



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS:

**EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE IFN- γ POR
CÉLULAS JURKAT TRATADAS CON EXTRACTO
DIALIZABLE DE LEUCOCITOS (TRANSFERON®)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

JOSEFINA DALIA RAMÍREZ RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Profesor: Enrique Ortega Soto

SECRETARIO: Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia

1er. SUPLENTE: Profesor: María Elena Ibarra Rubio

2° SUPLENTE: Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sonia Mayra Pérez Tapia

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Nohemí Salinas Jazmín

SUSTENTANTE (S):

Josefina Dalia Ramírez Ramírez

CONTENIDO.

ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	7
ABREVIATURAS.....	8
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS	12
2.1.1 DEFINICIÓN DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS	12
2.1.2 ANTECEDENTES HISTORICOS DE LOS EXTRACTOS DIALIZABLES DE LEUCOCITOS	14
2.1.3 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS.	18
2.1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS	21
2.1.5 APLICACIONES CLÍNICAS DEL EDL	23
2.1.6 PREPARACIÓN DEL EDL	28
2.2 IFN-γ	30
2.2.1 GENERALIDADES	30
2.2.2 RECEPTOR DE IFN- γ	31
2.2.3 VÍA DE SEÑALIZACION DEL IFN- γ	32
2.2.4 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL IFN- γ	34
2.2.5 REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CÉLULAS T CD4+ POR IFN- γ	35
2.2.6 IMPLICACIONES CLÍNICAS.	36
3. JUSTIFICACIÓN	39

4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVO GENERAL	41
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
7.1 EXPANSIÓN DE CÉLULAS JURKAT CLONE E6 EN CULTIVOS SUCESIVOS.....	45
7.2 CONTEO DE CÉLULAS CON AZUL TRIPAN.....	46
7.3 CULTIVOS DE CÉLULAS JURKAT CLONE E6 CON DIFERENTES LOTES DE EDL.....	48
7.4 PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IFN- γ MEDIANTE UN KIT DE ELISA.....	53
7.4.1 PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DEL ESTÁNDAR DE IFN- γ RECOMBINANTE HUMANO.	53
7.4.2 PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR EL ENSAYO.	54
7.5 DISEÑO DE PLACA DE ELISA	55
8. ESTADÍSTICA	57
9. RESULTADOS	58
10. DISCUSIÓN	70
11. CONCLUSIONES	77
12. BIBLIOGRAFÍA	78

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Características fisicoquímicas e Inmunológicas del EDL (36).....	20
Tabla 2. Resumen de los padecimientos en los que se emplea exitosamente el EDL (37).....	27
Tabla 3. Actividad inmunológica del EDL (37).	30
Tabla 4. Clasificación de lotes de Transferon® oral (EDL) en relación a la secreción de IFN- γ	67
Tabla 5. Relación del dictamen de prueba biológica que se utiliza actualmente como control de calidad y la comparación con el modelo propuesto de secreción de IFN- γ en células Jurkat.	68

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. El paradigma actual de la transducción de señales de IFN- γ	33
Figura 2. Diagrama de flujo para realizar la cuenta de células por exclusión con azul tripan.....	47
Figura 3. Esquema de los diseños de placas para cultivo de células Jurkat clone E6 con tratamiento de EDL a diferentes concentraciones.....	52
Figura 4. Representación gráfica que muestra las diluciones seriadas llevadas a cabo para realizar la curva de calibración.....	54
Figura 5. Ejemplo del esquema del diseño de placa de ELISA.....	56
Figura 6. Esquema general de trabajo.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Curva dosis-respuesta para la producción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Concanavalina A (ConA).	58
Gráfica 2. Ejemplo de la curva de calibración de IFN- γ obtenida.	59
Gráfica 3. Efecto en la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Transferon® oral (EDL) del lote 11M01 a diferentes concentraciones incubadas por 48 horas.....	60
Gráfica 4. Efecto en la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Transferon® oral (EDL) del lote 11M01 a diferentes concentraciones incubadas por 72 horas.....	60
Gráfica 5. Efecto en la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Transferon® oral (EDL) del lote 11M02 a diferentes concentraciones incubadas por 72 horas. Por lo anterior los experimentos posteriores ser realizaron sólo a las 72 horas.....	61
Gráfica 6. (Grupo de gráficas A- I). Efecto en la secreción de IFN- γ de células Jurkat clone E6 al ser estimuladas con diferentes lotes de EDL (Transferon® oral) y a distintas concentraciones.....	66
Gráfica 7. Representación de grupo de todos los lotes de EDL que se evaluaron en la secreción de IFN- γ por células Jurkat clone E6.....	66
Gráfica 8. Relación y comparación entre el modelo de prueba biológica que se utiliza actualmente para evaluar la potencia de Transferon® oral y el modelo propuesto de secreción de IFN- γ en células Jurkat.....	69

ABREVIATURAS

ADCC	Siglas en inglés, <i>Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity</i>
AICD	Siglas en inglés <i>Activation-induced cell death</i>
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
APC	Siglas en inglés, <i>Antigen-presenting cell</i>
AR	Artritis Reumatoide
BCA	Ácido bicinconínico.
BCG	Bacilo de Calmette y Guerin.
bEDL	Extracto Dializable de Leucocitos bovino
CD	Siglas en inglés, <i>Cluster of differentiation.</i>
CMI	Siglas en inglés, <i>Cell-mediated immunity</i>
ConA	Concanavalina A
cRPMI	Medio RPMI complementado
Da	Daltones.
DAMP's	Siglas en inglés, <i>Damage-associated molecular pattern molecules.</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DNA	Siglas en inglés, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNCB	Dinitroclorobenceno.
DS	Desviación estándar.
DTH	Siglas en inglés, <i>Delayed type hypersensitivity.</i>
EDL	Siglas en inglés, <i>Dializable leukocyte extracts.</i>
ELISA	Siglas en inglés, <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FT	Factor de transferencia.

FTs	Factor de transferencia específico.
GMCSF	Siglas en inglés, <i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HPLC	Siglas en inglés, <i>High performance liquid chromatography.</i>
ID	Intradermorreacción
IFN γ	Interferón gamma.
IFN-γR	Receptor de Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2.
iNOS	Siglas en inglés, <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IRF	Siglas en inglés, <i>Interferon-regulatory factor</i>
JAK	Siglas en inglés, <i>Janus kinase</i>
kDa	Kilo daltones
LAF	Siglas en inglés, <i>Lymphocyte-activating factor</i>
LIF	Siglas en inglés, <i>Leucocyte inhibitory factor</i>
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LPS	Lipopolisacárido
LSF	Siglas en inglés, <i>Lymphocytic supresor factor</i>
MHC	Siglas en inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	Siglas en inglés, <i>Macrophage inhibitory factor</i>
mRNA	Siglas en inglés, <i>Messenger Ribonuclear Acid</i>
NFκB	Siglas en inglés, <i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	Siglas en inglés, <i>Natural killer</i>
NKT	Siglas en inglés, <i>Natural killer T</i>
NOD	Siglas en inglés, <i>Nonobese diabetic</i>

PBMC	Siglas en inglés, <i>Periferal blood mononuclear cells.</i>
PBS	Siglas en inglés, <i>Phosphate buffered saline.</i>
PHA	Siglas en inglés, <i>Phytohemagglutinin</i>
PM	Peso molecular.
PMA	Siglas en inglés, <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate.</i>
PMN	Polimorfonucleares
PPD	Siglas en inglés, <i>Purified protein derivative.</i> Prueba cutánea para el diagnóstico de tuberculosis.
RIC	Respuesta inmune celular.
SAv-HRP	Siglas en inglés, <i>Streptavidin-horseradish peroxidase</i>
SDS-PAGE	Siglas en inglés, <i>Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis.</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TGF-β	Siglas en inglés, <i>Transforming Growth Factor Betta</i>
Th1	Siglas en inglés, <i>T helper 1</i>
TLR	Siglas en inglés, <i>Toll Like Receptor</i>
TNF-α	Siglas en inglés, <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TNF-β	Siglas en inglés, <i>Tumor necrosis factor betta</i>
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. RESUMEN

El Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) se obtiene del rompimiento de linfocitos y su posterior diálisis, contiene moléculas con un peso molecular <10 kDa. Estos extractos son capaces de transferir la respuesta inmune celular (RIC) de manera antígeno específica, y están compuestos por moléculas antígeno independientes y antígeno dependientes. Dentro de los componentes antígenos dependientes se encuentra el Factor de Transferencia (FT), pequeñas moléculas de naturaleza proteica con un PM de 3.5 a 5 KDa. Los EDL's han sido usados como compuestos inmunomoduladores en diversas enfermedades, bacterianas, virales, fúngicas, alérgicas; obteniéndose buenos resultados y sin efectos adversos reportados. Hasta el momento no se conoce con claridad el mecanismo de acción del EDL, sin embargo se sabe que es capaz de estimular la producción de IFN- γ tanto *in vitro* como *in vivo*.

El Transferon® oral (Extracto Dializable de Leucocitos) proviene del rompimiento del paquete de leucocitos de una unidad de sangre para donación seguida de un proceso de diálisis.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la secreción de IFN- γ en cultivos de células Jurkat clone E6 estimulados con diversas concentraciones y lotes del Extracto Dializable de Leucocitos (Transferon ® oral), así como examinar la reproducibilidad del efecto de la secreción entre los lotes de Transferon® evaluados.

De los resultados se observa que existe una inducción en la secreción de IFN- γ por células Jurkat clone E6 cuando éstas son tratadas con EDL oral, sin embargo la respuesta en la secreción de esta citocina no es de manera dosis dependiente. Se determinó que el 80 % de los lotes de EDL oral evaluados son capaces de inducir la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 a concentraciones de 100 ng/mL, 1 μ g/mL y 10 μ g/mL después de 72 horas de tratamiento. Se determinó que el límite de corte para aceptar que un lote produce la secreción de IFN- γ es a partir de 10 pg/mL, la tercera parte de la concentración secretada por el control positivo, ConA.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS

2.1.1 DEFINICIÓN DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS

El EDL, conocido comúnmente como Factor de Transferencia (aunque en el estricto sentido de la palabra no son lo mismo, ya que el EDL dentro de sus componentes incluye al FT, pero en el ámbito comercial se refiere al producto indiscriminadamente con ambos conceptos) tiene la característica de transferir hipersensibilidad tardía antígeno – específica (1), además de actuar como regulador de la respuesta inmunológica (2). En un individuo, la capacidad de producir FT esta genéticamente controlada, no así la respuesta al mismo (3).

El producto de la diálisis leucocitaria es resistente a tratamientos con tripsina, quimiotripsina ribonucleasa y desoxirribonucleasa (4) y sensible a tratamientos con pronasa, proteinasa K, y carboxypeptidasa A, de tales hechos se deduce que los componentes del EDL son polipéptidos (3).

Está compuesto de más de 200 moléculas altamente polares e hidrofílicas, cuyo peso molecular oscila entre 1 y 10 kDa y pueden ser detectados a longitudes de onda de 214nm (5). Las moléculas que transfieren la respuesta específica de antígeno tienen un peso molecular de 3.5 a 5 kDa y son llamados FT específicos (6). Actualmente en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas se produce Extracto Dializable de Leucocitos que se comercializa como Transferon®.

Ciertamente algunos componentes del EDL poseen características de inmunoestimuladoras y otras funcionan como inmunosupresoras. Estos extractos son capaces de transferir la respuesta inmune celular (RIC) de manera antígeno específica (7).

De manera general se ha dividido a los componentes de los EDL's en dos fracciones principales:

- La fracción **antígeno específica o antígeno dependiente** que corresponde a moléculas de naturaleza peptídica con un PM de 3.5 a 5.0 kDa. En ella encontramos los FT, los cuales han sido identificados químicamente como péptidos pequeños con capacidad de transferir DTH. Esta fracción contiene teóricamente una multitud de diferentes FTs que corresponden a la suma de las experiencias inmunes del individuo de donde se ha obtenido el extracto. Algunas moléculas comprendidas en esta fracción ya han sido analizadas y secuenciadas parcialmente en algunas especies (5) (8).

- La fracción **antígeno inespecífica o antígeno independiente**, comprendida por moléculas por debajo de 3.5 y por arriba de 5.0 kDa en la cual encontramos moléculas como prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, hipoxantina, serotonina, factores de diferenciación de linfocitos (timosina), quimioatrayentes para monocitos y factores inmovilizadores de neutrófilo (9). La fracción por debajo de los 3.5 kDa fue definida por Gottlieb (10) como IMREG, esta fracción fue estudiada como inmunomoduladora en diversos ensayos “*in vitro*” y se identificó dentro de ella una molécula inmunosupresora de 1000 Da denominada LSF (de sus siglas en inglés *lymphocytic supresor factor*) (8).

Estudios realizados sobre los FT, sugiere que este contiene estructuras de péptido- oligorribonucleótido (cadenas cortas de RNA insertadas en pequeños péptidos) (7).

El EDL usualmente es administrado por vía oral, subcutánea o intramuscular, siendo estas alternativas igualmente efectivas. Su aplicación carece de efectos secundarios indeseables y no es tóxico. Para una acción más rápida se puede administrar de forma intravenosa (7).

Estudios comparativos entre 5 diferentes vías de administración demuestran que los efectos del EDL son los mismos independientemente de la vía utilizada (11).

Además de transferir la respuesta inmune celular en forma específica, el EDL tiene efecto sobre los canales de calcio, estimulando el transporte de este ion

en algunas células, probablemente activando la respuesta en células del sistema inmune (12).

Actualmente se produce EDL específico contra diferentes antígenos bacterianos (por ejemplo de *Salmonella choleraesuis*) y contra diversos antígenos tumorales (13).

2.1.2 ANTECEDENTES HISTORICOS DE LOS EXTRACTOS DIALIZABLES DE LEUCOCITOS

En 1942 Landstainer y Chase realizaron por primera vez la transferencia de la respuesta inmune celular (RIC) de un animal inmune a otro no inmune, empleando para ello cobayos sensibilizados con el Bacilo de Calmette y Guerin, los leucocitos obtenidos de estos animales fueron inoculados en otro animal no inmune, transfiriendo en éste último la inmunidad celular o hipersensibilidad tardía (DTH) que presentaban los animales originales (14).

Posteriormente Lawrence demostró que si estos leucocitos eran lisados, el lisado mantenía la capacidad de transferir DTH, cabe mencionar que en aquellos tiempos se creía que solo una molécula era la responsable de este fenómeno y se le bautizó con el nombre de “Factor de Transferencia” (15).

Estudios posteriores en animales indicaron que la transferencia era mejor cuando se realizaba entre donadores y receptores que tuvieran alguna relación singénica y sólo cuando se usaban células intactas y vivas (14).

La transferencia antígeno específica mediada por la inmunidad celular en humanos fue demostrada inicialmente por Lawrence en 1949 (16), el utilizó linfocitos viables intactos de un individuo que daba intradermorreacción (ID) positiva a la tuberculina y los transfirió a un individuo ID negativa a la tuberculina, esto propició que el individuo al ser retado con tuberculina diera una ID positiva (7). En 1955, Lawrence y col. demostraron que la hipersensibilidad cutánea tardía o DTH podía ser transferida utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 mililitros de sangre total. En estos experimentos Lawrence utilizó lisados de leucocitos de donadores

que presentaban DTH positivas a antígenos tales como la coccidiodina, el toxoide diftérico, la proteína M del estreptococo y el PPD; en todos los casos los receptores eran individuos con DTH negativas a estos antígenos, 24 horas después de haber recibido el extracto soluble, los receptores eran capaces de presentar reacciones de DTH positivas a los antígenos que eran reconocidos por los donadores (15).

En 1961 Jensen y col. reportaron que era posible transferir la DTH a tuberculina de un individuo inmune a otro no inmune, y posteriormente de este a otro no inmune; por lo tanto la transferencia se podía hacer de manera seriada (17), estos experimentos tenían la finalidad de demostrar que las preparaciones de "Factor de Transferencia" estaban libres de antígeno.

Lawrence y sus colaboradores dieron a conocer que el EDL podía pasar a través de una membrana de diálisis sin que este perdiera su actividad biológica, en 1955 utilizaron un corte molecular de 20 kDa y en 1963 de 10 kDa, con estos experimentos se desechaba la idea de que el efecto biológico fuera causado por anticuerpos (el más pequeño pesa alrededor de 150 kDa) lo cual complico el entendimiento del mecanismo inmunológico involucrado en la transferencia, ya que los científicos no se podían explicar cómo moléculas tan pequeñas eran capaces de transferir RIC de manera antígeno específica, en ese momento Lawrence pensó que solo había una sola especie molecular por ello se le llamo Factor de Transferencia, hoy en día sabemos que es un conjunto de moléculas llamadas Extracto Dializado de Leucocitos EDL (18).

En 1970, Levin demostró que ciertos síndromes de inmunodeficiencias podían reconstituirse utilizando EDL y que éste además de transferir la respuesta inmune celular, confería la capacidad de inducir la producción de citocinas en respuesta a antígenos específicos, así como la resistencia a la infección en padecimientos con una inmunidad deficiente de carácter genético (19).

En 1970 Lawrence observó que el EDL podía no solo transferir DTH sino que además podía producir un tipo de reacciones mediadas por inmunidad celular;

esta es la inhibición de migración de macrófagos con un antígeno específico en varios estados de inmunodeficiencia (en pacientes con síndrome Wiskott-Aldrich), la transferencia antígeno-específico de CMI (Inmunidad mediada por células) proporcionaba protección por un periodo de aproximadamente de 6 meses, paralelamente había producción de citocinas semejantes al factor de inhibición de migración de macrófagos (MIF) y al factor de inhibición de migración de leucocitos (LIF) por granulocitos. El término generalizado “inhibición de la migración de leucocitos” fue adoptado porque el blanco de las células era desconocido, el blanco de las células fue buscado más tarde en los granulocitos, el viejo termino LIF, fue desafortunadamente conservado. El EDL puede transferir la habilidad para producir MIF y LIF antígeno-específico de un individuo normal quien transfería la habilidad a un individuo normal o enfermo (20).

Desde los primeros experimentos de Landstainer y de Lawrence, se observaba una relación positiva entre la respuesta al antígeno por parte de donador, y la transferencia de la respuesta al mismo antígeno en el receptor; esto hizo suponer que la transferencia llevada a cabo por el “Factor de transferencia” (FT) era antígeno específica. Lo anterior es evidente en los experimentos de Rapaport y Lawrence (21), donde se obtuvo EDL de un grupo de donadores positivos a coccidioidina, procedentes de California donde este antígeno es endémico; y se aplicó a un grupo de Neoyorquinos con respuestas de DTH negativas a la coccidioidina; estos últimos adquirieron una DTH positiva solo hacia el antígeno al cual era positivo el donador.

Veinte años después Borkowsky demuestra que los Factores de Transferencia contenidos dentro de los extractos eran capaces de unirse específicamente al antígeno que les daba origen, pero no así a los anticuerpos contra el mismo antígeno (22).

En 1979 Petersen y col. (23) desarrollaron un modelo murino, en el cual estudiaron la respuesta celular antígeno específica a través de la determinación de la transferencia de hipersensibilidad cutánea tardía (DTH), empleando EDL

obtenido de esplenocitos de ratones sensibilizados con PPD, ferritina, peroxidasa de rábano, entre otros, aplicándolo posteriormente a animales no sensibilizados; después de 24 horas los animales presentaron DTH positiva solo contra los antígenos con los cuales había sido inmunizado el donador; además emplearon como control negativo EDL obtenido de ratones no inmunizados, y al aplicar este último a ratones no inmunizados estos no presentaron DTH contra ninguno de los antígenos estudiados (23).

Kirkpatrick realizó un estudio de DTH, empleando antígenos sintéticos para inmunizar ratones y obtener de estos EDL (3); al igual que en el trabajo de Petersen, los animales solo presentaron una DTH positiva con el antígeno con el cual el donador había sido inmunizado.

Años más tarde Kirkpatrick confirmó los trabajos de Borbowsky donde se demostraba que moléculas dentro del EDL eran capaces de unirse al mismo antígeno empleado para inmunizar a los animales de donde se obtuvo el EDL, es decir las moléculas de FT eran antígeno específicas. Kirkpatrick empleó EDL de ratones sensibilizados con ferritina, los cuales incubó sobre superficies cubiertas con ferritina, al recuperar el sobrenadante éste perdía su capacidad de transferir la DTH contra el antígeno; esta actividad podía ser recuperada si se eluían de la superficie las moléculas de FT empleando urea 8M o acetonitrilo (5), (24).

Por todo lo anterior, hoy en día se sabe que la actividad antígeno dependiente está dada por una mezcla de moléculas “Factores de Transferencia”, los cuales probablemente sean específicas para cada antígeno que haya visto el individuo de donde se obtiene el extracto.

