedimiento.

### a. Construcción de microcámaras:

- Lavar los portaobjetos por inmersión de estos en la solución desengrasante de metanol-acetona, limpiarlos con un paño limpio.
- Poner de 10 a 20 portaobjetos en una hilera.
- Poner dos tiras de cinta de doble adhesivo en los extremos de los portaobjetos y una más en el centro.
- Poner los portaobjetos limpios en la superficie de los portaobjetos formando una vía. La profundidad de la cámara es el espesor de la cinta entre los dos portaobjetos. La capacidad por cámara es de aproximadamente 65  $\mu$ l.
- Separar las cámaras así construidas por la flexión de portaobjetos adyacentes.

### b. Ensayo

- Suspender células linfoides conteniendo CFP en solución salina Buffer de Fosfatos pH 7.2 suplementado con 5% de suero fetal bovino, mantener la suspensión en hielo. Diluir apropiadamente la suspensión celular para tener una concentración que de 75 a 100 CFP/cámara.
- Preparar una suspensión de células rojas indicadoras (EB) en solución salina balanceada de Hanks' pH 7.2 (5% de suero

fetal bovino) conteniendo suero de cobayo como fuente de complemento. Esta suspensión consiste de:

0.550 ml de SRBC al 10% (v/v) en solución Buffer de Fosfatos (PBS) pH 7.2

0.300 ml de suero de cobayo concentrado

2.00 ml de solución salina balanceada de Hanks' pH 7.2 conteniendo 5% de suero fetal bovino.

Mantener la suspensión en baño de hielo.

- En una serie de placas de cultivo celular poner a temperatura ambiente 0.4 ml de suspensión de células linfoides ( $10^6$  Cels. viables/ml) y 0.4 ml de la suspensión de células indicadoras. Agitar la mezcla.
- Con la micropipeta poner en cada cámara 65  $\mu$ l, evitar excesos
- Cerrar los extremos de los portaobjetos de la microcámara con cera de parafina e incubar los portaobjetos en la estufa de incubación durante 90 minutos a 37° C
- Las placas hemolíticas son completamente visibles a simple vista pero solo son contadas bajo el microscopio de poco poder con iluminación oblicua.

### 3.- Comentarios.

- a. Calentar o permitir que la temperatura de la suspensión así formada se establezca con la de la cámara antes de llenar esta última; esta precaución puede prevenir la formación de burbujas de aire formadas por la diferencia de temperaturas lo que conduciría a errores experimentales.



- b. La vaselina en la mezcla con parafina ablanda esta así que no rompe y permite que el medio en el interior de la cámara se mantenga hidratado.
- c. No es indispensable que la estufa de incubación tenga un 5% de  $\text{CO}_2$  lo que si es importante que tenga una suficiente cantidad de vapor de agua para impedir que las cámaras se sequen.

## XI. LITERATURA CITADA

- 1.- Amery, W., Renoux, G. (1981). Immunopotentiators I. In: Advances in immunopharmacology, vol. 1. Hadden J., Chedid L., Muller P., Sprafico F. (Eds). Pergamon Press, Oxford, pp. 451-455.
- 2.- Bamzai, A.K., Kretchmer, R.R., Rothberg, R.M., Gotoff, S.S. (1979). Thymosin-induced leukocyte histamina release action in an infant with DiGeorge syndrome. Clin. Immunol. Immunopathol. 14: 70-76.
- 3.- Bellanti, Joseph A. (1978). Immunology II, Saunders W.B. Company, USA.
- 4.- Blanco, C., González Fumero R., Sardiñas, J.M., González, R. (1984). Influencia del hemolizado sobre la ganancia de peso de terneros lactantes. Rev. Salud Anim. 6: 485-489.
- 5.- Block, L.H., Georgopoulos, A., Mayer, P., Drews, J. (1978). Non especific resistance to bacterial infection. Enhancement by Ubi--quinone 8. J. Exp. Med. 148: 1223-1240.
- 6.- Blomgren, H. (1980). Bestatin: A new immonomodulator. Int. Immunopharmacol. 2: 166.
- 7.- Calderón Jaimes, Ernesto. (1984). Actividad biológica de las inter-leucinas. Infectología. 4 (2): 34-35.
- 8.- Clank, I.A., Allison, A.C., Cox, F.F. (1976). Protection of mice against Babesia and Plasmodium with BCG. Nature 359: 309-311.
- 9.- Clark, I.A., Willis, E.J., Richmon, J.E., Allison, A.C. (1977). Suppression of babesiosis in BCG-infected mice and its correlation with tumor inhibition. Infect. Immun. 17: 430-438.

- 10.- Currie, G.A. (1987) Activated macrophages kill tumor cell by releasing arginase. *Nature* 273: 758-759.
- 11.- Chedid, L., Miescher, P.A., Mueller, H.J., Eberhard (1980). *Immunostimulation*. First edition, Springer Verlag (Eds), Berlin Heidelberg, New York. pp. 59-72.
- 12.- De Simone, C., Ricca, D., Lozzi, L. (1982). Influence of methisoprinol on OKT3<sup>+</sup>, OKT4<sup>+</sup>, OKM1<sup>+</sup>, OK1A1<sup>+</sup> cells. *Int. J. Immunopharmacol* 4: 291.
- 13.- De Simone, C., Ricca, D., Sorie, F. (1982). *In vitro* influence of methisoprinol on human eosinophils. *Int. J. Immunopharmacol.* 4: 369.
- 14.- De Simone, C., Meli, D., Sbricoli, M., Rebuzzi, E., Koverech (1982). *In vitro* effect of isosiprex on lymphocyte-T. 1. Influence of T-cells with receptor for IgG (T-gamma). *J. Immunopharmacol.* 4: 139-152.
- 15.- Deuel, Thomas F., Thong, B.D., Haung, J.S. (1985). Platelet-derived growth factor: Structure, function and roles in normal and transformed cells. *Current topics in cellular regulation*, vol. 26. Academic Press. USA.
- 16.- Di Luzio, N.R., Williams, E.L. (1980). Glucan-induced modification of murine viral hepatitis. *Science* 208: 67-69.
- 17.- Di Luzio, N.R., Chichara, G. (1981). Polysaccharides and related substances I. In: *Advances in immunopharmacology*, vol. 1. HaddenJ, Chedid L., Muller P., Spreafico F. (Eds). Pergamon Press, Oxford, pp. 477-484.

- 18.- Drews, J. (1984). Immunostimulation. *Klin. Wochenscher.* 62: 254-264.
- 19.- Eardley, D.D., Jajawardena, A.N. (1977). Suppressor cells in mice infected with Trypanosoma brucei. *J. Immunol.* 119: 1029-1033.
- 20.- Easmon, C.S.F., Gaya, H. (1983). The influence of Bestatin, a small weight immunomodulation in chronic infection caused by - Salmonella typhimurium. *Second International Symposium of Infection in the Immunocompromised Host.* Academic Press. USA pp. 155-160.
- 21.- Filatov, V.P. (1953). La Tisuloterapia (la doctrina de los estimulantes biógenos) Ediciones en lenguas extranjeras, MOSCU, URSS.
- 22.- Friedman, Herman (1975). Thymus factors in immunity. Volume 249, New Kork Academy of Sciences ed. New York. USA. pp. 574.
- 23.- Funderberg, H. Hugh. (1984). Immunostimulation: Syntetic and biological modulators of immunity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 62: 252-464.
- 24.- Galelli, A., Le Garrec, Y., Chedid, L., LeFrancier, P., Derroer, M., Level, M. (1980). Macrophage stimulation in vitro by inactive muramyl dipeptide derivated after conjugation to a multi-poly (DL-alanyl)-poly (L-lisine) carrier. *Infect. Immun.* 28: 1-5.
- 25.- Garvey, J.S., Cremer, N.E, Sussdorf, D.H. (1977). *Methods in Immunology*, 3rd. Edition, W.A. Benjamin Inc. London Amsterdam, Don Mills, Ontario.
- 26.- Gery, I., Waksman, B. H. (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II The Cellular source of potentiating mediators. *J. Exp. Med.* 136: 143.

- 27.- Gifford, G.E., Tobin, J. (1777). Effect to interferon and lymphokines on lymphocytes. Texas reports on biology and medicine. 35: 375.
- 28.- González, R. (1979). Hemolizado, técnica de elaboración. Rev. Salud Anim. 1: 3-7.
- 29.- González, R. (1980). Utilización del hemolizado en la profilaxis de la diarrea aguda del ternero recién nacido. Rev. Salud Anim. 3: 3-13.
- 30.- González, R. (1981). Evaluación del hemolizado como terapia de reconstitución en terneros con síntomas clínicos de desnutrición. Rev. Salud Anim. 3: 15-22.
- 31.- González, R., Blanco, C., Sardiñas, J. (1982). Eficacia del hemolizado en cerdos débiles al nacimiento o durante el período de la lactación. Rev. Salud Anim. 4: 5-10.
- 32.- Gosparadowicz, D. (1981). Growth factors for animal cells in culture a nonimmunoregulatory cell products, vol. 4, Academic Press Inc (Ed) USA.
- 33.- Gordon, D., Bray, M.A., Morley, J. (1976). Control of lymphokine secretion by prostaglandins. Nature 262: 401-402.
- 34.- Greaves, M.F., Janosy, G. (1972). Elicitation of selective T and B lymphocytes responses by cell surface binding ligands. Transplant. Rev. 11: 89.
- 35.- Hadden, J.W., Giner-Sorolla, A. (1981). Isoprinosine and NPT16392. In: Augmenting agents in cancer therapy, Hersch (Ed). Raven Press, New York, pp. 491-522.