Estudios realizados por Kirkpatrick y grupos de la universidad de Leipzig de Alemania, China y Rusia confirman que en el EDL existen sitios que son constantes en las moléculas de Factor de Transferencia y sitios que son hipervariables y se sugiere que los sitios hipervariables son antígeno-específicos, se considera que cada Factor de transferencia tiene ≈ 45 aminoácidos, considerando una posible combinación de los 20 aminoácidos

estructurales de las proteínas, puede dar como resultados una innumerables combinaciones en la composición estructural de los Factores de Transferencia en su estructura primaria, esto es una especificidad para cada antígeno que existe en el repertorio inmunológico normal. El EDL por su modo de acción y su tamaño molecular es posible distinguir 2 actividades: la primera no es específica e incrementa las actividades del sistema inmunológico como un adyuvante: la segunda es específica y como su nombre lo indica, solo aumenta la respuesta contra un antígeno determinado. Esto último fue observado por Lawrence y sus colaboradores en 1983 y recientemente se ha caracterizado como un conjunto de polipéptidos con un peso molecular menor a 5 kDa, ésta fracción es la responsable de transmitir la inmunidad de un sujeto sano a uno enfermo y obtener un efecto terapéutico importante (25).

2.1.3 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS.

Hasta el día de hoy la estructura de los EDL's no se conoce totalmente, sin embargo, diversos grupos de investigación han tratado de caracterizarlos.

Baram y Mosko fueron los primeros investigadores que trataron de caracterizar los componentes de los EDL, al fraccionar el EDL específico para tuberculosis, en columnas de celulosa, y a partir del cual obtuvieron fracciones capaces de transferir sensibilidad a PPD en individuos no sensibilizados previamente (26). Empleando filtración en gel obtuvieron 2 fracciones capaces de transferir sensibilidad a PPD, una de éstas no era dializable y eluía en la fracción de las gamma globulinas; mientras que la otra estaba compuesta por un polinucleótido, en el cual se encontraban presentes adenina, guanina y citocina.

Sin embargo, en 1967 Árala, Chávez y Heremans empleando una combinación de filtración en gel y electroforesis de alto voltaje, describieron proteínas dentro de las fracciones activas del extracto (27).

A partir de 1973 diversos grupos de trabajo comenzaron a usar cromatografía de exclusión en Sephadex G-25. Neidhart y col separaron así 6 fracciones de EDL específico para tuberculosis de 5 donadores diferentes; encontrando que

la fracción 4 era la que tenía mayor actividad (28). Kronh desarrollo estudios similares de cromatografía; pero el encontró 7 fracciones de las cuales 3 mostraban actividad biológica (29).

En 1976 Burger y col. publican 2 estudios sobre la caracterización de los EDL; en uno de los cuales reporta que obtuvieron 4 fracciones del EDL por cromatografía con Sephadex G-25, en las cuales la primera tenía actividad mitogénica, la tercera tenía la capacidad de transferir DTH y en la cuarta se identificó nicotinamida, que actúa como inmunosupresor (30). Trabajos posteriores reportan las actividades enzimáticas sobre una fracción, la cual tenía actividad transfiriendo la inmunidad específica (por DTH), en ésta fracción encontraron ácidos nucleicos y proteínas; sin embargo la fracción no perdía su actividad cuando era tratada con DNasa y RNasa. (Tabla 1). Posteriormente la sometieron al tratamiento con pronasa, proteinasa K y carboxipeptidasa A encontrando que la actividad se eliminaba, con esta base dedujeron que las moléculas conocidas como FT, responsables de la transferencia de inmunidad específica no eran ácidos nucleicos o al menos estos no interferían en su capacidad de transferir la inmunidad específica, y que podía tratarse de polipéptidos (31), (32).

Wilson, Welch y Fundeberg, publican en 1977 un análisis en el cual identificaron una fracción activa de "factor de transferencia dializable humano", lo que hoy entendemos por EDL, de esta fracción separaron dos subfracciones de las cuales solo una transfería DTH en cobayos (20).

Borvak y Mayer realizan un fraccionamiento bioespecífico en el cual el EDL se hace pasar por una columna de afinidad con m-aminofenil y ácido borónico, y posteriormente se mide la absorbancia en luz ultravioleta; con este fraccionamiento se concentró material proteico y además este contenía purinas y pirimidinas unidas a ribosa, por lo tanto los EDL's podían ser polipéptidos unidos a fracciones de cadenas cortas de RNA (33). El mismo grupo de trabajo realizó una purificación parcial de dos fracciones principales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) demostrando la presencia de lisina, glicina, serina y ácido glutámico (34).

A partir de 1992, Kirkpatrick y col. purificaron factor de transferencia específico (FTs), a partir de EDL obtenidos de ratones inmunizados con albúmina de huevo y ferritina de caballo, por diferentes métodos como: afinidad al antígeno, cromatografía de fase reversa y HPLC; analizando posteriormente por electroforesis SDS-PAGE y ensayos *in vivo* para medir su actividad. Tras estos trabajos la conclusión principal fue que los FT eran moléculas de bajo peso molecular, 5 kDa aproximadamente, hidrofílicas y altamente polares (5).

Además el grupo de trabajo de Kirkpatrick, logro aislar y secuenciar dos péptidos diferentes de manera consistente en EDL murino y bovino. La secuencia que encontraron fue: MxLLYAQDLEDN y MxLLYAQDVEDN, ésta secuencia se encontraba presente en todos los EDL analizados. Dichos péptidos no eran capaces de transferir DTH, pero sí de inhibirla si se administraban con el FT; lo anterior hace suponer que dichos péptidos podrían estar compitiendo con el sitio activo del FT en la célula blanco, y probablemente corresponden a una parte del FT que se une a la célula de manera específica independientemente del antígeno (35).

FISICOQUIMICAS	INMUNOLOGICAS
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Polipéptido con peso molecular de 5 Kilodaltones. (5) ➤ Sensible a algunas enzimas como la carboxipeptidasa A y fosfodiesterasa I ➤ Resistente a las RNAsas, DNAsas, fosfodiesterasa II, aminoleucina peptidasa. ➤ Moléculas hidrofílicas de alta polaridad por lo que es altamente soluble en agua y fácil de dializar. ➤ Se cree que su estructura está formada por pequeños péptidos unidos a un ribonucleótido que forman un oligoribonucleopéptido. (7) <p>Lábil al calor, pero muy estable al frío en temperaturas de -20 a -70 °C, lo cual facilita su liofilización</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tiene la capacidad de transferir la hipersensibilidad retardada ➤ Es específico de antígeno ➤ interactúa con el antígeno ➤ no presenta antígenos de histocompatibilidad. ➤ Estimula la producción de citocinas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en ratón. ➤ Presenta un factor inductor y uno "supresor". ➤ Tiene capacidad de activar macrófagos productores del Factor Activante de Leucocitos (LAF). ➤ No presenta propiedades de anticuerpo.

Tabla 1. Características fisicoquímicas e Inmunológicas del EDL (36).

2.1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS

Dentro de las ventajas del EDL se encuentra su relativa facilidad de producción, su bajo costo comparado con otros inmunomoduladores, no tiene microorganismos ni antígenos de histocompatibilidad y no produce efectos secundarios (37). El efecto del EDL depende de la capacidad del donador para desarrollar una respuesta celular adecuada, lo cual se encuentra influenciado por características genéticas propias de cada individuo (38).

Aún no se conoce el mecanismo de acción preciso del EDL, se piensa que puede actuar sobre linfocitos T responsables de la inmunidad celular, aunque también tiene un claro efecto modulador en enfermedades alérgicas y autoinmunes (25), (39).

La activación de linfocitos T puede ser mediada por células presentadoras de antígeno profesionales (macrófagos y células dendríticas), que pueden activarse con la mezcla de moléculas dentro del EDL, lo anterior puede explicarse con lo hecho por Robledo Ávila en el 2006 quién propone que los EDL activan directamente inmunidad innata vía TLRs, ya que, existen una mezcla de componentes intrínsecos de peso menor a 10 kDa, (PAMPs) que pudieran ser reconocidos por TLRs y así estimular la producción de citocinas proinflamatorias (40).

Las propiedades inmunológicas del EDL que se han descrito son:

- Efectos sobre los canales de calcio, estimulando el transporte de este ión en las células, activando probablemente la respuesta en células del sistema inmune (41).
- Producción de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 por Linfocitos T,
- Producción de TNF- α en células mononucleares humanas estimuladas con LPS, (42)

- Expresión de receptores TLR2 y TLR4 en leucocitos y células endoteliales (43),
- Inhibición de la actividad de NF- κ B en una línea celular de linfocitos T humanos y en linfocitos de sangre total humana (44) (43),
- Incremento de las concentraciones de AMPc en linfocitos T. Al separar aún más los linfocitos T en células T con receptores Fc para IgG y Fc para IgM (Linfocitos T γ y T μ), el aumento en AMPc tras la estimulación fue conferido específicamente a los linfocitos T γ , (43), (45),
- Además se han estudiado otras propiedades biológicas como restauración de la hematopoyesis en el ratón (46),
- Modulación de la fagocitosis por Polimorfonucleares, (13).
- Inhibición de la migración de macrófagos de una manera antígeno específica favoreciendo la producción de MIF y LIF,
- Aumenta la actividad de los linfocitos T, tanto citotóxicos como cooperadores (47),
- Proliferación de linfocitos específicos para tuberculina empleando EDL; realizado *in vitro* en células humanas (48),
- Producción de células T citotóxicas específicas para células de sarcoma osteogénico, utilizando EDL obtenido de convivientes (49),
- Aumento de la capacidad de respuesta de linfocitos a mitógenos en cultivos *in vitro* de células humanas (23), (30),
- Incremento en el receptor para IL-2 (CD25) en células CD4+ *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (50),
- Secreción de IFN- γ y de IL-12, específicas de antígeno en cultivos *in vitro* de células de bazo de ratón (11),
- Producción *in vivo* de IFN- γ en ratones sensibilizados con EDL específico (11), (51),
- Modulación de la expresión de osteopontina en células mononucleares humanas (*in Vitro*) (52),
- Inducción de la expresión de IFN- γ en células mononucleares humanas (*in vitro*) y en un modelo murino de infección con tuberculosis (*in vivo*) (53),

- Incremento de células NKT y Tregs en un ensayo *ex vivo* a las 24 horas después del tratamiento con EDL a personas sanas (54),
- Capacidad de activar macrófagos productores del Factor Activante de Leucocitos (36),

De acuerdo con los efectos que se han observado algunas posibles hipótesis acerca del mecanismo de acción de los EDL son:

- Que el EDL actúe como un adyuvante (21).
- Que el FT se una al TCR (55), lo cual explicaría la activación de linfocitos al estimular con FT, sin necesidad de tener al antígeno presente; además, esto podría correlacionar con el hecho de que el FT se une específicamente al antígeno que le da origen.
- Una posible escisión del que conlleve a que una porción del péptido permanezca en la superficie celular y de esta manera interacciones o se una al receptor de células T (55), (56), (57).
- Lawrence propuso desde 1969 que el EDL podría desbloquear o desreprimir poblaciones de linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, y por lo tanto modular la misma (58).
- Activación de los linfocitos $T\gamma\delta$, que conduce a un aumento en la función de las células supresoras, (43), (45).

2.1.5 APLICACIONES CLÍNICAS DEL EDL

Se han reportado múltiples beneficios en el tratamiento de pacientes tratados con EDL en algunas enfermedades, es importante especificar que la mejora del paciente depende del tipo de enfermedad a tratar, así mismo que la dosis de ataque en cada enfermedad es diferente; en algunas enfermedades se emplea el EDL sin aplicar otro fármaco, pero otras enfermedades requieren aplicar tratamiento con EDL al mismo tiempo que con fármacos. Los efectos clínicos del EDL son independientes de la vía de administración (59); y hasta la fecha no se han demostrado efectos secundarios.

El EDL se ha empleado como tratamiento de (Tabla 2):

1. Inmunodeficiencias severas (60): Síndrome de Wiskott-Aldrich (19), (48), Síndrome de Di George, Síndrome de inmunodeficiencia combinada, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA / VIH) (39), (50).
2. Enfermedades autoinmunes: Síndrome de Behcet's (61).
3. Enfermedades infecciosas:
 - Hongos: Coccidioidomicosis (21), Candidiasis e Histoplasmosis (62, 63).
 - Virus: Citomegalovirus, Herpes zoster (56),(64) , Sarampión, Varicela (65), y Hepatitis (66).
 - Parásitos: Leishmaniasis (67),(68).
 - Bacterias: Brucelosis, Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar (53), (69) Lepra (70), e infecciones causadas por bacterias gram negativas (71) y gram positivas.
3. Terapia complementaria en neoplasias: Melanoma, Cáncer de estómago, de próstata, de pulmón, de colon, de mama, osteosarcoma. (72), (73), (74), (75).
4. Hipersensibilidad: Asma bronquial (76-78), Dermatitis atópica refractaria (25, 79, 80) y Alergias (77, 79).
5. Otras: Uveitis (81), Otitis (82).

Los pacientes con tuberculosis presentan una disminución en el % de linfocitos T posterior al tratamiento con FT el % de linfocitos T aumentan; además los pacientes que reciben FT en combinación con el tratamiento antituberculoso habitual acortan el periodo de tratamiento. En un modelo experimental murino, empleando individuos infectados y posteriormente tratados con EDL y antifímicos se ha observado que los individuos infectados y sin tratamiento desarrollan la enfermedad en un lapso de 2 meses y, sin recibir tratamiento, la sobrevida de este grupo disminuye drásticamente a los 4 meses postinfección.

Por su parte, los individuos con tratamiento con EDL y antifímicos no desarrollaron TB activa e incluso presentan una disminución considerable en el número de bacterias y una reducción notable del grado de daño a nivel pulmonar desde los primeros días posteriores al inicio del tratamiento. Sin embargo, se comprobó que la terapia con EDL por sí sola no elimina a la bacteria y no evita la reactivación de la enfermedad, lo que sustenta la propuesta del uso de EDL como complemento, y no como sustituto, de la terapia convencional empleada hasta ahora (52), (83), (84).

El EDL, en combinación con la terapia convencional proveen una alternativa de terapia de control adecuada, sencilla, que reduciría el tiempo de tratamiento de forma significativa sin alterar la eficacia de la terapia convencional para contrarrestar el cuadro clínico (85).

Pacientes asmáticos que reciben EDL, presentan una disminución en las concentraciones séricas de IgE y la elevación de linfocitos T, a estos pacientes se les administró una unidad de factor de transferencia diaria (36).

En el Hospital Adolfo López Mateos se realizó un estudio con factor de transferencia en el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica grave donde se observó una mejoría clínica en la mayoría de los pacientes a los 10 días de la administración del factor de transferencia, dicha mejoría se evidenció cuando se compararon los valores inmunológicos de los pacientes con dermatitis atópica grave con respecto al grupo testigo donde se observó que al iniciar el estudio había cuenta elevada de linfocitos, eosinófilos y basófilos, conforme se aplicó el tratamiento se observó que después de los 6 meses los linfocitos y los eosinófilos disminuyeron en un 38% y 62% respectivamente. Por lo que se concluye que el factor de transferencia tiene un efecto inmunorregulador en las células de la respuesta inmune, con una reducción en la cuenta de eosinófilos, y la inflamación con que cursan estos pacientes (86).

Otro uso clínico del factor de transferencia específico es en el defecto completo del receptor de IL-12, manifestado como adenitis supurada por salmonella, el

primer caso que se reportó en México fue donde el paciente había sido multitratado con antibióticos sin mejoría, posterior al tratamiento con FTs se remitió el cuadro. Dentro de los mecanismos para eliminación de gérmenes como la Salmonella, es fundamental la integridad del eje IFN- γ /IL-12, por lo que se piensa que el factor de transferencia induce la síntesis de IFN- γ por una vía diferente a la IL-12, probablemente en el Linfocito T a través del CD28 (53).

El EDL ha demostrado su amplia capacidad reguladora como tratamiento en sepsis, los resultados indican que la aplicación de este producto tiene efectos de sobrevida en algunos pacientes. Franco et al, en el 2004 reportaron que la administración *in vivo* de EDL regula la expresión de citocinas pro-inflamatorias. Pérez Tapia, en el 2007 administró EDL (Transferon®) a pacientes con sepsis grave, observando que:

- Se incrementaba la expresión de HLA-DR en monocitos de sangre periférica
- Un incremento en el número de linfocitos T CD4+ en sangre periférica.
- Disminuía el porcentaje de neutrófilos en circulación.
- Un incremento en la expresión de CD14 en monocitos (37).

I.- Inmunodeficiencias severas	IV Cáncer (principalmente cuando tiene etiología viral) o para evitar metástasis específicas.
<p>A.- Defectos congénitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Wiskott-Aldrich • Ataxia telangiectasia • Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada • Síndrome parcial de Di George • Disgamaglobulinemia con defectos en inmunidad celular • Síndrome de Behcet 	<ul style="list-style-type: none"> • Melanoma • Cáncer de estómago • Cáncer de próstata • Cáncer de pulmón • Cáncer de colon • Osteosarcoma • Hipernefoma • Cáncer de mama • Carcinoma nasofaríngeo
II.- Enfermedades Infecciosas producidas por	V Hipersensibilidad
<p>A.- Hongos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Candidiasis mucocutánea crónica • Histoplasmosis diseminada • Coccidioidomicosis diseminada <p>B.- Virus</p> <ul style="list-style-type: none"> • Citomegalovirus • Herpes zoster • Sarampión • Varicela • Hepatitis <p>C.- Bacterias</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tuberculosis • Lepra • Micobacteriosis por <i>avium</i> • Brucelosis • Gram positivas • Gram negativas <p>D.- Protozoarios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leishmaniasis cutánea 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma bronquial • Dermatitis atópica • Síndrome de Hiper IgE • Alergias
III.- Enfermedades autoinmunes	VI Otros
<p>A.- Enfermedades autoinmunes no órgano específico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lupus eritematoso crónico discoide • Síndrome de Behcet 	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de fátiga crónica • Depresión

Tabla 2. Resumen de los padecimientos en los que se emplea exitosamente el EDL (37).

2.1.6 PREPARACIÓN DEL EDL

El Extracto Dializable de Leucocitos se obtiene a partir de leucocitos de personas sanas, que son sometidos a pruebas para evitar la transmisión de infecciones por el VIH, la hepatitis B, Hepatitis C, Brucelas, etc; se escogen los donadores que hayan dado negativas las pruebas anteriores; y también se hacen pruebas específicas de la respuesta inmune celular para asegurarse de que estos donadores sanos estuvieron en contacto con el agente infeccioso y que lograron dominar la infección. La sangre total es separada en la fracción leucocitaria, y de eritrocitos. Solo los leucocitos son utilizados y sometidos a un proceso farmacéutico controlado, y en condiciones de estricta esterilidad, donde se procesan los glóbulos blancos para romperlos y hacer un extracto que luego es sometido a una diálisis extensa y el producto que se obtiene de la membrana de diálisis una vez liofilizado es lo que constituye el EDL (36).

Año	Reportado por	Actividad inmunológica	Modelo
1967	Fireman	Proliferación de linfocitos específicos para tuberculina empleando EDL	<i>In vitro</i> células humanas.
1974	Gallin y Kirkpatrick CH	Actividad quimiotáctica para neutrófilos y monocitos.	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> en monos Rhesus
1975	Levin <i>et al.</i>	Producción de células T citotóxicas específicas para células de sarcoma osteogénico, en pacientes a los que se les administró EDL de convivientes.	<i>In vitro</i> , pacientes con sarcoma
1979	Petersen & Kirkpatrick CH	Incremento en la expresión de SRBC receptor (actualmente identificado como	<i>In vitro</i> células humanas

		CD2).	
1979	Petersen & Kirkpatrick CH	Aumento en la capacidad de respuesta a mitógenos por parte de los linfocitos.	<i>In vitro</i> células humanas
1979	Borkowsky & Lawrence	Inhibición de la migración leucocitaria a antígeno específica.	<i>In vitro</i> células humanas
1984	Farmer <i>et al.</i>	Identificación de una molécula por debajo de 3500 Da que actúa revertiendo la inhibición de la migración de macrófagos y de PMN que produce el EDL.	<i>In vitro</i> células humanas
1987	Dorfling <i>et al.</i>	Induce la producción de IL-1 y la activación de macrófagos.	<i>In vitro</i> macrófagos humanos
1988	Nekam	Incrementa la ADCC	<i>In vitro</i> células periféricas humanas
1995	Gottlieb <i>et al.</i>	Incremento de DTH, Incremento en el receptor para IL-2 (CD25) en células CD4+.	<i>In vitro</i> células periféricas mononucleares humanas.
1995	Alvarez & Kirkpatrick CH	Secreción de IFN- γ y de IL-12 específicas de antígeno.	<i>In vitro</i> células de bazo de ratón
1995	Fernández-Ortega	Inhibición de la replicación de virus de VIH de manera dosis dependiente.	<i>In vitro</i> células MT4
1995	Fernández-Ortega	Inhibición de la producción de TNF α en células activadas con LPS.	<i>In vitro</i> monocitos aislados y en sangre total
1995	Kirkpatrick CH	Producción de IFN γ	<i>In vivo</i> ratones sensibilizados con EDL específicos.
1997	Vacek <i>et al.</i>	Incrementa la sensibilidad de células progenitoras hematopoyéticas al tratamiento con GM-CSF	<i>In vitro</i> células de médula alósea de ratón
2000	Vacek <i>et al.</i>	Favorece la rápida recuperación de la hematopoyesis posterior a la radiación. Estimula el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas para granulocitos y macrófagos	<i>In vivo</i> modelo en ratón con EDL de humanos
2002	Vacek <i>et al.</i>	Favorece la rápida recuperación de la hematopoyesis posterior a la radiación. Estimula el crecimiento de células	<i>In vivo</i> modelo en ratón con EDL de cerdo

		progenitoras hematopoyéticas para granulocitos y macrófagos empleando EDL obtenidos a partir de leucocitos de cerdo.	
2004	Fabré et al.	Incrementa la RIC, incremento en la sobrevivencia, favorece un perfil de citocinas TH1, aumento de IFN γ , IL-12 e iNOS, disminución de IL-4, combinado con tratamiento antifímico acelera la disminución de área neumónicas y de unidades formadoras de colonias.	<i>In vivo</i> modelo murino de infección con <i>M. tuberculosis</i> .
2004	Moisés A et al.	EDL bovino protegen contra el choque endotóxico causada por LPS.	<i>In vivo</i> modelo murino
NP	Pérez-Tapia SM et al.	EDL humano modulan expresión de osteopontina en células mononucleares humanas.	<i>In vitro</i> células mononucleares humanas
NP	Pérez-Tapia SM et al.	EDL humano modulan inducen la expresión de IFN γ y RANTES.	<i>In vitro</i> células mononucleares humanas
NP	Pérez-Tapia SM et al.	EDL murino regula la expresión diferencial de DAF Y GNRP.	<i>In vivo</i> modelo murino de infección con <i>M. tuberculosis</i> .