- 36.- Hadden, J.W., Wybran, J. (1981). Immunopotentiators II. In: Advances in immunopharmacology, vol. 1, Hadden JW, Chedid L, Mullen P, Spreafico (Eds). Pergamon Press, Oxford pp. 457-468.
- 37.- Hibbs, J.B. (1972). Adjuvant induced resistance to tumor development in mice. Proc. Exp. Biol. Med. 139: 1053-1056.
- 38.- Hibbs, J.B., Lambert, L.H. Remington. V.S. (1972). Possible role of macrophage mediated non-specific cytotoxicity in tumor resistance. Nature 235: 48-50.
- 39.- Hibbs, J.B. (1973). Activated macrophage nonimmunologic recognition target cell factors related to contact inhibition. Science 180: 868 - 870.
- 40.- Hibbs, J.B. (1975). Activated macrophages as cytotoxic effector cell. II Requirement for local persistence of inducing antigen. Transplantation 19: 81 - 87.
- 41.- Hibbs, J.B., Remington, J.S., Stewart, C.C. (1980). Modulation of immunity and host resistance by microorganisms. Pharmacol. Ther. 8: 37-69.
- 42.- Hoffman, M.K., Galanos, C., Koenig, S. Oettingen, H.F. (1977). B-cell activation by lipopolysaccharide. Distinct pathways for induction of mitosis and antibody production. J. Exp. Med. 146: 1640.
- 43.- Hudson, L., Hay, F.C. (1980). Practical Immunology. 2nd edition, Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Boston.
- 44.- Khan, A., Hill, N.O. (1982). Human lymphokines, the biological immune response modifiers. Khan A, Hill NO, (eds). Academic Press,

New York London pp. 733.

- 45.- Krahenbuhl, J.L., Lambert, L.H., Remington, I.S. (1976) Effect of *Corynebacterium parvum* treatment and Toxoplasma gondi infection on macrophage-mediated cytotoxicity of tumor target cells. *Immunology* 32: 837-846.
- 46.- Kurland, J.I., Buckman, R. (1978). Prostaglandin E production by human blood monocyte and mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 147: 952-957.
- 47.- Lage, A., Perez, Rolando., Valdéz, D., Gaviñondo, J. (1985). Estudios sobre el factor de crecimiento epidérmico. III obtención de moléculas EGF equivalentes, a partir de medio condicionado de células L-929. *Interferón y Biotecnología*. 2: (3) 199-211.
- 48.- Lazár, G., Hosztik, E., Ribarski, S. (1986). Regulatory roles of Kupffer cells in immune responses. *Cell in the hepatic sinusoids*. Vol. 1 pp. 47-48.
- 49.- Lee, SHS., Lee, CYL, Rozze, KR. (1982). Production and characterization of human gamma interferon. In: *Human Lymphokine*, Khen A, Hill NO (Eds). Academic Press, New York pp. 303-318.
- 50.- Lowry, O.H. Rosenbrought, N.J., Farrand, A.L., Randal, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- 51.- Mackaness, G.B. (1971). Resistance to intracellular infection. *J. Infect. Dis.* 123: 439 - 445.
- 52.- Mayer, P. Drews, J (1980). The effects of protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* on immunological parameters and expe-

- perimental infections in mice. *Infection* 8: 13 - 21.
- 53.- Merluzzi, U.J., Last-Barney, K (1985). Potential use of human interleukine 2 as an adjuvant for the therapy of neoplasia, immunodeficiency and infection disease. *Int. J. Immunopharmacol.* 7: 31-37.
- 54.- Mishell, B.B., Shiigi, S.M. (1980). Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman and Company. San Francisco, USA.
- 55.- Morse, J.H., White, L.D., Goodman, D.S. (1977). Inhibition of lymphocyte proliferation stimulated by lectins and allogenic cells by normal plasma lipoprotein. *J. Exp. Med.* 146: 1791 - 1803.
- 56.- Najjar, U.A. (1987). Molecular basis of familial andacquired phagocytosis deficiency involving the tetrapeptide, tuftsina. *Exp. Cell. biol.* 46: 114 - 126.
- 57.- Nicola, Nicos A., Vadas, Mathwe. (1984). Hemopoietic colony-stimulating factors. *Immunology Today.* 5: (3) 76-80.
- 58.- Oberling, F., Kotani, S. (1983). Peptidoglycanes In: *Advances in immunopharmacol*, vol. 2. Hadden (Ed). Pergamon Press, Oxford pp. 821-931.
- 59.- Oehler, J.R., Herberman, R.S., Holder, H.T. (1978) Modulation of immunity by macrophages. *Pharmacol. Ther.* 2: 551-593.
- 60.- Parks, D.E. Doyle, M.V., Weigle, W.). (1977). Effect of lipopolysaccharide on immunogenicity and tolerogenicity of H66 in C57B1/6 nude mice evidence a cell deficiency. *J. Immunol.* 119: 1923.
- 61.- Paulidis, N.A., Schultz, R.M., Chirogos, M.A. Letzeler, J. (1978). Effect of maleic anhidride-divynil ather copolimers on experimental