Tabla 3. Actividad inmunológica del EDL (37).

2.2 IFN- γ

2.2.1 GENERALIDADES

El IFN- γ fue descubierto en la década de 1960. Es el único tipo de interferón tipo II, estructuralmente no está relacionado con el interferón de tipo I, se une a un receptor diferente, y es codificado por un locus cromosómico separado. Inicialmente, se creía que las células T CD4+ cooperadoras tipo 1 (Th1), las células CD8+ citotóxicas y células NK producían exclusivamente IFN- γ . Sin embargo, ahora hay pruebas de que otras células, tales como las células B, las células NKT y las células presentadoras de antígeno profesionales-(APCs) también secretan IFN- γ (87).

Cuando se estimularon cultivos de leucocitos humanos con fitohemaglutinina (PHA), un inhibidor de los efectos citopáticos del virus Sindbis se identificó con las propiedades fisicoquímicas y biológicas similares a las del interferón, a excepción de una inestabilidad en condiciones ácidas (88). El IFN- γ humano y de ratón es codificado por un gen de copia única localizado en el cromosoma humano 12 y el cromosoma 10 del ratón, que se conserva entre las diferentes especies. Cuando se expresa, el gen produce un homodímero no covalente, compuesto por dos polipéptidos de 166 residuos (que incluye una secuencia señal hidrofóbica de 23 residuos); la forma biológicamente activa de IFN es un homodímero de 34-kDa (89).

La producción de IFN- γ por APCs profesionales [monocitos / macrófagos, células dendríticas] que actúan localmente pueden ser importantes en la auto-activación celular y la activación de las células cercanas. El IFN- γ es secretado por las células del sistema inmune innato como las células NK y las células T $\gamma\delta$ y el sistema inmune adaptativo (células T CD8 + y las células T CD4+ Th1). Las células NK y los linfocitos T $\gamma\delta$ son fuentes iniciales de interferón γ durante la infección o vigilancia tumoral. Las células NKT que unen las respuestas inmunes innatas y las adaptativas también secretan IFN- γ después de la estimulación (90). El IFN- γ desempeña un papel importante en el control de la infección intracelular y el desarrollo del tumor y se asocia generalmente con TNF alfa (también una citocina importante para el control de infecciones y tumores). Varios estudios han demostrado que las células T CD4+ que secretan IFN- γ e IL10 pueden regular la respuesta inmune implicada en el control de la infección parasitaria en ratones (90),(91) .En los macrófagos, las células NK y los linfocitos T, la combinación de IL-12 y la estimulación de IL-18 aumenta aún más la producción de IFN- γ (92), (93). Reguladores negativos de la producción de IFN- γ incluyen IL-4, IL-10, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y glucocorticoides (94).

2.2.2 RECEPTOR DE IFN- γ

El receptor de IFN- γ consta de cadenas alfa y beta. La cadena alfa del receptor de IFN- γ humano está codificada por un gen situado en el cromosoma 6,

mientras que el gen ortólogo en el ratón está localizado en el cromosoma 10. La cadena beta del receptor de IFN- γ humano se encuentra en el cromosoma 21 y el equivalente en el cromosoma 16 del ratón. La expresión del gen de la cadena alfa del receptor de IFN- γ parece ser constitutiva, mientras que de la cadena beta se expresa a un nivel extremadamente bajo. La regulación de la expresión de la cadena beta puede así determinar si ciertos tipos de células responden a la estimulación IFN- γ . Muchos autores han demostrado que las células CD4 + Th2 carecen de la subunidad beta del receptor y no responden a IFN- γ , mientras que las células CD4 + Th1 responden plenamente a IFN- γ (95), (96).

2.2.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL IFN- γ

El receptor de IFN- γ tiene dos subunidades: IFN γ R1, la cadena que une al ligando (o cadena α) y el IFN γ R2, la cadena que transduce la señal (o cadena β). Estas proteínas son codificadas por genes separados (IFNGR1 e IFNGR2, respectivamente), localizados en diferentes cromosomas. Al interactuar el IFN- γ con la cadena de unión, ésta se dimeriza y se asocia a dos cadenas de transducción de señales. El ensamble del receptor conduce a la activación de las cinasas de Janus 1 y 2 (JAK1 y JAK2), y a la fosforilación de un residuo de tirosina en el dominio intracelular del IFN- γ R1. Esto a su vez permite el reclutamiento y la fosforilación de STAT1, el cual forma homodímeros que se translocan al núcleo donde se une con una secuencia de ADN definida (TTNCNNNAA), GAS e iniciar la transcripción (89). Factores de regulación de interferón (IRF), incluyendo miembros de la familia IRF-1, IRF-2 y 9-IRF también están involucrados en la señalización de IFN- γ una amplia variedad de genes de respuesta al IFN- γ . Después de la señalización, las cadenas de unión se internan y se disocian. Las cadenas son recicladas a la superficie célula (87), (96), (97).

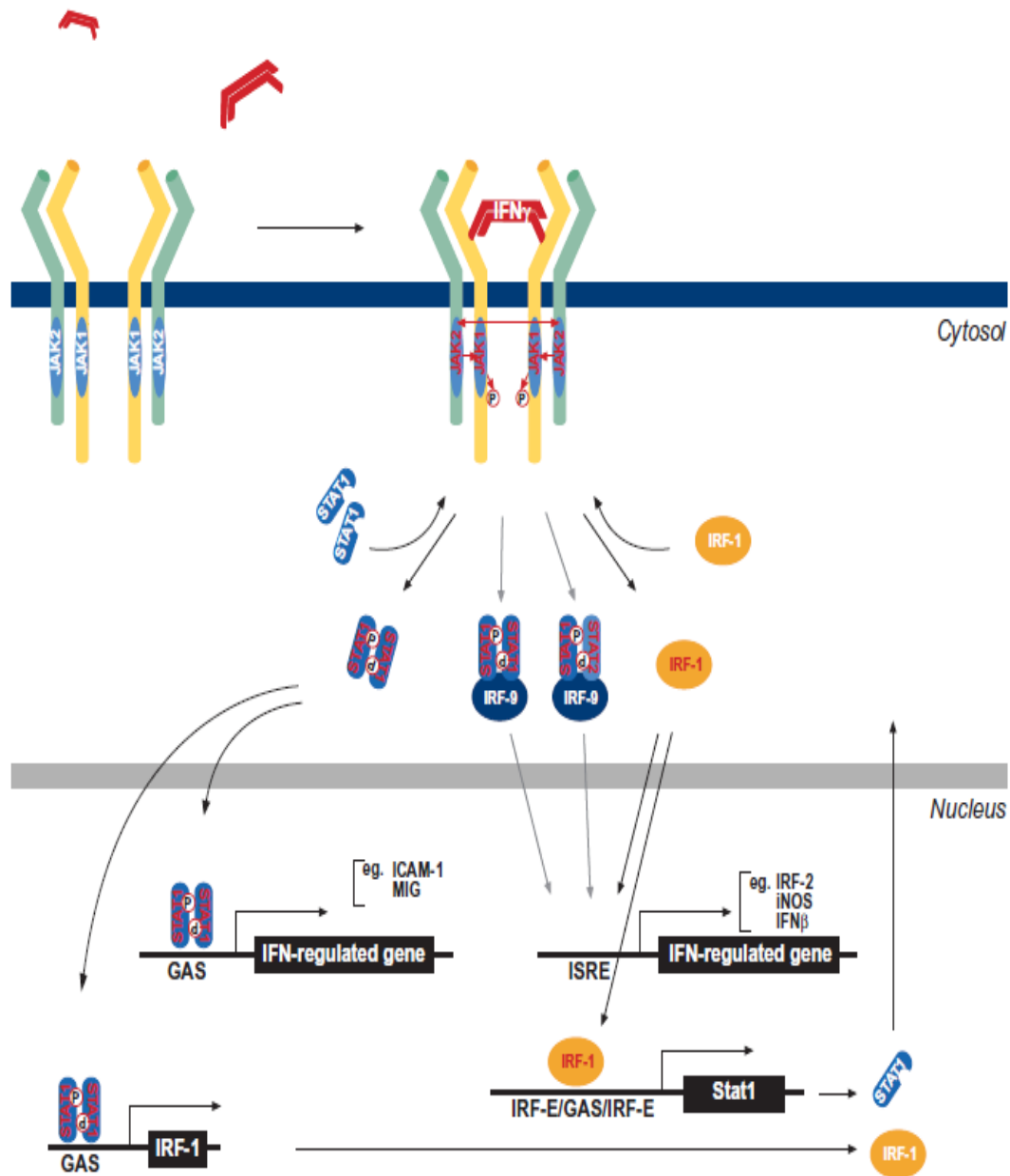


Figura 1. El paradigma actual de la transducción de señales de IFN- γ . La unión del ligando provoca un cambio conformacional en el IFN- γ R (IFNGR1, amarillo; IFNGR2, verde), de tal manera que la cinasa JAK2 inactiva sufre una autofosforilación y activación, que a su vez permite fosforilar Jak1 por Jak2. El Jak1 activado fosforila tirosinas funcionalmente importantes en el residuo 440 de cada cadena IFNGR1 para formar dos sitios adyacentes de acoplamiento para los dominios SH2 de Stat1. El receptor de reclutamiento para el par Stat1 se fosforila cerca del C terminal en Y701 probablemente por Jak2. La fosforilación induce la disociación de un homodímero Stat1 desde el receptor (87).

Los Homodímeros STAT1 viajan al núcleo y se unen al sitio promotor de activación de IFN- γ (GAS) para iniciar / suprimir la transcripción de genes regulados por IFN- γ . Muchos de los genes regulados por IFN- γ son factores de transcripción (por ejemplo, IRF-1), que son activados por IFN- γ y son capaces de conducir la regulación de la siguiente ola de la transcripción (por ejemplo, la inducción de IFN- γ). Los heterodímeros de IRF-9, ISGF3 e IRF 1 son capaces de unirse al elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE), regiones promotoras de genes diana para regular la transcripción.). Moléculas de señalización activadas por IFN- γ se representan en rojo. ICAM-1, molécula de adhesión intercelular-1, MIG, monocina inducida por IFN- γ ; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible (87).

2.2.4 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL IFN- γ

Además de la actividad anti-viral, el IFN- γ tiene amplias funciones biológicas que incluyen: influencia en el ciclo celular, el crecimiento y la apoptosis; tráfico de leucocitos y sus interacciones endoteliales; el cambio de isotipo de anticuerpo por las células B; y funciones de regulación inmune, ya que sobre los linfocitos Th2 inhibe la proliferación, de manera que su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T hacia células efectoras tipo Th1 favoreciendo, por lo tanto, el desarrollo de las respuestas inflamatorias (89), (87).

La función del IFN- γ está centrada en la intervención del macrófago en la inflamación y en la inmunidad adquirida durante la infección. El IFN- γ se encarga de orquestar la respuesta de los macrófagos y además también dirige la atracción de leucocitos y el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, refuerza la actividad de las células NK y regula la función de las células B; además de la inducción de la expresión de moléculas MHC-II lo que facilita su función presentadora de Ag. El lipopolisacárido (LPS) de patógenos y los motivos CpG no metilados presentes en el ADN de patógenos aumentan la producción de IFN- γ .

Por otra parte, el IFN- γ se ha relacionado con la tolerancia inmune en alo-respuestas inmunes y enfermedades autoinmunes.

El aumento de la susceptibilidad y gravedad de la artritis inducida por colágeno (CIA) se ha reportado en cepas de ratones susceptibles genéticamente deficientes en IFN- γ . El IFN- γ puede promover la expresión de la molécula supresora PD-L1 en los tejidos y antagonizar el desarrollo de células Th17. Esto ayuda a mejorar el daño de la enfermedad autoinmune. (88)

2.2.5 REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CÉLULAS T CD4+ POR IFN- γ

2.2.5.1 APOPTÓISIS DE CÉLULAS T CD4⁺

El IFN- γ influye en el ciclo celular, la proliferación celular y la apoptosis. Las células CD4⁺ que carecen de la citocina IFN- γ (o el factor de transcripción Stat1) son resistentes a la muerte celular inducida por la activación (AICD). En efecto, el IFN- γ aumenta en células CD4⁺ la apoptosis a través de una vía mitocondrial. El IFN- γ también se requiere para la producción de las caspasas; la expresión de la caspasa-8 mediada por retrovirus restaura la sensibilidad de células T deficientes en Stat1 a la AICD (98). Recientemente, se ha demostrado en un modelo de tumor que después de la inmunización, las células CD4⁺, pero no CD8⁺ sufren apoptosis (99). La capacidad de respuesta a IFN- γ por las células huésped ha reducido la eficacia de la vacunación tumoral. Así, en las células CD4⁺, la apoptosis puede estar regulada por la señalización de IFN- γ en la homeostasis de linfocitos. Vale la pena señalar que esta regulación puede ser un obstáculo para la terapia inmune efectiva contra el cáncer (87).

2.2.5.2 CÉLULAS T REGULADORAS CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺

Los estudios demostraron que el efecto protector del IFN- γ en la prevención de artritis inducida por colágeno en ratones IFN- γ ^{-/-}, IFN γ R^{-/-} está relacionado con los inducidos por el antígeno CD4⁺ de células T reguladoras (100).

Se ha demostrado que IFN- γ es críticamente necesario para la conversión de las células T convencionales CD4⁺ CD25⁻ a células T CD4⁺ CD25⁺ por incremento en la expresión de Foxp3. El IFN- γ limita así la respuesta inmune mediante la promoción de la generación de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (101).

2.2.5.3 CÉLULAS T- $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden secretar una gran cantidad de IFN- γ después de la estimulación de antígenos (102). Estas células no necesitan presentación del antígeno por las moléculas MHC (103). La evidencia ha demostrado que las células T $\gamma\delta$ también están reguladas por IFN- γ . En ganado infectado con virus de la leucemia bovina, la inoculación de IFN- γ bovino recombinante aumento el número de células T $\gamma\delta$ (104). Las células T $\gamma\delta$ también son activadas por células dendríticas mieloides inmaduras y plasmacitoides que están regulados por IFN- γ (105), (106).

2.2.6 IMPLICACIONES CLÍNICAS.

El IFN- γ es una citocina multipotente y sus funciones biológicas son complejas. La deficiencia de IFN- γ se ha asociado con la patogénesis de muchas enfermedades. El IFN- γ es un gen de copia única y su expresión está regulada en múltiples niveles. A nivel transcripcional, se regula a través de los mecanismos epigenéticos, la accesibilidad de la cromatina y la unión de las proteínas de inhibición o activación a un promotor. El control de la traducción está mediado a través de la localización y la estabilidad del mRNA. (87).

La regulación Post-traduccional se produce a través de la activación de la proteína cinasa R (PKR) por la porción 5' del mRNA; el plegamiento de la proteína en el retículo endoplásmico, y la posible interacción del mRNA con microRNA. Cualquier defecto en estos procesos afectaría a la producción IFN- γ y por lo tanto puede afectar a la patogénesis de muchas enfermedades. Esto es debido a la amplia gama de efectos biológicos de IFN- γ : casi cada tipo de célula se altera tras la interacción con IFN- γ .

El IFN- γ juega un papel importante tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. Por lo tanto, su deficiencia conducirá a la susceptibilidad a infecciones microbianas y el desarrollo del tumor (107). Por ejemplo, la mutación en el gen de IFN- γ ha demostrado que reduce la capacidad del organismo para resistir la infección micobacteriana (108). El IFN- γ también juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. El papel del IFN- γ en la autoinmunidad se ha relacionado con su capacidad de activar células CD4⁺ CD25⁻ en células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺; Th0 en Th1, y para modular el procesamiento de antígenos y la capacidad de inhibición de las células Th17 (100).

2.2.6.1 DIABETES TIPO I

La diabetes tipo 1 es causada por la destrucción crónica de células beta insulinoproducidas en los islotes pancreáticos por los linfocitos T auto-agresivos. Afecta a individuos genéticamente propensos (109). Su patogénesis está relacionada con los mecanismos inmunes celulares, como el aumento en la actividad citotóxica de las células T CD4⁺ y CD8⁺, así como una vía Th1 sesgada. Estas actividades inmunes se han relacionado con defectos de genes múltiples, que conducen a que los individuos sean más susceptibles al desarrollo de diabetes tipo 1 (110).

El IFN- γ puede jugar un papel importante en la diabetes tipo 1. Se observó una disminución de IFN- γ e IL4 en pacientes recién diagnosticados de diabetes (111). El número de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ se encontró que estaba marcadamente reducido en pacientes con diabetes tipo 1 (112). Las células NKT eran también anormales en la diabetes tipo 1 (113). Los defectos en la vía de señalización del IFN- γ en pacientes con diabetes tipo 1 podría dar lugar a un número reducido de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ y la disminución de la apoptosis de las células T CD4⁺ efectoras.

2.2.6.2 ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad reumática causada por una respuesta autoinmune crónica que conduce a la destrucción de la articulación. Se caracteriza por la acumulación de células T efectoras incluyendo CD8 + y CD4 + (114). Se ha propuesto que el IFN- γ inicia la patogénesis, pero inhibe el proceso inflamatorio en una etapa posterior de la enfermedad (115). En ratones, la administración de IFN- γ en la fase inicial de la artritis inducida por colágeno (CIA) ha acelerado el inicio y el aumento de la incidencia de la enfermedad (116). El tratamiento con anticuerpos anti-IFN- γ disminuyó los niveles de anticuerpos anti-colágeno y redujo la severidad de la artritis (115). Sin embargo, se observó que el tratamiento posterior con el mismo anticuerpo agrava la artritis, lo que podría ser contrarrestado con el tratamiento de IFN- γ , lo que indica un efecto inmunosupresor por IFN- γ en una etapa posterior de la AR (115).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se conoce una gran cantidad de beneficios obtenidos al emplear Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) como terapia, los cuales son producto de las características inmunomoduladoras que presenta este hemoderivado. Sin embargo, aunque no se conoce con claridad el mecanismo de acción de estos extractos, se ha observado que promueve la producción de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 por Linfocitos T, promueve la producción de TNF- α en células mononucleares humanas; así como la secreción de IFN- γ y de IL-12 en cultivos in vitro de células de bazo de ratón.

Es por esto que en el presente trabajo evaluaremos la secreción de IFN- γ , en cultivos de células Jurkat clone E6, células T transformadas de LLA, estimulados con EDL (Transferon® oral). Esta citocina proinflamatoria, es de gran importancia ya que entre sus múltiples características están la autoactivación celular, la activación de células como macrófagos, neutrófilos, Linfocitos B, células NK y particularmente la diferenciación de Linfocitos T a Linfocitos Th1 que es de especial importancia para el control de infecciones producidas por patógenos intracelulares.

Así mismo es de gran interés identificar si esta respuesta biológica de secreción de IFN- γ es viable y reproducible para que nos permita establecerla como una prueba de control biológico de los lotes de Transferon oral ® (EDL) producidos en la ENCB, ya que actualmente se cuenta con una prueba biológica de un modelo murino de infección con HSV-1, donde se utilizan gran cantidad de animales y el costo y tiempo de evaluación es elevado.

4. HIPÓTESIS

Se ha observado que el EDL tiene la capacidad de inducir la secreción de citocinas inmunomoduladoras en células T. Por lo que esperamos que el Extracto Dializable de Leucocitos (Transferon® oral) induzca la producción de INF- γ , de manera dosis dependiente, en una línea celular tumoral de linaje T que sea tratada con diferentes concentraciones de éste extracto.

También deberemos observar que dicho efecto en la secreción de IFN- γ se conserve entre todos los lotes de Transferon ® evaluados y se comporten de manera reproducible con las concentraciones analizadas.

5. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la inducción de la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 tras ser estimuladas con diferentes concentraciones de Transferon $\text{\textcircled{R}}$ oral (EDL)

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las concentraciones adecuadas de Transferon oral $\text{\textcircled{R}}$ (EDL) a las cuales se efectúa la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6.
- Evaluar el tratamiento de Transferon oral $\text{\textcircled{R}}$ (EDL) a diferentes tiempos para determinar el efecto del tiempo sobre la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6.
- Analizar la reproducibilidad de la secreción de IFN- γ inducida por diferentes lotes de Transferon oral $\text{\textcircled{R}}$ (EDL) evaluados.
- Clasificar la producción de IFN- γ de los diversos lotes de Transferon $\text{\textcircled{R}}$ oral evaluados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Transferon oral ® (Extracto Dializable de Leucocitos)

El Transferon® oral (Extracto Dializable de Leucocitos) proviene del rompimiento del paquete de leucocitos ("buffy coat") de una unidad de sangre para donación (aprox.450mL), seguida de un proceso de diálisis donde se obtiene la fracción de bajo peso molecular que dializa.

El EDL es lábil al calor, estable a temperatura ambiente pero se recomienda mantenerlo a temperaturas de 0° C, para prolongar su actividad biológica. En el caso Transferon® oral (Extracto Dializable de Leucocitos), producido en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas las moléculas están comprendidas en un rango de 1 a 10 kDa.

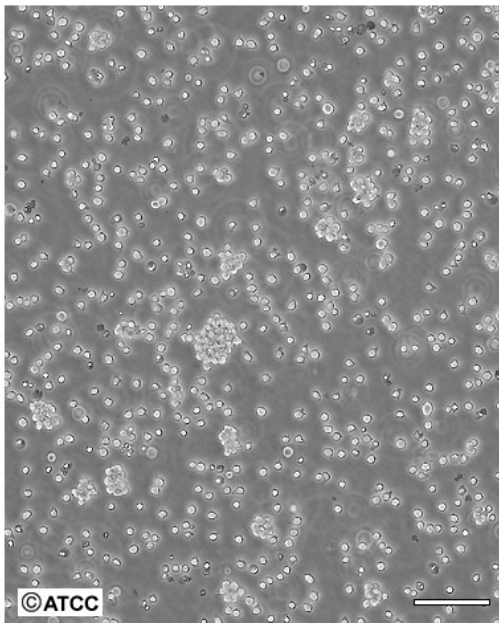
El material biológico que se utiliza para la preparación del Transferon ®, en la ENCB/IPN, es proporcionado por diferentes bancos de sangre certificados de la Cd. de México, y se obtiene a partir de donadores de sangre sanos, los paquetes celulares son sometidos a diferentes pruebas biológicas todas ellas descritas en la Norma Oficial Mexicana: NOM-003-SSA2-1993 "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos" (117). Por considerarse un hemoderivado y ser un inmunorregulador, en diferentes padecimientos de humanos, la fabricación del Transferon ®, debe someterse a la NOM-0059-SSA 2006 "Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos". El proceso de producción sigue buenas prácticas de fabricación y cuenta con controles analíticos que demuestran reproducibilidad entre lotes. Actualmente se utiliza la infección con HSV-1 en un modelo murino de sobrevida como prueba biológica para evaluar la eficacia de cada lote de Transferon ® producido en la ENCB del IPN.

Lotes de Transferon® utilizados				
11D01	11F02	11H05	11M02	12C05
11D02	11G04	11J01	12A01	12C06
11E01	11G05	11K01	12C01	12C07
11E02	11H01	11K03	12C03	12D08
11F01	11H02	11M01	12C04	12F09

b. Células Jurkat

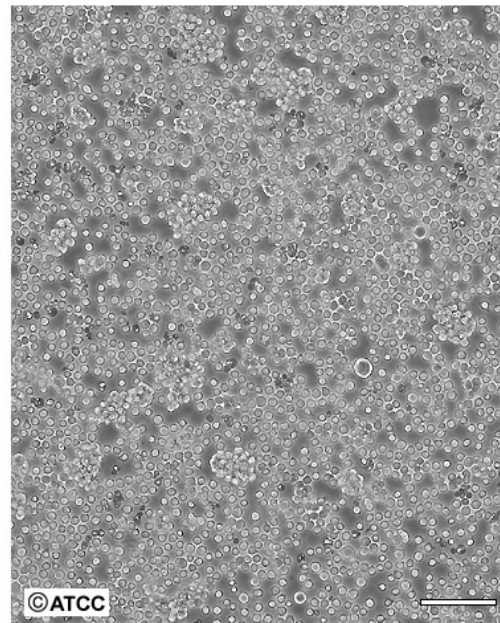
Se emplearon cultivos de células Jurkat clone E6 obtenidas del ATCC (Linfocitos T humanos provenientes de Leucemia Linfoblástica Aguda), catalogo TIB-152, las cuales se estimularon con diferentes lotes y concentraciones de extracto dializable de leucocitos oral, Transferon®; y se evaluó la inducción de la secreción de IFN- γ en los sobrenadantes de estas células a diferentes tiempos. Ésta citocina se cuantificó mediante un kit de ELISA.

ATCC Number: **TIB-152**
 Designation: **Jurkat (Clone E6-1)**



Low Density

Scale Bar = 100 μ m



High Density

Scale Bar = 100 μ m

c. Reactivos

REACTIVO	No. de Catalogo	Marca
RPMI + GlutaMax 1640	61870-036	GIBCO
Suero fetal bovino	16000-044	GIBCO
DMSO (Dimetil sulfóxido) ≥99.5% (Grado Cultivo).	D4540	SIGMA
Azul tripan	T8154	FLUKA/SIGMA
Concanavalina A (ConA)	10576-015	GIBCO
Lipopolisacárido (LPS)	TLRL-PELPS	INVIVOGEN
Kit ELISA IFN-γ humano	555142	BD OptEIA
MATERIAL	No. de Catalogo	Marca
Botellas para cultivo de 75 cm ²	430725	CORNING
Botellas para cultivo de 25 cm ²	3055	CORNING
Tubos para centrifuga de 15 mL	430791	CORNING
Tubos para centrifuga de 50 mL	430291	CORNING
Pipetas de 2 mL	4021	CORNING
Pipetas de 10 mL	4101	CORNING
Microscopio Invertido	—	Leica
Cámara de Newbauer	—	Bright Line
Micropipetas	—	Eppendorf
Criotubos de 1.2 mL, fondo cónico	430658	CORNING MEXICANA

Placas de cultivo celular de 24 pozos	3524	Corning-Costar
Tubos eppendorf 1.5 mL	MCT-150-C	Axygen
Centrífuga	_____	BECKMAN
Recipiente para desechos	_____	_____
Congelador -70°C y/o contenedor de nitrógeno líquido	_____	_____

7.1 EXPANSIÓN DE CÉLULAS JURKAT CLONE E6 EN CULTIVOS SUCESIVOS

El cultivo celular y los demás procedimientos se realizaron siguiendo la secuencia experimental que se describe a continuación:

a) Descongelación de las células.

1. Colocar el vial de las células congeladas en agua a 37°C, durante 2 minutos.
2. Limpiar la tapa del tubo con un algodón con etanol al 70%. Todas las operaciones a partir de este punto se realizan en condiciones de esterilidad, dentro de la campana de flujo laminar.
3. Colocar 9.0 mL de medio de cultivo completo (RPMI + GlutaMax 1640 suplementado con suero fetal bovino a una concentración del 10%) en un tubo para centrifuga de 15 mL.
4. Usando una pipeta de 2 mL, transferir el contenido del vial al tubo de centrifuga, cerrar el tubo y agitar suavemente por inversión del tubo (tres veces).
5. Centrifugar a 125 x g durante 5 min. a temperatura ambiente.
6. Decantar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 5 mL de medio de cultivo completo.
7. Tomar una alícuota de 10 µl y realizar la cuenta con azul tripan.

8. Incubar las células a 37°C con 5% de CO₂.

b) Sub-cultivo de las células.

A partir de una botella de cultivo con una concentración celular entre 1 X10⁶ - 2 X10⁶ células/mL o una confluencia aproximada del 80% en la botella:

1. Pasar el contenido de la botella de 25 cm² (5mL) a un tubo para centrifuga de 15 mL.
2. Centrifugar las células a 125 x g durante 5 min. a temperatura ambiente.
3. Decantar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 1 mL de medio de cultivo completo.
4. Realizar la cuenta de las células por exclusión de azul tripan en la cámara de Newbauer.
5. Adicionar medio de cultivo necesario para tener una concentración celular de 1 X10⁵- 2 X10⁵ células/mL.
6. Transferir las células a botellas de 25 cm² o de 75cm² y etiquetar las botellas.
7. Incubar las células a 37°C con 5% de CO₂.

7.2 CONTEO DE CÉLULAS CON AZUL TRIPAN.

A partir de una suspensión celular de 1 mL.

- I. Realizar una dilución 1:20 de la suspensión celular con azul tripan al 0.2 %.
- II. Homogenizar por pipeteo.
- III. Colocar una alícuota de la dilución realizada en la cámara de Newbauer (Fig. 3).
- IV. Realizar la cuenta celular (Células transparentes vivas, células azules muertas).
- V. Contar los 4 cuadrantes de los extremos (letra L, Fig. 2).
- VI. Sumar el número de células y dividirlo entre 4 (promedio).

VII. Realizar los cálculos de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = (\text{Promedio}) \times (\text{FD}) \times (10,000)$$

Dónde: FD= Factor de dilución

Nota: En el paso I se puede realizar una dilución mayor o menor dependiendo de la concentración celular con la que se cuente, procurar realizar una dilución que permita contar 40-100 células por cuadrante.

	No. de cuadrante	No. de células
	1	56
	2	65
	3	59
	4	68
Total de células		248
Promedio		62

$$\text{Número de células/mL} = 62 \times 40 \times 10,000$$

$$\text{Número de células/mL} = 2.48 \times 10^7 \text{ células/mL}$$

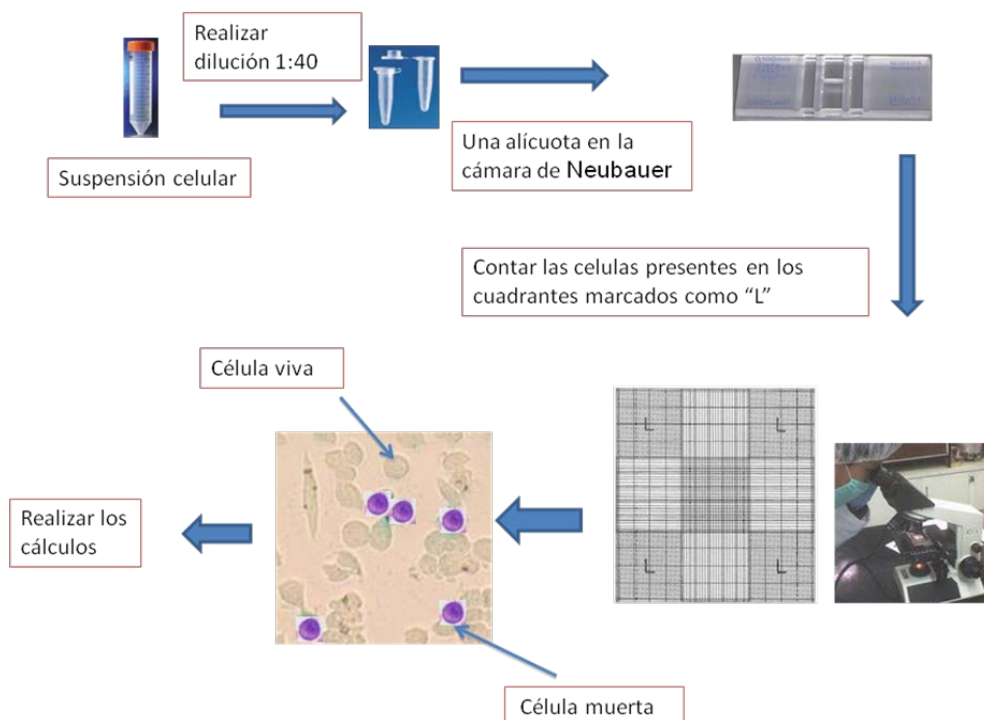


Figura 2. Diagrama de flujo para realizar la cuenta de células por exclusión con azul tripan.

7.3 CULTIVOS DE CÉLULAS JURKAT CLONE E6 CON DIFERENTES LOTES DE EDL.

a) A partir de 3 botellas de 25 cm² con una confluencia aproximada del 80 %.

Dilución:	1:20	
Cuadrante	Vivas	Muertas
1	158	4
2	163	5
3	165	3
4	147	5
TOTAL	633	17

Dilución:	1:20	
Cuadrante	Vivas	Muertas
1	154	6
2	158	5
3	161	3
4	147	0
TOTAL	620	14

$$= (633/4) \times 20 \times 10^4 = 3.16 \times 10^7 \text{ cel/mL}$$

$$= (620/4) \times 20 \times 10^4 = 3.1 \times 10^7 \text{ cel/mL}$$

Promedio = 3.1×10^7 cel/mL

- Volumen de la suspensión celular:

- 1 pozo ----- 500 µL

50 pozos ----- x x = 25 mL



❖ Se contempla este número de pozos, ya que se van a sembrar 2 placas de 24 pozos cada una, dando un total de 48 pozos y agregando un exceso de 2 pozos, resultando en los 50 pozos.

- Suspensión celular: $(1 \times 10^6 \text{ cel/mL}) \times 25 \text{ mL} = 2.5 \times 10^7 \text{ cel/mL}$

- $3.1 \times 10^7 \text{ cel} \text{ ----- } 1 \text{ mL}$

$2.5 \times 10^7 \text{ cel} \text{ ----- } x \quad x = 0.806 \text{ mL} = 806 \text{ } \mu\text{L} \text{ células}$

- 25 mL de volumen final – 0.806 mL células = 24.194 mL de medio cRPMI.

- Por lo tanto preparar la suspensión celular en un tubo para centrifuga de 50 mL de capacidad agregando 806 μL de células y 24.194 mL de medio cRPMI. Mezclar bien.

b) Sembrar $1 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ ($5 \times 10^5 \text{ cel/pozo}$) en cada placa de cultivo de 24 pozos. Agregar a cada pozo 500 μL de la suspensión celular.

c) Probar los lotes de EDL oral (11F01, 11H05, 11M01, 12C05, 11J01, 11K01, 11M02)

-El tratamiento con EDL se agrega en 500 μL /pozo de cRPMI.

$C_1 = x \quad V_1 = 500 \text{ } \mu\text{L}$

$C_2 = 10 \text{ } \mu\text{g/mL} \quad V_2 = 1000 \text{ } \mu\text{L}$

De la fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \longrightarrow C_1 = (C_2 V_2) / V_1 = [(10 \text{ } \mu\text{g/mL}) \times (1000 \text{ } \mu\text{L})] / (500 \text{ } \mu\text{L}) \\ = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Concentración de EDL oral = $2 \text{ mg}/5 \text{ mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$

- $400 \text{ } \mu\text{g} \text{ ----- } \text{mL}$

$20 \text{ } \mu\text{g} \text{ ----- } x \quad x = 0.05 \text{ mL} = 50 \text{ } \mu\text{L}$

- Solución 1 = $S_1 = 50 \text{ } \mu\text{L}_{\text{EDL oral}} + 950 \text{ } \mu\text{L}_{\text{medio cRPMI}} \longrightarrow [10 \text{ } \mu\text{g/mL}]$

↓
Dilución 1:10

- Solución 2 = $S_2 = 100 \text{ } \mu\text{L}_{\text{EDL oral}} + 900 \text{ } \mu\text{L}_{\text{medio cRPMI}} \longrightarrow [1.0 \text{ } \mu\text{g/mL}]$

↓
Dilución 1:10

- Solución 3 = $S_3 = 100 \mu\text{L}_{\text{EDL oral}} + 900 \mu\text{L}_{\text{medio cRPMI}}$ [0.1 $\mu\text{g/mL}$]

- Preparar cada concentración de todos los lotes a evaluar.
- Agregar 500 μL a los pozos a evaluar.

c) Incluir controles de ConA (25 $\mu\text{g/mL}$), LPS (1.0 $\mu\text{g/mL}$) y medio cRPMI.
Los pozos tienen ya 500 μL , por lo que se necesita concentrar dos veces el estímulo.

-Stock ConA: 1mg/mL

1000 μg ----- mL

100 μg ----- x x= 100 μL ConA

Solución de ConA: 100 μL de ConA + 1900 μL de medio cRPMI.

- Agregar 500 μL a los pozos a evaluar.

-Stock LPS: 5mg/mL

Hacer una dilución previa, debido a que la concentración del stock es muy alta.

5000 μg ----- mL

50 μg ----- x x= 10 μL + 990 μL de medio cRPMI.

Preparar la solución a partir del nuevo stock de LPS.

50 μg ----- mL

4.0 μg ----- x x= 80 μL LPS

Solución de LPS: 80 μL de LPS + 1920 μL de medio cRPMI

- Agregar 500 μL a los pozos a evaluar.

- **Medio cRPMI.**

- Agregar 500 µL de medio cRPMI a los pozos a evaluar.

d) Diseño de placa.

A continuación se muestra un ejemplo de la distribución de las muestras de los sobrenadantes celulares y sus respectivos tratamientos en la placa de cultivo.

A)

Lote 11M01 100 pg/mL	Lote 11M01 1 ng/mL	Lote 11M01 10 ng/mL	Lote 11M01 100 ng/mL	Lote 11M01 1 µg/mL	Lote 11M01 10 µg/mL
Lote 11M01 100 pg/mL	Lote 11M01 1 ng/mL	Lote 11M01 10 ng/mL	Lote 11M01 100 ng/mL	Lote 11M01 1 µg/mL	Lote 11M01 10 µg/mL
Lote 11M02 100 pg/mL	Lote 11M02 1 ng/mL	Lote 11M02 10 ng/mL	Lote 11M02 100 pg/mL	Lote 11M02 10 ng/mL	Lote 11M02 10 µg/mL
Medio cRPMI	Medio cRPMI	ConA 25 µg/mL	LPS 1.0 µg/mL		

B)

Lote 11F01 10 µg/mL	Lote 11F01 1.0 µg/mL	Lote 11F01 0.1 µg/mL	Lote 11M01 10 µg/mL	Lote 11M01 1.0 µg/mL	Lote 11M01 0.1 µg/mL
Lote 11H05 10 µg/mL	Lote 11H05 1.0 µg/mL	Lote 11H05 0.1 µg/mL	Lote 11M02 10 µg/mL	Lote 11M02 1.0 µg/mL	Lote 11M02 0.1 µg/mL
Lote 11J01 10 µg/mL	Lote 11J01 1.0 µg/mL	Lote 11J01 0.1 µg/mL	Lote 12C05 10 µg/mL	Lote 12C05 1.0 µg/mL	Lote 12C05 0.1 µg/mL
Lote 11K01 10 µg/mL	Lote 11K01 1.0 µg/mL	Lote 11K01 0.1 µg/mL	ConA 25 µg/mL	LPS 1.0 µg/mL	Medio cRPMI

Figura 3. Esquema de los diseños de placas para cultivo de células Jurkat clone E6 con tratamiento de EDL a diferentes concentraciones. A) El sobrenadante de los controles y de los lotes 11M01 y 11M02 que están marcado con rojo se colectaron a las 48 horas y se evaluaron a distintas concentraciones de EDL oral (Transferon®) para determinar a cuales de éstas se efectuaba la producción de IFN- γ en el cultivo celular. B) Los sobrenadantes que están en color negro se colectaron a las 72 horas, ya que como se muestra en los resultados éste fue el tiempo óptimo para la secreción de la citocina de interés, así como también se determinó el rango de concentraciones de EDL oral (Transferon®) como tratamiento eficaz para la producción de IFN- γ . Se evaluaron dos tiempos para determinar el tiempo óptimo de estímulo para la secreción de IFN- γ por células Jurkat clone E6.

e) Incubar las placas en atmosfera de CO₂ por 48 ó 72 horas, según sea el caso.

- f) Después del tiempo de incubación, retirar a cada pozo con una micropipeta, 500 µL del sobrenadante. Guardar el sobrenadante en tubos eppendorff y conservar a -70°C hasta su uso.
- g) Repetir el ensayo probando otros lotes de EDL.
- h) Recuperar los sobrenadantes de los tubos eppendorff (descongelarlos a temperatura ambiente) y sembrarlos en la placa de ELISA.