- M 109 metastases and macrophage tumoricidal functions. *Cancer Treat. Rep.* 62: 1817-22.
- 62.- Pearson, V. (1977). Lipopolysaccharide-induced suppression of the primary immune response to a thymus dependent antigen. *J. Immunol.* 118: 789.
- 63.- Rojas, M.W. (1985). *Inmunologia*, 6a. Ed. Fondo Educativo Interamericano. México pp. 131.
- 64.- Ruco, L.P., Meltzer, M.S. (1977). Macrophage activation for tumor cytotoxicity: induction of tumoricidal macrophages by supernatants of PPD-stimulated bacillus Calmette-guérin-induced spleen cell cultures. *J. Immunol.* 119: 884-896.
- 65.- Ruco, L.P., Meltzer, M.S. (1978). Macrophage activation for tumor cytotoxicity: tumoricidal activity by macrophages from C3H/HeJ mice requires at least two activation stimuli. *Cell. Immunol.* 41: 35-51.
- 66.- Santos, A. (1984). Propiedades químicas y biológicas de las interleucinas. *Infectología*. 4: (7) 176-185.
- 67.- Sardiñas, M.J. (1985). Obtención de extractos de órganos. Centro de Salud Animal. manual. CENSA Cuba.
- 68.- Sardiñas, M.J., Blanco, C., González, R. (1984). Efecto de la administración del hemolizado en cerdas sobre el comportamiento perinatal de sus crías. *Rev. Salud Anim.* 6: 13-18.
- 69.- Sedlacek, H.H., Bosslet, K., Dickeite, G., Shorlemmer, H.U. (1983) Immunomodulation by bestatin: phenotypic description of its preclinical action and effectivity. (comunicación personal) 13th International Congress of Chemoterapy. Viena.

- 70.- Schiltz, R.M. Papama, Theakis, D.J., Chirigos, M.A. (1977). Interferon and inducer of macrophage activation by polyanions. *Science* 197: 679-676.
- 71.- Shorlemmer, U.H. (1984). Studies on the mechanism of action of the immunomodulator Bestatin in various screening test systems. *Behring Inst. Mitt.* 74: 157-173.
- 72.- Simon, L.M. Hadden, J.W., Giner-Sorolla, A. (1982) NPT16416: A levamisole-like purine with immunomodulatory effects. Simon LM (Ed) In: *advances in immunopharmacology*, Vol. 2. Pergamon Press, Oxford. pp. 816.
- 73.- Sone, S., Filder, I. J. (1980). Syntetic activation by lymphokines and muramyl dipeptide of tumoricidal proprieties in rat alveolar macrophage. *J. Immunol.* 125: 2454-60.
- 74.- Sone, S., Tsubura, E. (1982) Human alveolar macrophage: potentiation of their tumoricidal activity by liposome encapsulated muramyl dipeptide. *J. Immunol.* 129: 1313-1317.
- 75.- Suter, E. (1976). interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms. *Bacteriol.Rev.* 20: 94 - 132.
- 76.- Swinscow, TDV. (1978). *Statistics at square one*, 4th Ed. publisher by the British Medical Asociation London.
- 77.- Taketani, Y., Oka, T. (1983). Epidermal growth factor stimulates cell proliferation and inhibits functional differentiation of mouse mammary epithelial cell in culture. *Endocrinology.* 113: 871-877.
- 78.- Unanue, E.R. (1978). The regulation of lymphocyte function by macrophage. *Immunol. Rev.* 40: 227.

- 79.- Weigent. TDA., Langford, M.P. Fleischmann, W.R. (1982). Enhancement of natural killing activity by diferent types of interferon. In Khan. A. Hill NO (Eds) Human lymphokines. Academic Press. New York pp. 539-550.
- 80.- Young-Hua, Ku. (1984). Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignat and normal human dell lines Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 7308-7312.
- 81.- Younger, J.S. (1977). Properties of interferon induced by specific antigens. Texas reports on biology and medicine. 35: 17.