7.4 PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IFN- γ MEDIANTE UN KIT DE ELISA

7.4.1 PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DEL ESTÁNDAR DE IFN- γ RECOMBINANTE HUMANO.

1. **Reconstitución:** abrir cuidadosamente el vial del estándar liofilizado de IFN- γ recombinante humano, para evitar la pérdida de material. Reconstituir el estándar liofilizado con 1,0 mL de agua desionizada para producir un stock del estándar. Permitir que el estándar se establezca durante al menos 15 minutos antes de realizar las diluciones. Vortexear suavemente para mezclar.
2. **Almacenamiento / manipulación de estándar reconstituido:** Después de la reconstitución, inmediatamente hacer alícuotas del estándar en viales de polipropileno de 50 µl por vial y congelar a -80 ° C durante un máximo de 6 meses. Si es necesario, almacenar a 2-8 ° C por un máximo de 8 horas antes de alícuotear / congelar. No dejar reconstituido el estándar a temperatura ambiente.
3. **Procedimiento para realizar la curva de calibración.**
 - a. Preparar una solución de 300 pg / mL del estándar a partir de la solución stock. Vortexear para mezclar.
 - b. Añadir 300 µl del diluyente de ensayo a 6 tubos. Etiquetar como 150 pg / mL, 75pg / mL, 37,5 pg / mL, 18,8 pg / mL, 9,4 pg / mL, y 4,7 pg / mL.

c. Realizar diluciones en serie mediante la adición de 300 μl de cada estándar para el siguiente tubo, y vortexear entre cada transferencia. El diluyente de ensayo sirve como el estándar cero (0 pg / mL).

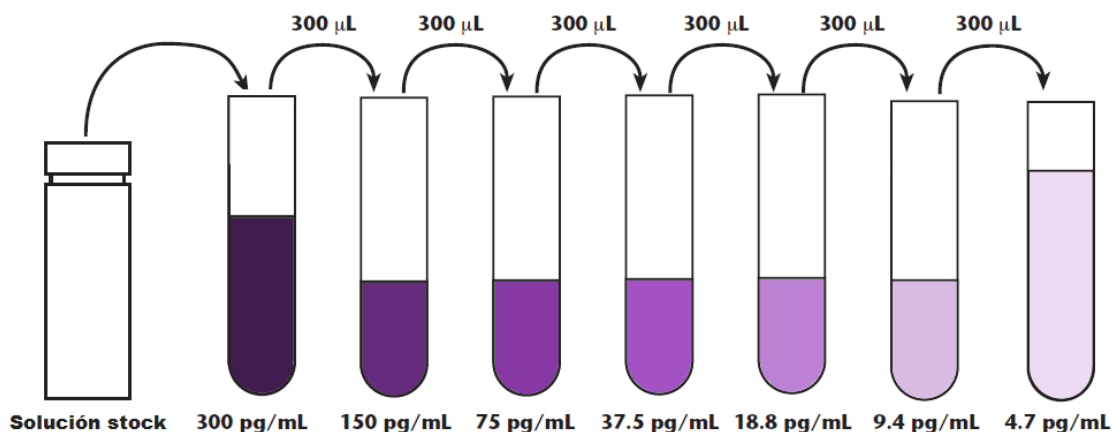


Figura 4. Representación gráfica que muestra las diluciones seriadas llevadas a cabo para realizar la curva de calibración.

d. Preparación de la solución Detector Trabajo: Añadir el volumen requerido de anticuerpo de detección al diluyente de ensayo. Dentro de los 15 minutos antes de usar, agregar la cantidad requerida de enzima reactivo Estreptavidina-peroxidasa de rábano conjugada (SAV-HRP) y agitar o mezclar bien. Para un plato de 96 pozos, preparar 12 mL de Detector de Trabajo. Deseche cualquier detector de trabajo restantes después de su uso.

7.4.2 PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR EL ENSAYO.







































1. Cubrir los micropocillos de la placa con 100 μl del anticuerpo de captura diluido en buffer de revestimiento (Coating Buffer). Sellar la placa e incubar toda la noche a 4°C
2. Aspirar los pocillos y lavar 3 veces con 300 μl / pocillo de Buffer de lavado. Después del último lavado, invertir la placa y sacudir sobre un papel absorbente para eliminar cualquier volumen residual de Buffer de lavado.

3. Bloquear las placas con 200 μ l/pocillo de diluyente de ensayo. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Aspirar la placa y realizar los lavados como en el paso 2.
5. Preparar las diluciones del estándar y la muestra (sobrenadante recuperado a las 48 y 72 horas) en el diluyente de ensayo. Ver el Procedimiento para la preparación y manipulación del estándar de IFN- γ recombinante humano del presente protocolo.
6. Pipetear 100 μ L de cada estándar, muestra y el control adecuado en los pocillos apropiados. Ver diseño de placa de ELISA. Sellar de placa e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
7. Aspirar y Lavar como en el paso 2, pero con 5 lavados totales.
8. Añadir 100 μ l de Detector de Trabajo (reactivo detector de anticuerpos + enzima SAV-HRP) a cada pocillo. Sellar la placa e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Aspirar / Lavar como en el paso 2, pero con 7 lavados totales. NOTA: En esta etapa de lavado final, humedecer los pocillos en buffer de lavado durante 30 segundos a 1 minuto para cada lavado.
10. Añadir 100 μ l de solución de sustrato a cada pocillo. Incubar la placa (sin tapa) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
11. Añadir 50 μ l de solución de paro a cada pocillo.
12. Leer la absorbancia a 450 nm dentro de los 30 minutos de reacción de parada. Si la corrección de longitud de onda está disponible, restar la absorbancia de 570 nm a la absorbancia de 450 nm.

7.5 DISEÑO DE PLACA DE ELISA

A continuación se muestra un ejemplo de la distribución de las muestras de sobrenadantes y los controles en la placa de ELISA.

A)

300	pg/mL	100 pg/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	1.0 µg/mL	10 µg/mL	ConA			
150	pg/mL				11M01			25 µg/mL			
75	pg/mL							LPS			
37.5	pg/mL	100 pg/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	1.0 µg/mL	10 µg/mL	1.0 µg/mL			
18.8	pg/mL				11M02			RPMI			
9.4	pg/mL										
4.7	pg/mL										
0	pg/mL										

B)



300	pg/mL	10 µg/mL			10 µg/mL			10 µg/mL			ConA
150	pg/mL	1.0 µg/mL	11F01		1.0 µg/mL	11F02		1.0 µg/mL	11H05		25 µg/mL
75	pg/mL	0.1 µg/mL			0.1 µg/mL			0.1 µg/mL			LPS
37.5	pg/mL	10 µg/mL			10 µg/mL			10 µg/mL			1.0 µg/mL
18.8	pg/mL	1.0 µg/mL	11J01		1.0 µg/mL	11K01		1.0 µg/mL	11M02		RPMI
9.4	pg/mL	0.1 µg/mL			0.1 µg/mL			0.1 µg/mL			
4.7	pg/mL	10 µg/mL	12C01		0.1 µg/mL			10 µg/mL	12C05		
0	pg/mL	1.0 µg/mL			0.1 µg/mL			1.0 µg/mL			

Figura 5. Ejemplo del esquema del diseño de placa de ELISA. Cada concentración de cada lote se realizó por triplicado. A) Los sobrenadantes de los lotes resaltados en rojo (1M01 y 11M02) se obtuvieron a las 48 horas de incubación de células Jurkat clone E6 con el estímulo de EDL a las diferentes concentraciones; mientras que B) los sobrenadantes de los lotes resaltados en negro se obtuvieron a las 72 horas.

13. Realizar las placas de ELISA necesarias para evaluar todos los lotes de EDL. Repetir el protocolo a las mismas condiciones

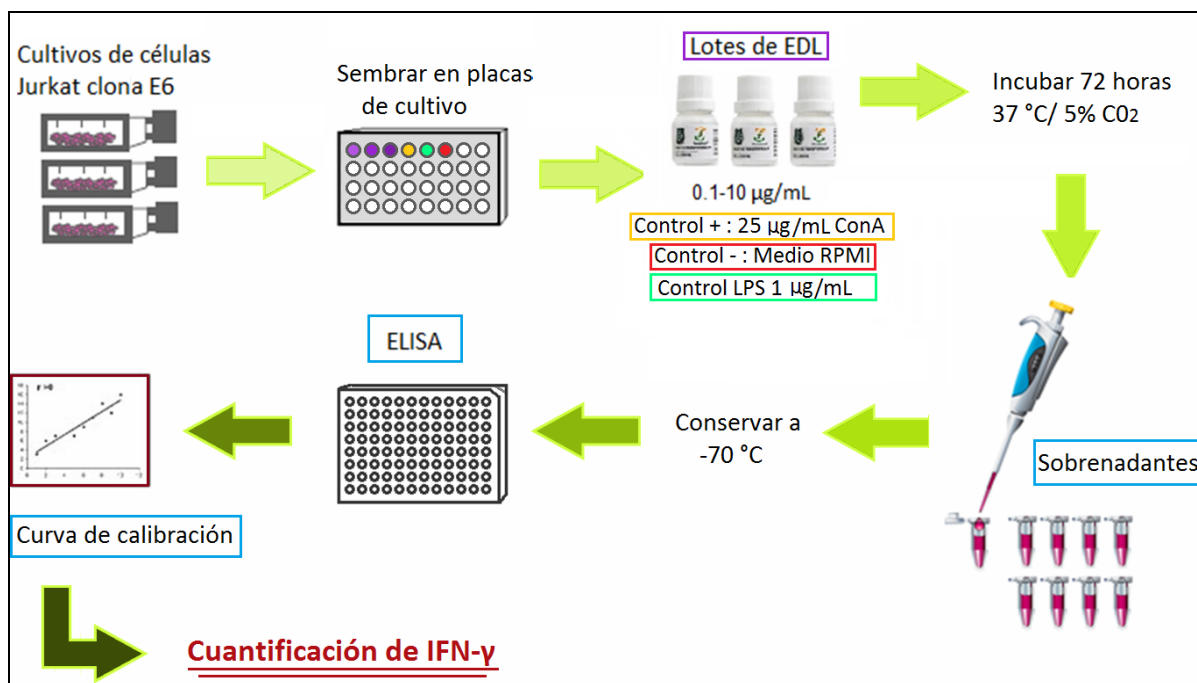


Figura 6. Esquema general de trabajo. Representación que muestra los pasos en resumen para llevar a cabo la cuantificación de IFN- γ en todos los lotes de Transferon® evaluados

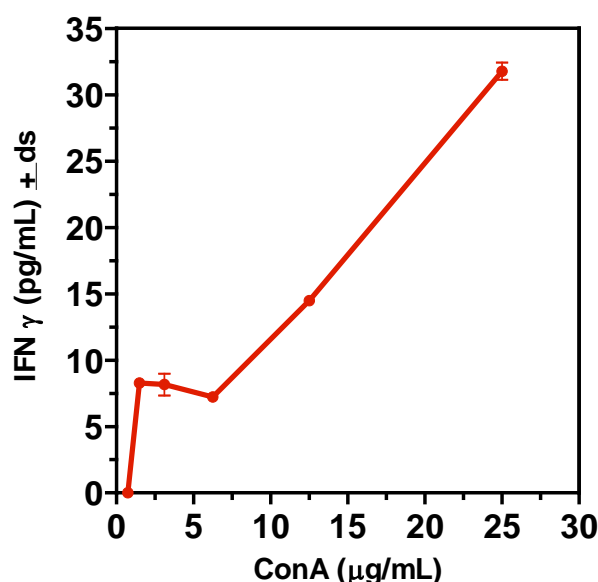
8. ESTADISTICA

Se realizó un análisis de varianza de 1 vía (ANOVA de 1 VIA) seguida de una prueba de bonferroni como análisis estadístico para determinar si hay diferencias significativas entre los lotes de EDL oral evaluados y los controles ($P < 0.05$)

9. RESULTADOS

Inicialmente se realizó una curva dosis-respuesta de ConA (mitógeno policlonal) para evaluar la producción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 (Grafica 1). En esta grafica se observa que con 25 $\mu\text{g/mL}$ del mitógeno se obtiene aproximadamente 32 pg/mL de IFN- γ . Por lo que la ConA se utilizó como control positivo en la secreción de IFN- γ para los experimentos posteriores.

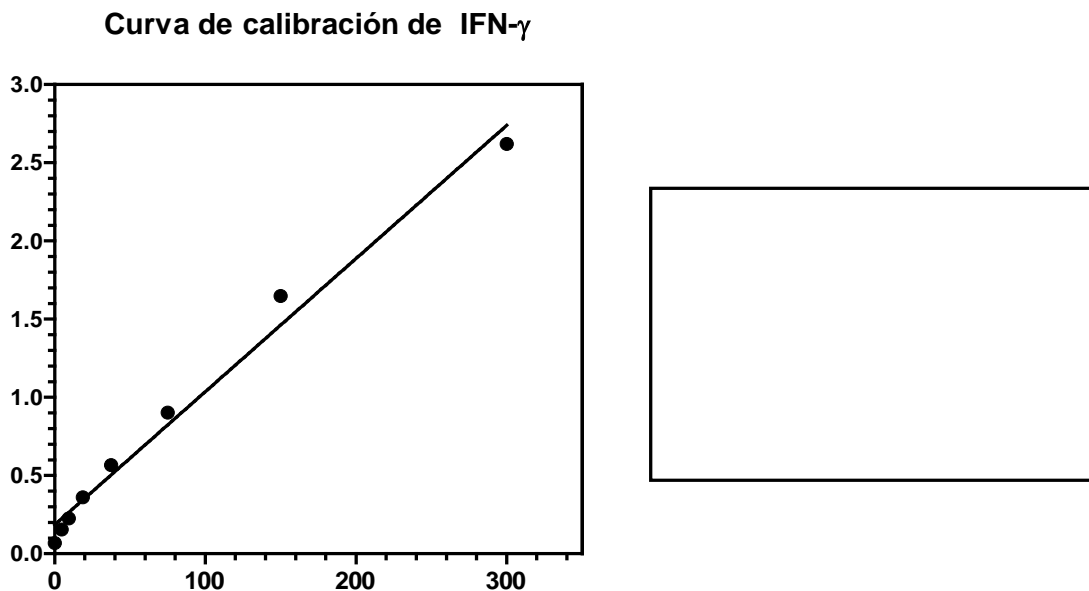
Producción de IFN γ por células Jurkat estimuladas con el mitógeno Con A.



Gráfica 1. Curva dosis-respuesta para la producción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Concanavalina A (ConA). Esta gráfica demuestra que las células son capaces de producir IFN- γ cuando se tratan con mitógenos como la ConA como control positivo.

En la gráfica 2 se muestra un ejemplo de la curva de calibración del estándar interno de IFN- γ para la cuantificación en los sobrenadantes de células Jurkat clone E6, de IFN- γ mediante la técnica de ELISA. Se observa que la curva tiene una r^2 mayor a 0.90. La r^2 indica el grado de asociación lineal entre la variable y la respuesta por lo que a mayor

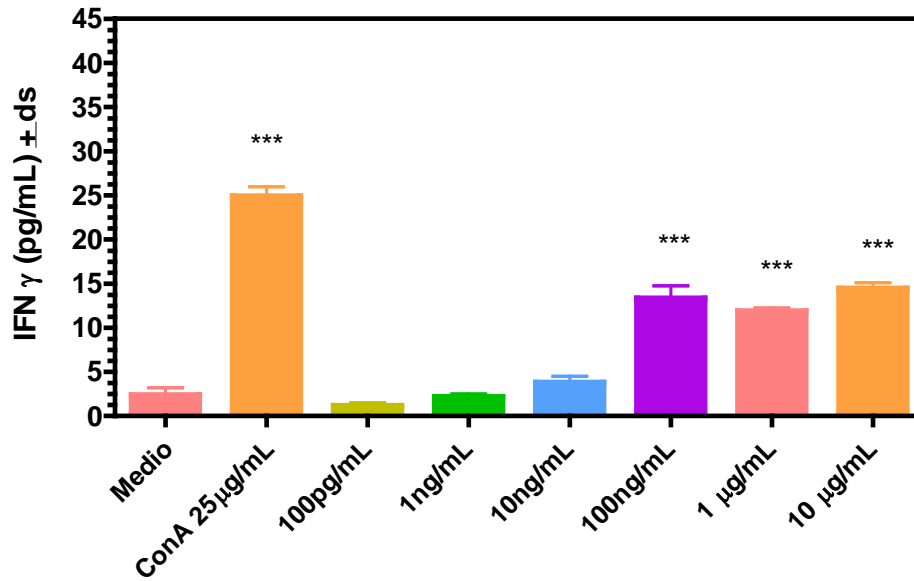
índice de r^2 , la cuantificación de IFN- γ será más exacta, lo cual demuestra que el método es adecuado para la cuantificación de la citocina de interés.



Gráfica 2. Ejemplo de la curva de calibración de IFN- γ obtenida. Se realizó una curva de calibración por cada placa de ELISA que se efectuó, y las muestras de los sobrenadantes de células Jurkat se cuantificaron con la curva de calibración respectiva.

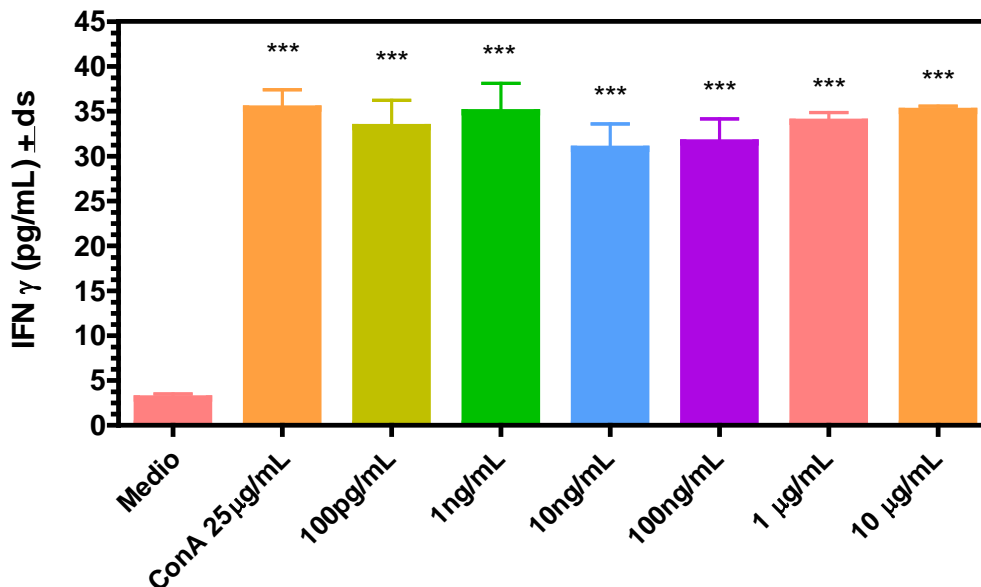
Para analizar si el Transferon® oral era capaz de inducir la secreción de IFN- γ , se estimularon células Jurkat clone E6 con diversas concentraciones de EDL oral, desde 100 pg/mL hasta 10 μ g/mL. Otra variable que se tomó en cuenta fue el tiempo de estímulo en las células, por lo que se evaluaron estas concentraciones a la 48 y 72 horas. En las gráficas 3 y 4 se muestra el efecto del tiempo que duró la estimulación con el lote 11M01 de EDL oral, en estas graficas se observa que la duración del estímulo es importante para la secreción de IFN- γ , ya que a las 72 horas se muestra mayor cantidad de secreción de la citocina evaluada.

Producción de IFN γ por células Jurkat con Transferón oral lote 11M01 (48h)



Gráfica 3. Efecto en la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Transferon® oral (EDL) del lote 11M01 a diferentes concentraciones incubadas por 48 horas.

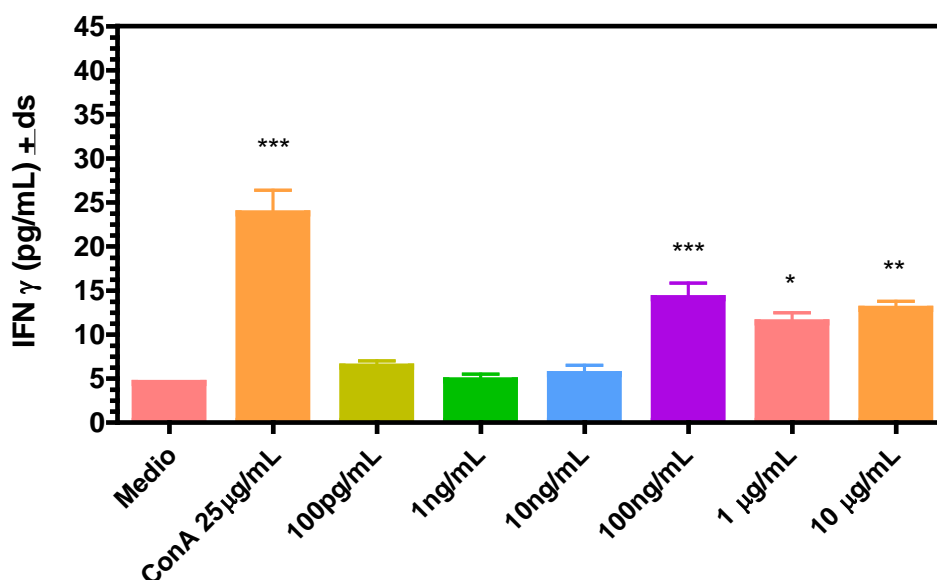
Producción de IFN γ por células Jurkat con Transferón oral lote 11M01 (72 hrs).



Gráfica 4. Efecto en la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Transferon® oral (EDL) del lote 11M01 a diferentes concentraciones incubadas por 72 horas.

En las gráficas 4 y 5 se muestran las concentraciones utilizadas de Transferon® y los lotes que se evaluaron a las 72 horas y se observa que la respuesta de la secreción de IFN- γ no es dosis- dependiente; sin embargo, las concentraciones a las cuales se obtuvieron mayor respuesta en la secreción de IFN- γ para los dos lotes de Transferon® fueron 100 ng/mL, 1 μ g/mL y 10 μ g/mL(concentraciones reproducibles para ambos lotes); por lo que fueron estas tres concentraciones las que se evaluaron para los siguientes lotes de Transferon oral ®.

Producción de IFN γ por células Jurkat con Transferón oral lote 11M02 (72h)



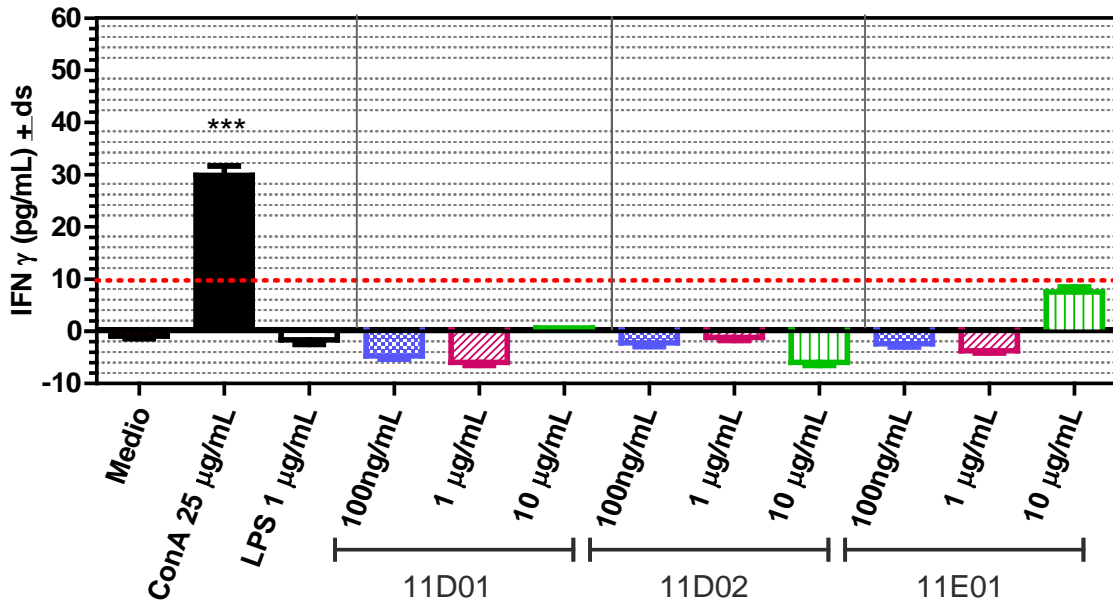
Gráfica 5. Efecto en la secreción de IFN- γ en células Jurkat clone E6 mediante el estímulo con Transferon® oral (EDL) del lote 11M02 a diferentes concentraciones incubadas por 72 horas. Por lo anterior los experimentos posteriores ser realizaron sólo a las 72 horas.

A continuación se muestran las gráficas de los resultados que se obtuvieron evaluando los 25 lotes de Transferon® oral (EDL) con las tres concentraciones propuestas. Se graficaron los datos resultantes interpolando en las curvas de calibración de IFN- γ de cada placa de ELISA realizada. El límite de detección del método utilizado es de 4.7 pg/mL.

La línea roja punteada corresponde al límite de IFN- γ utilizado como criterio para la aceptación de la secreción de IFN- γ de los lotes de Transferon® oral (EDL).

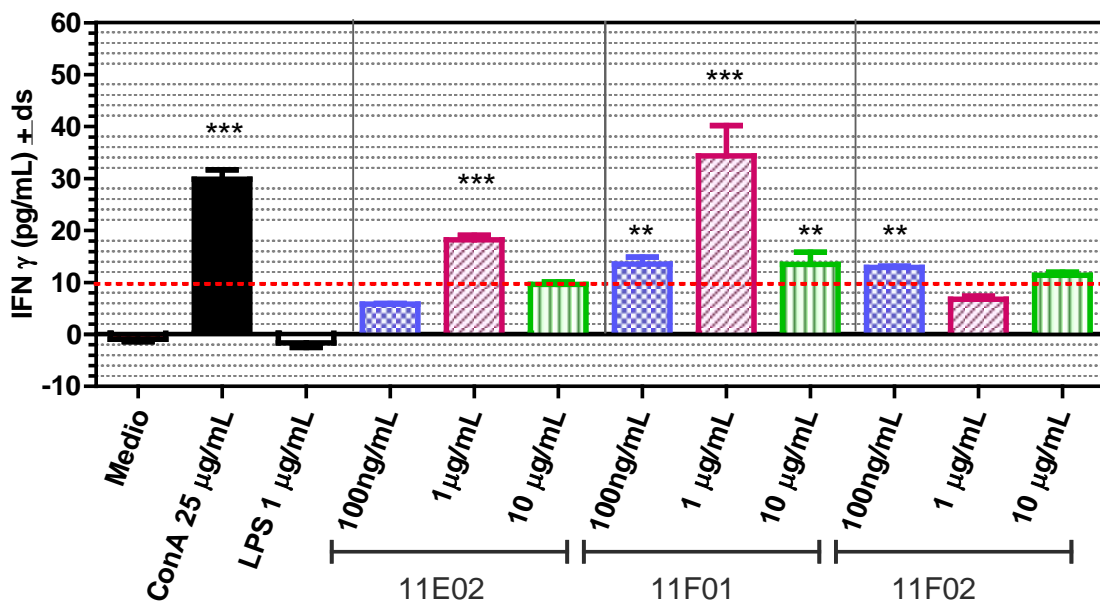
A)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral



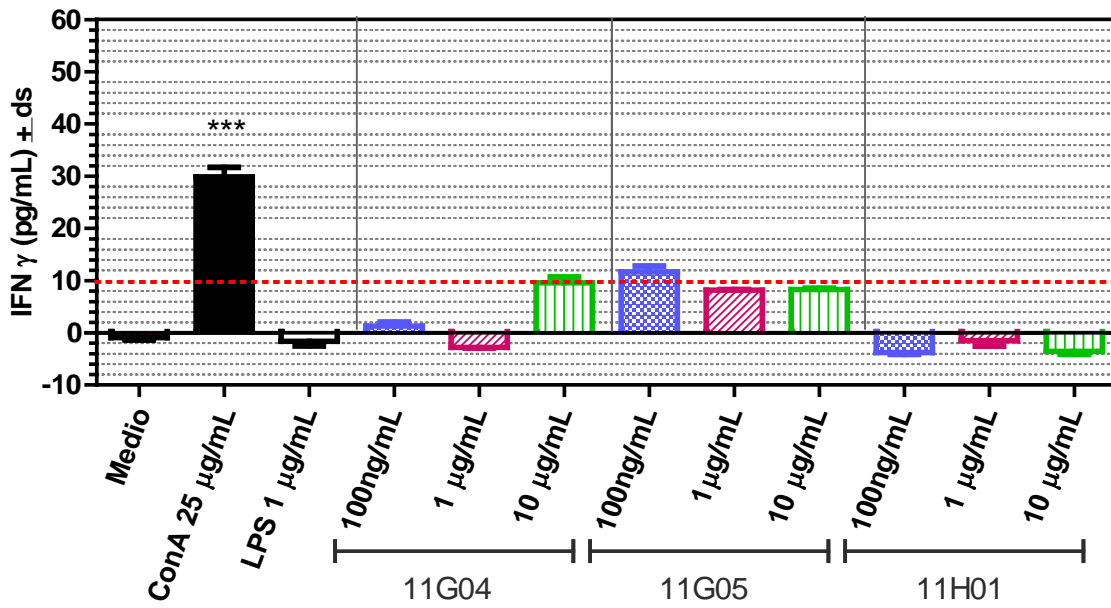
B)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral



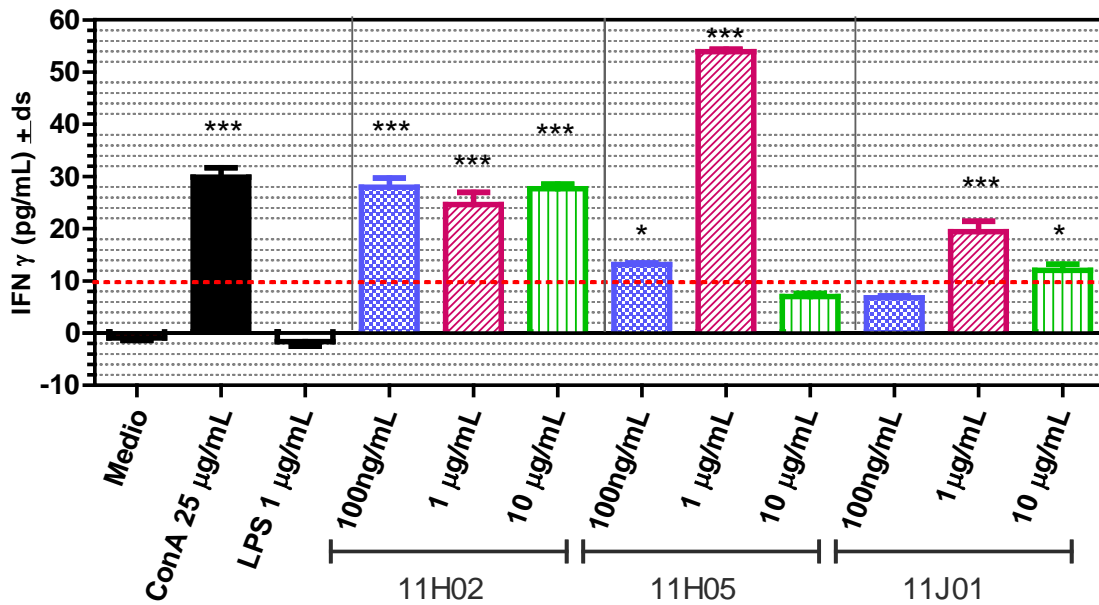
C)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral



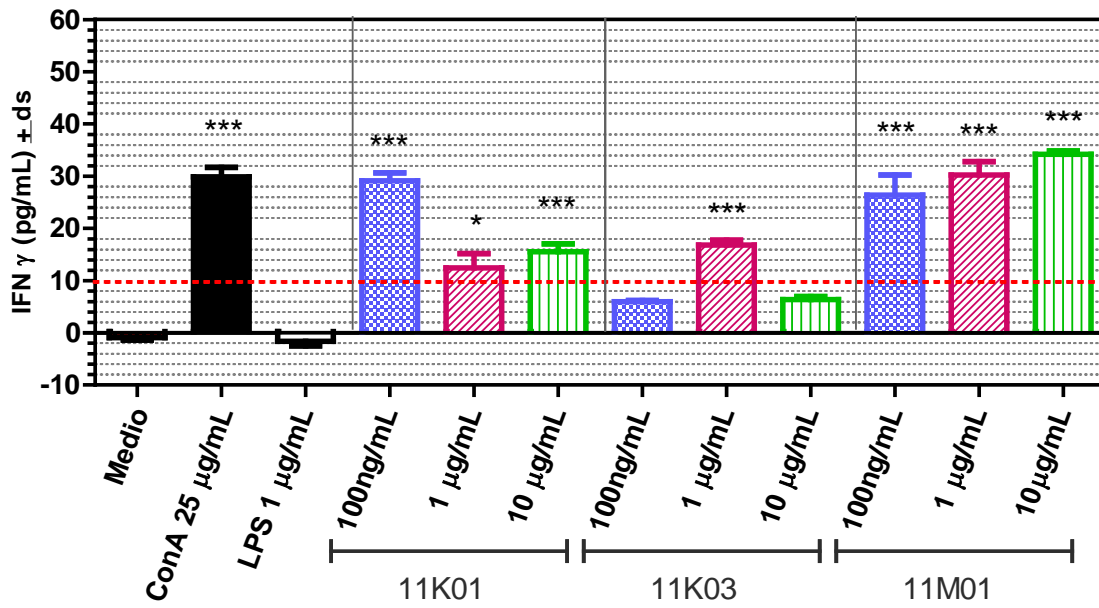
D)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral



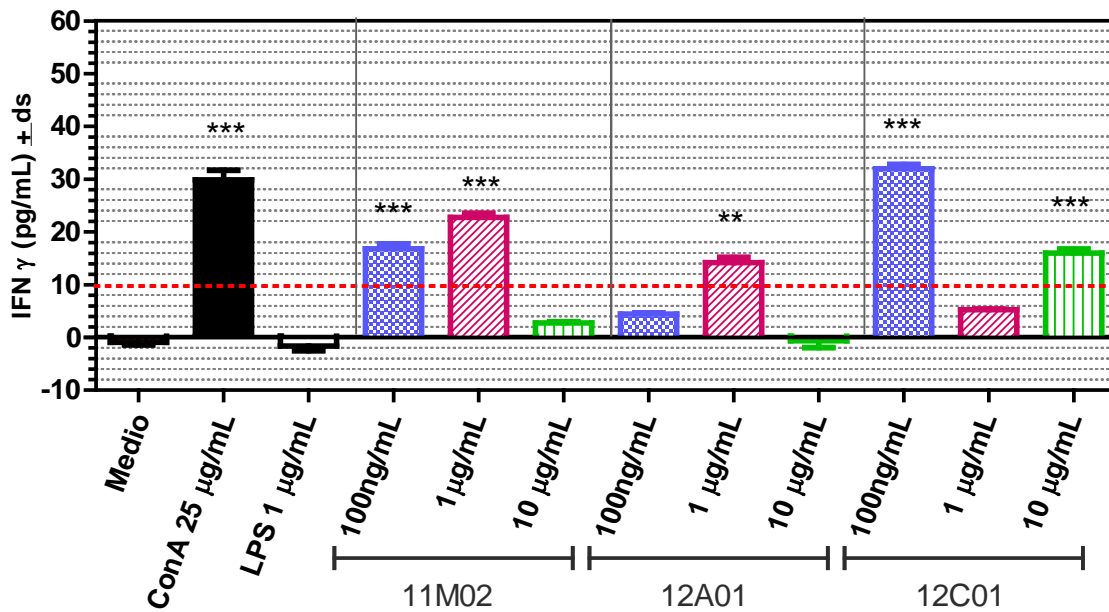
E)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral



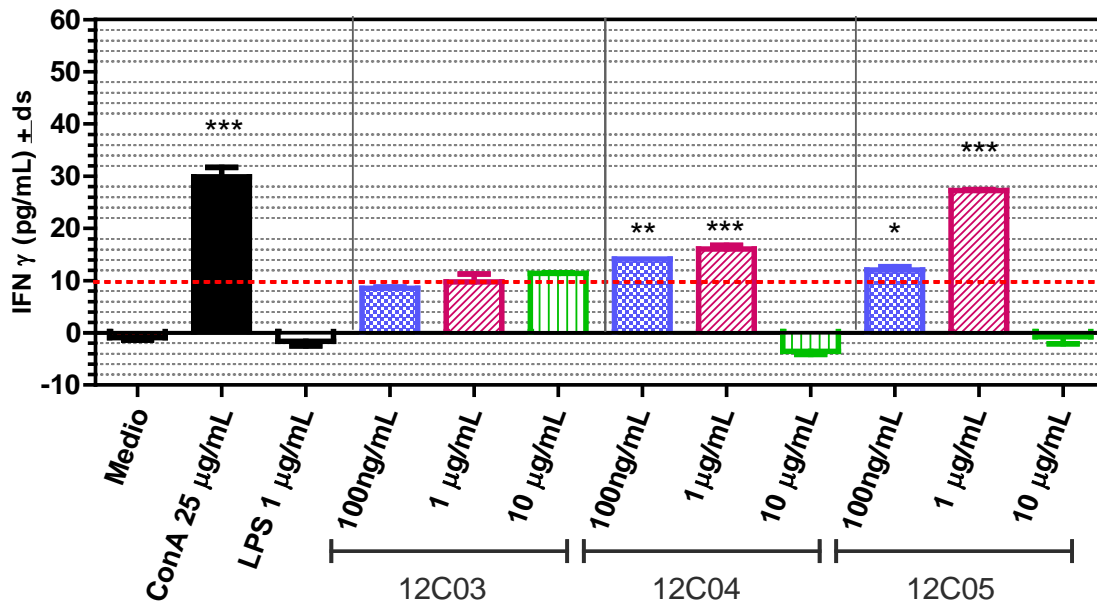
F)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral



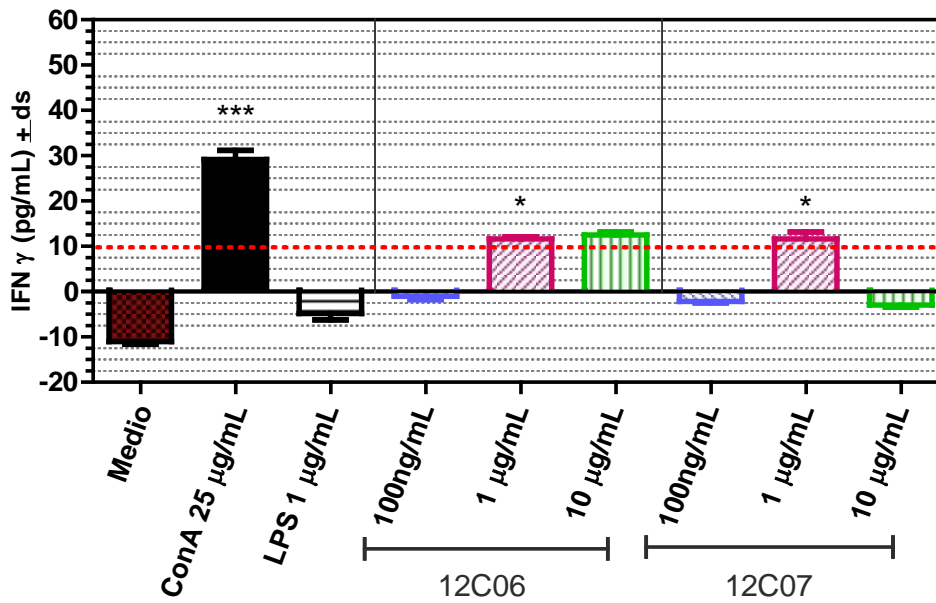
G)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral



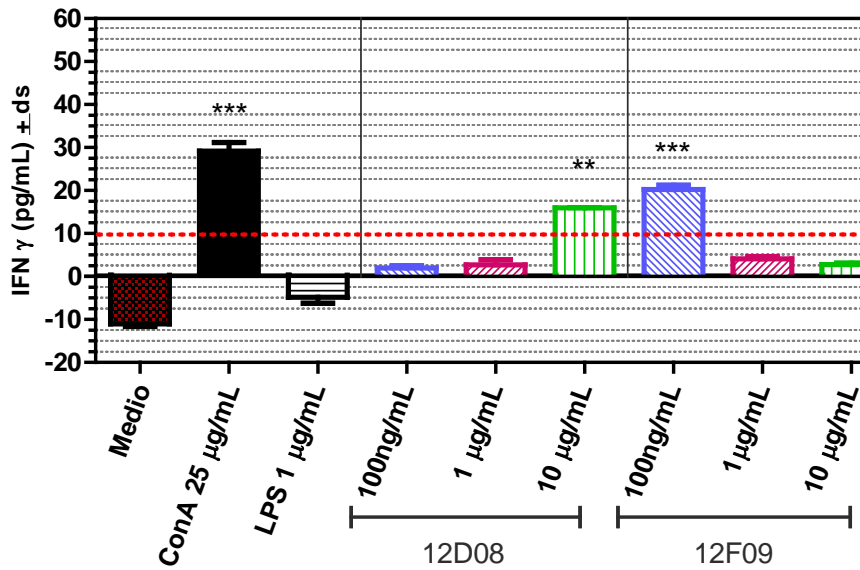
H)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon oral

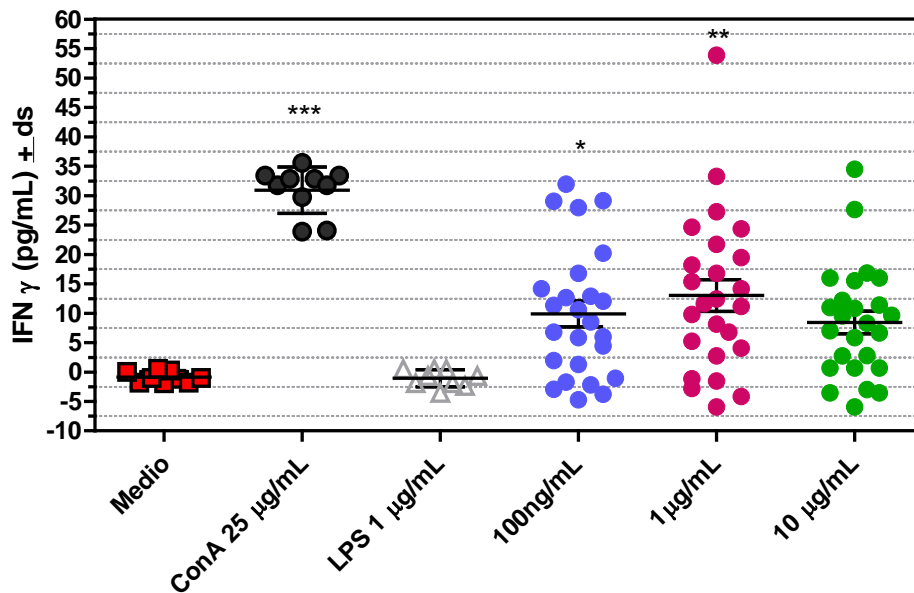


l)

Cuantificación de IFN- γ en los lotes de Transferon



Gráfica 6. (Grupo de gráficas A- I). Efecto en la secreción de IFN- γ de células Jurkat clone E6 al ser estimuladas con diferentes lotes de EDL (Transferon® oral) y a distintas concentraciones.



Gráfica 7. Representación de grupo de todos los lotes de EDL que se evaluaron en la secreción de IFN- γ por células Jurkat clone E6. Se observa que en promedio el tratamiento de Transferon® oral de 1 μ g/mL produce una secreción mayor de IFN- γ (14.2 pg) que las demás concentraciones del hemoderivado utilizadas.

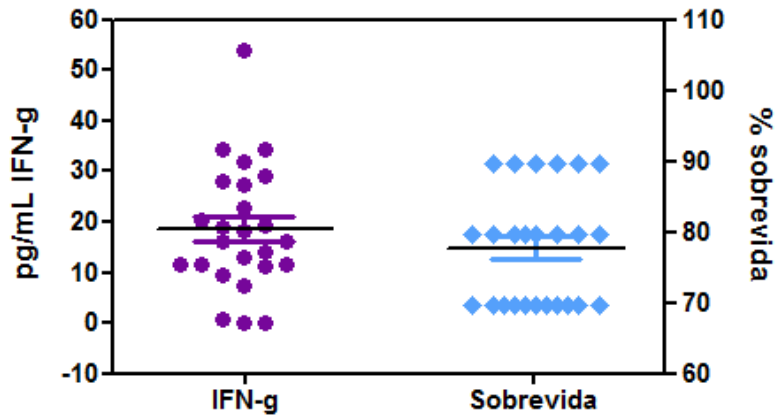
Cantidad de IFN- γ	ALTO > 10 pg/mL		MEDIO 4.7 pg/mL - 10 pg/mL	BAJO < 4.7 pg/mL	NULO ND
LOTES	11E02	11M02	11E01	11D01	11D02
	11F01	12A01			
	11F02	12C01			
	11G05	12C03			
	11H02	12C04			
	11H05	12C05	11G04		11H01
	11J01	12C06			
	11K01	12C07			
	11K03	12D08			
	11M01	12F09			
SUBTOTAL	20		2	1	2
TOTAL	25				
%	80%		8%	4%	8%

Tabla 4. Clasificación de lotes de Transferon® oral (EDL) en relación a la secreción de IFN- γ . El límite de detección del método utilizado para la cuantificación (ELISA) se utilizó como referencia para la clasificación de los lotes, 4.7 pg/mL, así como el límite para la aprobación de los lotes en cuanto a su secreción de IFN- γ , 10 pg/mL. ND: No detectable por ELISA.

Prueba	Secreción de IFN- γ en células Jurkat		Sobrevida en modelo murino de HSV-1	
Concentraciones de Transferon® oral	0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$		2.5, 3.75, 5.0, 7.5 $\mu\text{g/mL}$	
Especificación	≥ 10 pg/mL		> 70 %	
Lotes de Transferon® oral	Concentración de IFN- γ secretada (pg/mL)	Dictamen	% sobrevida	Dictamen
11D01	0.66	Rechazado	80	Aprobado
11D02	0.00	Rechazado	70	Aprobado
11E01	7.55	Rechazado	80	Aprobado
11E02	18.18	Aprobado	80	Aprobado
11F01	34.33	Aprobado	90	Aprobado
11F02	12.90	Aprobado	80	Aprobado
11G04	9.56	Rechazado	70	Aprobado
11G05	11.68	Aprobado	70	Aprobado
11H01	0.00	Rechazado	80	Aprobado
11H02	27.97	Aprobado	80	Aprobado
11H05	53.89	Aprobado	90	Aprobado
11J01	19.44	Aprobado	70	Aprobado
11K01	29.12	Aprobado	70	Aprobado
11K03	18.80	Aprobado	70	Aprobado
11M01	34.18	Aprobado	80	Aprobado
11M02	22.72	Aprobado	70	Aprobado
12A01	14.15	Aprobado	70	Aprobado
12C01	31.94	Aprobado	90	Aprobado
12C03	11.38	Aprobado	70	Aprobado
12C04	16.10	Aprobado	80	Aprobado
12C05	27.23	Aprobado	90	Aprobado
12C06	11.66	Aprobado	70	Aprobado
12C07	11.63	Aprobado	70	Aprobado
12D08	16.00	Aprobado	90	Aprobado
12F09	20.22	Aprobado	90	Aprobado

Tabla 5. Relación del dictamen de prueba biológica que se utiliza actualmente como control de calidad y la comparación con el modelo propuesto de secreción de IFN- γ en células Jurkat.

Comparación entre modelos para prueba biológica



Gráfica 8. Relación y comparación entre el modelo de prueba biológica que se utiliza actualmente para evaluar la potencia de Transferon® oral y el modelo propuesto de secreción de IFN- γ en células Jurkat. Se observa que ambos modelos son similares en la respuesta que tienen. Existe una correlación del 89% utilizando una prueba estadística t de student.

10. DISCUSIÓN

- a) En este proyecto de investigación se evaluó la inducción de la secreción de IFN- γ en células Jurkat (línea celular de células T transformadas obtenidas a partir de LLA) estimuladas con EDL (Transferon [®] oral). Estas células de linaje T no son productoras de IFN- γ , por lo que se estimularon con diversas concentraciones de EDL (Transferon [®] oral) para analizar la secreción de esta citocina inmunomoduladora.
- b) Se utilizó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS como control negativo de secreción de IFN- γ en células Jurkat. Esta reportado que el LPS induce la proliferación en linfocitos T primarios (PBMC) y en algunas células inmortalizadas (líneas celulares) evaluadas a las 24, 48 y 72 horas a concentraciones de 0.1 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de endotoxina. Así mismo *Kanevskiy M.L et al*, reportan que el LPS a concentraciones entre 0.5 -4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en combinación con IL-2 produce grandes cantidades de IFN- γ en células NK. (118), (119), (120).

En los resultados se muestra que el LPS no estimuló la producción de IFN- γ ya que se tiene un valor muy cercano al control negativo de secreción de IFN- γ (Células Jurkat con Medio RPMI complementado), esto puede ser debido a que el fenotipo de la célula en comparación con lo reportado por *Kanevskiy M.L et al* es diferente y que el estímulo no se lleva a cabo con IL-2.

- c) La Concanavalina A (mitógeno policlonal) se utilizó como control positivo para la producción de IFN- γ , ya que esta reportado que al menos 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConA producen altas cantidades de IFN- γ . En los experimentos de la presente tesis utilizamos una concentración más alta de ConA, ya que en experimentos previos (no se muestran) a concentraciones más bajas no se observaba un aumento significativo en la secreción de IFN- γ por células Jurkat (121).

- d) En la gráfica 7 (conjunto de datos de las gráficas) se observa los lotes evaluados y la respuesta que tienen con el tratamiento de EDL oral a concentraciones de 100 ng/mL, 1 µg/mL y 10 µg/mL. Existen lotes de EDL que inducen la secreción de IFN-γ con alguna de las concentraciones evaluadas y existen otros lotes que no tienen respuesta en la inducción de esta citocina.
- e) Se observa que a las concentraciones bajas de Transferon® como 100 ng/mL y 1 µg/mL hay más lotes que inducen la secreción de IFN-γ en células Jurkat clone E6. (Grafica 8) y estas son significativamente diferentes con respecto al control que solo son células en medio cRPMI (medio RPMI complementado con 10 % de suero fetal bovino).
- f) Existen reportes en la literatura que algunos extractos acuosos de suplementos dietéticos con propiedades inmunomoduladoras tienen influencia en la producción de algunas citocinas proinflamatorias en células Jurkat clona E6, sin embargo se observa en dicho artículo que la producción de IFN-γ es nula en células Jurkat clone E6 estimuladas con este extracto acuoso. En este artículo realizan una activación previa de las células Jurkat con PHA y después estimulan con los extractos acuosos. (122). Esto contrasta totalmente con lo encontrado en esta tesis, ya que nosotros observamos un aumento en la producción de IFN-γ cuando tratamos las células con Transferon® (aún sin activar las células en combinación con algún mitógeno). Otra cosa de importancia es que el tratamiento con extracto acuoso de la literatura se realiza con concentraciones muy altas en comparación con lo que se publica con esta tesis (0.1-1 mg/mL vs 0.1- 10 µg/mL). Esto indica que la potencia del Transferon® oral es mayor que otros productos inmunomoduladores similares.
- g) Existen también reportes donde se observa las propiedades de inducción en la proliferación de células T (mediante Factores de Respuesta a Interferón) (123) o interviniendo en la secreción de IFN-γ

que algunos compuestos o moléculas tienen. Compuestos como gangliósidos que se añadieron al cultivo de células T en combinación con PHA que refuerzan la secreción de IFN- γ inducida por PHA (124). Quizá un compuesto análogo o similar de la estructura de un gangliósido (esfingolípidos con cabezas polares muy grandes formadas por unidades de oligosacáridos) esté presente en el Transferon® oral y que sea esto lo que promueva la secreción de IFN- γ en células Jurkat. Esto es muy arriesgado de decir y faltan experimentos para comprobar esta hipótesis.

- h) Como ya se ha mencionado el Transferon® oral puede contener ligandos de TLR's que induzcan la expresión de IFN- γ , ya que en reportes de la literatura se ha observado que las células CD4+ expresan TLR 2, 3 y 4 en niveles transcripcionales y ligandos de estos receptores producen la expresión de varias citocinas, entre ellas IFN- γ (39), (125).
- i) En la tabla 4 se muestran todos los lotes Transferon® oral evaluados y su respectiva concentración de IFN- γ cuantificada. Esta clasificación se realizó con respecto al límite de detección del método y se observa que la mayoría de los lotes inducen la secreción de IFN- γ en un nivel alto (80%), seguidos de los lotes de Transferon® oral que inducen la secreción de IFN- γ en nivel medio (8%) y sólo el 4 % de los lotes inducen la secreción de IFN- γ en niveles bajos; mientras que el 8 % no induce la producción de la citocina inmunomoduladora.
- j) Las diferencias entre lotes de Transferon® oral (EDL) se deben a que, al ser un hemoderivado, la materia prima puede ser distinta. La materia prima son concentrados leucoplaquetarios que se obtiene de bancos de sangre certificados y autorizados a partir de voluntarios sanos. Sin embargo como se ha dicho, estos voluntarios han sido expuestos a condiciones totalmente diferentes unos de otros por lo que la exposición a antígenos es variable y diferente entre los individuos. Esta diferencia hace que los extractos dializables leucocitarios (EDL) no sean

homogéneos entre lotes y por lo tanto también se reflejen las diferencias en los efectos biológicos de cada lote. Otro aspecto importante son los pequeños cambios en el proceso de producción que si bien se asegura que no alteran el producto, si se ven resultados diferentes cuando se evalúan en modelos in vitro.

- k) Actualmente en la prueba que se realiza como control de calidad para evaluar la potencia biológica de los lotes de Transferon® oral se utilizan ratones en gran cantidad (modelo murino de sobrevida de infección herpética con HSV-1), por lo que encontrar alternativas eficaces utilizando líneas celulares en cultivo reduciría el uso de ratones, impactando benéficamente en los costos y en los tiempos en los que se corre la prueba, para dar de alta el lote evaluado. De la gráfica 7 (conjunto de gráficas) se estima que el 80 % de los lotes de EDL oral evaluados tiene una respuesta positiva para la inducción de la secreción de IFN- γ por lo que el 20 % restante puede ser evaluado con la prueba de potencia biológica de infección de herpes con el virus HSV-1 en un modelo murino.
- l) En la tabla 5 y grafica 8 se observa que el modelo propuesto de secreción de IFN- γ en células Jurkat tiene una correlación del 89% con el modelo murino de sobrevida de infección herpética con HSV-1 que es el actualmente usado como control de calidad para evaluar la potencia biológica de los lotes de Transferon ® oral producidos en la ENCB. Esto nos indica que una vez que este validado el proceso de la secreción de IFN- γ en células Jurkat puede reemplazar el modelo que se utiliza actualmente y así disminuir el uso de animales de laboratorio que por Norma (126) debe ser el número mínimo requerido. Esto es debido a que solo se evaluarían el porcentaje (minoría de los lotes) que no pasaron la prueba de secreción de IFN- γ en células Jurkat.
- m) La Ley general de salud (Artículo 222 bis) y la Norma de Emergencia NOM-EM-001-SSA1-2012 de “Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos” (127), (128), (129) exigen que para los medicamentos

biotecnológicos y hemoderivados se deben realizar los estudios preclínicos y clínicos necesarios para demostrar la seguridad, eficacia y calidad del producto. En este caso se realizó un estudio preclínico que se establece como los estudios en animales o *in vitro* para demostrar la calidad, seguridad y eficacia del producto y cuyos resultados pudieran ser extrapolados a los humanos. Es de gran importancia que se cumplan los requerimientos que establece la Secretaría de Salud para verificar la eficacia del Transferon ® oral, y con los resultados observados demostramos que al menos el 80% de los lotes que se evaluaron si aprueban el estudio preclínico de eficacia.

- n) Se estableció que 10 pg/mL es el límite de corte para indicar que los lotes de EDL (Transferon ® oral) son inductores de la secreción de IFN- γ , ya que se decidió tomar esta concentración debido a que es la tercera parte de la concentración de IFN- γ secretada por el control positivo, ConA (29.5 pg/mL). Esta citocina induce un estado antivírico y es antiproliferativa. Además, tiene varias propiedades relacionadas con la inmunorregulación.

(1) es un potente activador de los fagocitos mononucleares, por ejemplo, IFN- γ estimula la expresión de Mac-1, aumenta la endocitosis y la fagocitosis por monocitos y activa los macrófagos para eliminar mejorar la fagocitosis de microorganismos patógenos y de células tumorales eliminándolos mediante la emisión de intermediarios de oxígeno reactivo y TNF- α (130), (131).

(2) En los linfocitos T y B, IFN- γ promueve la diferenciación. Mejora la proliferación de los linfocitos T activados, y es uno de los factores naturales de diferenciación de linfocitos B (132).

A parte de los efectos biológicos que produce el IFN- γ , esta citocina como un marcador de enfermedades ha quedado demostrado en distintas situaciones patológicas:

- Infecciones: IFN- γ se produce durante las infecciones virales. El IFN- γ es una herramienta de diagnóstico para distinguir la ascitis tuberculosa de otra no tuberculosa. Los valores de IFN- γ en el líquido pleural son significativamente más altos en pacientes con pleuritis tuberculosa que en aquellos con pleuritis no tuberculosa, con una sensibilidad y una especificidad del 100 % (133).

Los pacientes con lepra tuberculosa muestran una mayor proliferación de linfocitos y una mayor producción de IFN- γ en respuesta a una estimulación con *Mycobacterium tuberculosis*, en comparación con los pacientes con lepra lepromatosa y las personas sanas.

- Enfermedades autoinmunitarias: las mediciones precisas de la producción celular de citocinas, por ejemplo, IFN- γ es importante en el diseño y la supervisión de la inmunoterapia de la esclerosis múltiple (134).

- Rechazo de trasplantes: la expresión de mRNA de IFN- γ en el injerto se produce en el rechazo agudo activo de un trasplante que precede al rechazo clínico del trasplante, lo que brinda una herramienta de diagnóstico temprano para la detección del rechazo del trasplante (135).

- Alergia: la producción de IFN- γ mediante linfocitos aislados no puede detectarse en pacientes con alergia a la leche de vaca, en comparación con las personas del grupo de referencia. Los recién nacidos que desarrollan atopía producen una cantidad significativamente menor de IFN- γ al momento del nacimiento, en comparación con los niños que no desarrollan atopía (136), (137).

- Diabetes: las células mononucleares de sangre periférica de personas con diabetes tipo I recién diagnosticadas producen una cantidad significativamente menor de IFN- γ , en comparación con los individuos del grupo de referencia y los pacientes con diabetes de larga evolución (138).

Debido a la gran diversidad de efectos biológicos de esta citocina inmunomoduladora y que el 80% de los lotes evaluados produce IFN- γ , el análisis y la cuantificación de IFN- γ como prueba de calidad para evaluar la potencia biológica puede ser una alternativa a la prueba biológica que se utiliza actualmente, así como la obtención de IFN- γ a partir de estas células que posteriormente se pudiera purificar para utilizarse en otros ensayos de investigación o para su uso por la importancia que tiene en la clínica.

11. CONCLUSIONES

- El extracto dializable de leucocitos (Transferon oral ®) a concentraciones de 100 ng/mL, 1 µg/mL y 10 µg/mL induce casi siempre la secreción de IFN-γ en células Jurkat clone E6 a las 72 horas de evaluación.
- Existen lotes de Transferon® oral (11F01, 11M01, 11H05 y 12C01) que inducen más la secreción IFN-γ en células Jurkat clone E6 que el mitógeno utilizado como control positivo (ConA).
- El 80 % de los lotes probados del Transferon® oral dan resultado positivo a la inducción de la secreción de IFN-γ en células Jurkat clone E6. El 20 % de los lotes de Transferon® que no inducen la secreción de IFN-γ pueden ser candidatos para utilizarse en la prueba biológica del modelo de herpes (actualmente utilizado como control de calidad), disminuyendo así el uso de animales, reduciendo los costos y el tiempo de evaluación.
- No se observa homogeneidad en la respuesta de la secreción de IFN-γ con los lotes de EDL oral, esto puede deberse principalmente al origen de la materia prima para producir el Transferon® oral ya que son concentrados leucoplaquetarios obtenidos de diversos donadores sanos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Khan A, Bellars W, W. G. 1978. The usefulness of transfer factor associated with frequent infections. *Ann Allergy* 40: 229-32
2. Kirkpatrick C. H. 1989. Biological response modifiers. Interferons, interleukins, and transfer factor. *Ann Allergy*. 62: 170-6
3. Kirkpatrick C. H, Rozzo S. J, J. MJ. 1985. Murine transfer factor II. Transfer of delayed hypersensitivity to synthetic antigens. *J Immunol* 134: 1723-7
4. Lawrence HS. 1969. . Transfer factor. . *Adv. Immunol.* 11: 195
5. Kirkpatrick C. H, Rozzo S J. 1992. Purification of transfer factors. . *Mol. Immunol.* 29 167-82.
6. Flores S. G, Rodríguez A, S. SEP. 2005 Factor de transferencia como inmunomodulador específico en el tratamiento de la dermatitis atópica moderada a severa. . In *Revista Alergia México*
7. Fudenberg H. H, Pizza G. 1994. Transfer factor 1993: New frontiers. . *Progress in Drug Research.* 42: 309421
8. Pizza G, Viza D, Vinci C, Palareti A, D C, V. F, Baricordi R. 1996. Orally administered HSV-specific transfer factor (TF) prevents genital or labial herpes relapses. . *Kluiver Academic Publishers. Netherlans*
9. Wilson G. B, Fudenberg H. H. 1979. . Effects of dialyzable leukocyte extracts with transfer factor activity on leukocyte migration in vitro II. Separation and Partial characterization of the components in DLE producing antigen-dependent and antigen-independent effects. . . *Mol. Immunol.* 93 819-37
10. Gottlieb A. A, Sizemore R. C, S. GM. 1995. . Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. . *Biotherapy* 9.: 27-31
11. Alvarez T, Kirkpatrick C. H. 1996. . Profiles of cytokines production in recipients of transfer factors. *Biotherapy.* 9 (1-3):55-9
12. Huerta L. J. 2002. Factor de transferencia una alternativa en el tratamiento de las enfermedades alérgicas. . In *Rev Alerg Asma Inmunol Pediatr*, pp. 4

13. Escobar E. N. 2008. . *Analisis de la presencia de particulas virales (VHB y VHC) utilizando técnicas de biología molecular en el factor de transferencia (Transferon ®)* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional
14. Landstainer K, Chase M. W. 1942. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. . *Proc Soc Exp Biol Med* 49: 688-90
15. Lawrence H. S. 1955. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest* 34: 219
16. Lawrence H. S. 1949. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. . . *Proc Soc Exp Biol Med.* 71: 516519
17. Jensen K, Patnode R. 1961. Multiple passive transfer or delayed type pf hypersensitivity in humans. *Ann. Rev. Respire. Dis.* 85: 373.
18. Ascher MS, Schneider WJ, Valentine FT, Lawrence HS. 1974. In vitro properties of leukocyte dialysates containing transfer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1178-82
19. Levin A. S. 1970. Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunology deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor. . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67: 821-8
20. Wilson G. B, Welch T. M, Fudenberg H. H. 1977. Characterization of Tx an active subfraction of human dialyzable transfer factor. . *Clin. Immunol. Immunopatol.* 8: 551.
21. Rapaport F. T, Lawrence H. S, Millar J. W, Pappagianis D, Smith C. E. 1959. Transfer of delayed hypersensitivity to coccidioidin in man. . *J Immunol* 84.: 358-67
22. Borkowsky W, Lawrence H. S. 1981. Deletion of antigen/specific activity from leukocyte dialysates containig transfer factor by antigen/coated polystyrene. . *Journal of Immunology.* 126: 487-9.
23. Petersen E. A, Kirkpatrick C. H, Greenberg A. 1979. Nature and activities of transfer factor. . *NYAS*
24. Kirkpatrick C. H., Rozzo S. J, Mascali J. J. 1985. Murine transfer factor III. Specific Interactions between transfer factor antigen. . *J Immunol* 135: 4027-33.

25. Navarro C. D, Serrano M. E, Modesto O. S, Estrada P. S, Teran O. L, Gómez V. J, Flores S. G. 1996. "Factor de transferencia en dermatitis atópica moderada y severa", . In *Revista alergia México*. México
26. Baram P, Mosko M. M. 1965. A dializable fraction from tuberculin sensitive human white blood cellscapable to inducing tuberculin delayed hypersensitivity in negative recipients. . *Immunology*. 8: 461.
27. Arala C. M, Heremans J. F. 1967. Fractionation of human leukocyte extracts transferring delayed hypersensitivity to tuberculin. . *Int. Arch. Allergy*. 31: 355
28. Neidhart J. A, Schwarts R. S, Murphy P. E, Lobuglio S. G. 1973. Transfer Factor: Isolation of a biological active component. . *Cell. Immunology*. 9: 319-23.
29. Krohn K, Grohn P, Virolainen M. 1976. Fractionation studies of human leukocyte dialysates: Demostration of tree components with transfer activity. . *Medical. Bio*. 54: 334.
30. Burger D. R. 1976. Human Transfer Factor: Fractionation and biologic activity. *Journal of Immunology*. 117: 789-96.
31. Burger D. R, Vanderbark A. A, Vetto R. M. 1979. Human transfer factor: Structural properties suggested by HPRP cromatografy and enzymatic sensitivities. *J Immunol*. 122: 1091-8
32. Burger D. R, Vanderbark A. A, Vetto R. M. 1979. A structural model for human transfer factor suggested by enzymatic susceptibilities. Immune regulation in transfer factor. . *Ann. New York Acad. Sci*. 332. : 236-40.
33. Borvak J, Mayer V. 1985. UV absorbance profile of human leukocytic ultrafiltrate after affinity chromatography on immobilized m-aminophenyl boronic acid: implication for transfer factor purification. . *Acta Virol*. 29: 119-28
34. Borvak J, Mayer V, Moravek L. 1990. Amino acid analysis of selected reversed-phase high performance liquid chromatography peaks of crude and partially purified lysed human leukocyte ultrafiltrate. . *Acta Virol* 33: 417-27.
35. Kirkpatrick C. H. 2000. Transfer Factors: identification of conserved sequences in transfer factor molecules. . *Molecular Medicine* 6: 332-41

36. Estrada P. S. 1999. El sistema immune y el uso del factor de transferencia. . *Ciencia UANL* 2 237-43.
37. Pérez T. S. 2007 *Empleo del Transferón® en el manejo de sepsis grave*. . ENCB, IPN., México.
38. Rozzo S. J, Kirkpatrick C.H, Merryman C. F. 1988 Studies with genetically regulated immune responses. . *Cellular Immunol.* 115: 130-45.
39. Estrada P. S, Nagaya A, Serrano E. 1997. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. . *International Journal of Immunopharmacology* 20: 521-35
40. Robledo A. F. 2006. *Estudio de la presencia de ligandos para TLR2 y TLR4 en el DLE humano (Transferón®)*. . ENCB, IPN.
41. García M. M, Cuza C. M, Sánchez R. A. 1998. Factor de transferencia y extractos bacterianos en asmáticos con infecciones respiratorias a recurrentes. *Alergia e inmunología pediátrica* 7: 124-7
42. García H. U. 2007. *Establecimiento de un método para cuantificar el efecto biológico de los Extractos Dializables de Leucocitos*. . ENCB, IPN, México
43. Ojeda MO, van't Veer C, Fernandez Ortega CB, Arana Rosainz Mde J, Buurman WA. 2005. Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNFalpha, IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells. *Inflamm Res* 54: 74-81
44. Di Prisco MA, Jimenez JC, P. L-S. 1995. Clinical and immunological evaluation of asthmatic patient in double blind treatment protocol with transfer factor. . *Biotecnología aplicada*. 12: 17-21
45. Herlin T, Jensen JR, Thestrup-Pedersen K, Zachariae H. 1981. Dialyzable leukocyte extract stimulates cAMP in T gamma lymphocytes. *Allergy* 36: 337-43
46. Barnet K, Vacek A, Cech K, Pekarek J. 1996. The effect of DLE fractions on GM-progenitors of haematopoietic stem cells in vitro. . *Biotherapy*. 9: 171-4.
47. Rivera G. M. 2008. *Uso del Extracto Dializable de Leucocitos en la infección experimental con Listeria monocytogenes*. ENCB, IPN, Mexico

48. Levin A. S, Spitler L. E, Fudenberg H. H. 1973. Transfer factor therapy in immune deficiency states. . *Ann. Rev. Med.* 24: 175-208
49. Gottlieb A. A, Sizemore R. C, Gottlieb M. S, Kern C. H. 1995. Rationale and clinical results of using leucocyte-derived immunosupportive therapies in HIV disease. . *Biotherapy* . 9: 27-31
50. Pérez.T. S, Rivera G. S, Pérez B. A. 1999. The effect of transfer factor on the synthesis of human cytokines. n *International XIth Congress on Transfer Factor*. . Monterrey, Nuevo León, México.
51. Kirkpatrick C. H, Hamad R, Morton L. C. 1995. Murine transfer factors. Dose response relationships and routes of administration. . *Cell Immunol* 164 203-6
52. Pérez T. S. 1999. Tesis de maestria. *Efecto de los DLEs sobre células mononucleares de sangre periférica*. . ENCB, IPN
53. Fabre R, Aguilar D, Estrada G. I. 2004. Transfer factors immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 135.: 215-23
54. Rodríguez F. A. 2004. Evaluación clínica e inmunológica de individuos sanos que recibieron extracto leucocitario dializable (DLE) humano por vía oral. . ENCB/IPN. , México
55. Kirkpatrick C. H. 1993. Structural nature and functions of transfer factors. *Ann NY Acad Sci* 685 362-8
56. Estrada P. S, Chávez S. R, Ondarza A. R, Correa M. B, Serrano M. E, Monges N. A, Calva P. C. 1995. Immunotherapy with transfer factor of recurrent herpes simplex type I. *Arch Med Res.* 26: 87-92
57. Mendoza S. M. 2007. *Evaluación del efecto de los extractos dializables de leucocitos en una infección de ratones Balb/c con herpes simplex tipo 1*. ENCB, IPN México
58. Lawrence H.S. 1976. Transfer Factor, Basic Properties and Clinical Applications *Academic Press: New York*
59. Spitler L. E. 1979. Transfer factor in immunodeficiency diseases. . *Ann N Y Acad Sci.* 332: 228-35
60. Fernandez O. C. 1996. Inhibition of in vitro HIV infection by dialyzable leucocyte extracts. *Laboratory for AIDS Research* 9: 33-40.

61. Wolf RE, Fudenberg HH, Welch TM, Spitler LE, Ziff M. 1977. Treatment of Bechcet's syndrome with transfer factor. *JAMA* 238: 869-71
62. Sousa MD, Cochran R, Mackie R, Parratt D, Arala-Chaves M. 1976. Chronic mucocutaneous candidiasis treated with transfer factor. *Br J Dermatol* 94: 79-83
63. Masi M, De Vinci C, Baricordi OR. 1996. Transfer factor in chronic mucocutaneous candidiasis. *Biotherapy* 9: 97-103
64. Estrada P. S, Cabezas Q. R. 1990. Inmunoterapia con Factor de Transferencia en pacientes con herpes zoster. *Bioteconología aplicada*.
65. Sumiyama K, Kobayashi M, Miyashiro E, Koike M. 1991. Combination Therapy with Transfer Factor and High Dose Stronger Neo-Minophagen C in Chronic Hepatitis B Children (HBe Ag Positive) *Acta Paediatr Jpn.* 33: 327-34
66. Estrada P. S, Velasco C. O, Rébora F. 1983. Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. . *Salud Pública de México* 25: 589-99
67. Gerbase-DeLima M, Carlquist I, Mendes NF. 1979. Specificity of the local transfer of cell-mediated immunity with dialyzable transfer factor. *Cell Immunol* 48: 231-4
68. Mendes E. 1979. Transfer of delayed hypersensitivity to leishmanin (Montenegro reaction). *Cell Immunol* 42: 424-7
69. Sorensen R, Berrón R. 2004. *Defecto completo de receptor de IL-12, manifestando adenitis supurativa por salmonella B con remisión completa por factor de transferencia específico. Primer caso en México.* , ENCB, IPN
70. Hastings RC, Morales MJ, Shannon EJ, Jacobson RR. 1976. Preliminary results on the safety and efficacy of transfer factor in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 44: 275
71. Kirkpatrick C. H, Gallin J. I. 1974. Treatment of infections and neoplastic diseases with transfer factor. . *Oncology* . 29 46-73
72. Ojeda O. M, Fernandez O. C, Arana R. M. 1996. Dialysable leucocyte extract (DLE) reduce lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor secretion in human leucocytes. , *Biotherapy* 19;9(1-3):163-70.

73. Pilotti V, Mastrorilli M, Pizza G, De Vinci C, Busutti L, Palareti A, Gozzetti G, Cavallari A. 1996. Transfer Factor as an adjuvant to non-small cell lung cancer (NSCLC) therapy. . *Biotherapy*. 9 117-21.
74. Pizza G, De Vinci C, Cuzzocrea D, Aiello E, Maver P, Corrado G, Romagnoli P, Dragoni E, LoConte G, Riolo U. 1996. A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormone-unresponsive metastatic prostate cancer. . *Biotherapy* 9: 123-32
75. Cabezas Q. R, Estrada P. S, Sellman M, Fernandez O. C. 1997. El Factor de Transferencia como Inmunomodulador en el asma bronquial extrínseca II. Estudio de 150 casos.
76. Rodríguez F. A, Serrano M. E, Estrada P. S. 2002. El efecto terapéutico del factor de transferencia en el tratamiento de pacientes con dermatitis atópica grave. . *Alergia, asma e inmunología pediátricas* 11: 9-11
77. García M. M, Cuza C. M, Sánchez R. A. 1998 Factor de transferencia y extractos bacterianos en asmáticos con infecciones respiratorias a recurrentes. . *Alergia e inmunología pediátrica* 7: 124-7.
78. Sosa M, Flores G, Estrada P. S, Orea M, Gómez V.J. 2001. Tratamiento comparativo entre talidomida y factor de transferencia en dermatitis atópica severa. . In *Revista Alergia*. , pp. 56-64. México
79. Huerta L. J. 2002. Factor de transferencia: Una alternativa en el tratamiento de las enfermedades alérgicas. . In *Rev Alerg Asma Inmunol Pediatr* pp. 4. México
80. Zhaojun W, Jian H, Wei S, Guangwu X, Ningli L, Xi Chen, Z. Zhang. 2006. Role of IFN- γ in induction of Foxp3 and conversion of CD4+CD25- T cells to CD4+ Tregs. . *Journal of Clinical Invest.* 116: 2434-41
81. Abramson A, Khan A, Tate GW, Jr., Martin RG, Hill NO. 1980. Immunocompetence and transfer factor therapy in uveitis. *Br J Ophthalmol* 64: 332-8
82. Kaminkova J, Lange CF. 1984. Transfer factor and repeated otitis media. *Cell Immunol* 89: 259-64
83. Rubinstein A, Melamed J, Rodescu D, Murphy RA, Broocker D. 1977. Transfer factor treatment in a patient with progressive tuberculosis. *Clin Immunol Immunopathol* 8: 39-50

84. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Leon L, Tamez-Guerra RS, Rodriguez-Padilla C. 2004. Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock. *Int Immunopharmacol* 4: 1577-86
85. Estrada-Parra S, Garcia Procel E. 1982. [Immunology of tuberculosis]. *Salud Publica Mex* 24: 269-78
86. Chirinos C. I. 2008. *Determinación de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica proveniente de mujeres infectadas con VPH que reciben tratamiento con factor de transferencia*. ENCB, IPN, México
87. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-89
88. Chen J, Liu X. 2009. The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. *Cell Immunol* 254: 85-90
89. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-95
90. Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, Rothman P. 1995. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science* 269: 245-7
91. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. 2007. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 204: 273-83
92. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187: 2103-8
93. Schindler H, Lutz MB, Rollinghoff M, Bogdan C. 2001. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol* 166: 3075-82

94. Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. 2000. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol* 164: 64-71
95. Pernis A, Gupta S, Yopp J, Garfein E, Kashleva H, Schindler C, Rothman P. 1995. Gamma chain-associated cytokine receptors signal through distinct transducing factors. *J Biol Chem* 270: 14517-22
96. Schoenborn JR, Wilson CB. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96: 41-101
97. Rouyez MC, Lestingi M, Charon M, Fichelson S, Buzyn A, Dusanter-Fourt I. 2005. IFN regulatory factor-2 cooperates with STAT1 to regulate transporter associated with antigen processing-1 promoter activity. *J Immunol* 174: 3948-58
98. Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. 2002. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 196: 999-1005
99. Berner V, Liu H, Zhou Q, Alderson KL, Sun K, Weiss JM, Back TC, Longo DL, Blazar BR, Wiltout RH, Welniak LA, Redelman D, Murphy WJ. 2007. IFN-gamma mediates CD4+ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy. *Nat Med* 13: 354-60
100. Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, Billiau A, Leclercq G, Matthys P. 2005. Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther* 7: R402-15
101. Zhang J. 2007. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest* 117: 871-3
102. Wesch D, Beetz S, Oberg HH, Marget M, Krengel K, Kabelitz D. 2006. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 176: 1348-54
103. Steele CR, Oppenheim DE, Hayday AC. 2000. Gamma(delta) T cells: non-classical ligands for non-classical cells. *Curr Biol* 10: R282-5

104. Murakami K, Sentsui H, Inoshima Y, Inumaru S. 2004. Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma. *Vet Immunol Immunopathol* 101: 61-71
105. Kunzmann V, Kretzschmar E, Herrmann T, Wilhelm M. 2004. Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology* 112: 369-77
106. Xiao BG, Wu XC, Yang JS, Xu LY, Liu X, Huang YM, Bjelke B, Link H. 2004. Therapeutic potential of IFN-gamma-modified dendritic cells in acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol* 16: 13-22
107. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-48
108. Patel SY, Doffinger R, Barcenas-Morales G, Kumararatne DS. 2008. Genetically determined susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Pathol* 61: 1006-12
109. French MB, Allison J, Cram DS, Thomas HE, Dempsey-Collier M, Silva A, Georgiou HM, Kay TW, Harrison LC, Lew AM. 1997. Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 46: 34-9
110. Moutschen MP, Scheen AJ, Lefebvre PJ. 1992. Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved. Relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections. *Diabete Metab* 18: 187-201
111. Halminen M, Simell O, Knip M, Ilonen J. 2001. Cytokine expression in unstimulated PBMC of children with type 1 diabetes and subjects positive for diabetes-associated autoantibodies. *Scand J Immunol* 53: 510-3
112. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. 2002. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109: 131-40

113. Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI. 1997. Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46: 572-82
114. Manadan AM, Block JA. 2008. Rheumatoid arthritis: beyond tumor necrosis factor-alpha antagonists, B cell depletion, and T cell blockade. *Am J Ther* 15: 53-8
115. Boissier MC, Chiocchia G, Bessis N, Hajnal J, Garotta G, Nicoletti F, Fournier C. 1995. Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 25: 1184-90
116. Cooper SM, Sriram S, Ranges GE. 1988. Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-Ia antibodies and augmentation with IFN-gamma. *J Immunol* 141: 1958-62
117. SSA. 1993. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993 Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. pp. 38. México, DF.: Diario Oficial de la Federación.
118. Vogel SN, Hilfiker ML, Caulfield MJ. 1983. Endotoxin-induced T lymphocyte proliferation. *J Immunol* 130: 1774-9
119. Hattar K, Savai R, Subtil FS, Wilhelm J, Schmall A, Lang DS, Goldmann T, Eul B, Dahlem G, Fink L, Schermuly RT, Banat GA, Sibelius U, Grimminger F, Vollmer E, Seeger W, Grandel U. 2013. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunol Immunother* 62: 309-20
120. Kanevskiy LM, Telford WG, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. 2013. Lipopolysaccharide induces IFN-gamma production in human NK cells. *Front Immunol* 4: 11
121. Alvarez-Thull L, Kirkpatrick CH. 1996. Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors. *Biotherapy* 9: 55-9
122. Hanlon PR, Robbins MG, Scholl C, Barnes DM. 2009. Aqueous extracts from dietary supplements influence the production of inflammatory cytokines in immortalized and primary T lymphocytes. *BMC Complement Altern Med* 9: 51
123. Wang T, Huang C, Lopez-Coral A, Slentz-Kesler KA, Xiao M, Wherry EJ, Kaufman RE. 2012. K12/SECTM1, an interferon-gamma regulated

- molecule, synergizes with CD28 to costimulate human T cell proliferation. *J Leukoc Biol* 91: 449-59
124. Kanda N, Watanabe S. 2001. Gangliosides GD1b, GT1b, and GQ1b enhance IL-2 and IFN-gamma production and suppress IL-4 and IL-5 production in phytohemagglutinin-stimulated human T cells. *J Immunol* 166: 72-80
 125. St Paul M, Barjesteh N, Paolucci S, Pei Y, Sharif S. 2012. Toll-like receptor ligands induce the expression of interferon-gamma and interleukin-17 in chicken CD4+ T cells. *BMC Res Notes* 5: 616
 126. SSA. 1999. Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio., pp. 58. Mexico, DF.: DOF
 127. SSA. 2011. DECRETO por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones del Reglamento de Insumos para la Salud. In *Tercera sección*. México, DF.: Diario Oficial de la Federación.
 128. SSA. 2013. Ley General de Salud. In *Texto vigente: Última reforma publicada DOF 25-01-2013*, pp. 22. Mexico, DF.: Diario Oficial de la Federación.
 129. SSA. 2012. Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-001-SSA1-2012, Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos. Buenas prácticas de fabricación. Características técnicas y científicas que deben cumplir éstos para demostrar su seguridad, eficacia y calidad. Etiquetado. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad y farmacovigilancia. In *NOM-EM-001-SSA1-2012*, pp. 42. Mexico, DF.: Diario Oficial de la Federacion
 130. Herbst S, Schaible UE, Schneider BE. 2011. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One* 6: e19105
 131. Sastre L, Kishimoto TK, Gee C, Roberts T, Springer TA. 1986. The mouse leukocyte adhesion proteins Mac-1 and LFA-1: studies on mRNA translation and protein glycosylation with emphasis on Mac-1. *J Immunol* 137: 1060-5

132. Sidman CL, Marshall JD, Shultz LD, Gray PW, Johnson HM. 1984. Gamma-interferon is one of several direct B cell-maturing lymphokines. *Nature* 309: 801-4
133. Aoki Y, Katoh O, Nakanishi Y, Kuroki S, Yamada H. 1994. A comparison study of IFN-gamma, ADA, and CA125 as the diagnostic parameters in tuberculous pleuritis. *Respir Med* 88: 139-43
134. Olsson T. 1994. Multiple sclerosis:cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 36 Suppl: S100-2
135. Nast CC, Zuo XJ, Prehn J, Danovitch GM, Wilkinson A, Jordan SC. 1994. Gamma-interferon gene expression in human renal allograft fine-needle aspirates. *Transplantation* 57: 498-502
136. Suomalainen H, Soppi E, Laine S, Isolauri E. 1993. Immunologic disturbances in cow's milk allergy, 2: Evidence for defective interferon-gamma generation. *Pediatr Allergy Immunol* 4: 203-7
137. Tang ML, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. 1994. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 344: 983-5
138. Ciampolillo A, Guastamacchia E, Caragiulo L, Lollino G, De Robertis O, Lattanzi V, Giorgino R. 1993. In vitro secretion of interleukin-1 beta and interferon-gamma by peripheral blood lymphomononuclear cells in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 21: 87-93