

11
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“EL FACTOR DE TRANSFERENCIA: PROPIEDADES BIOLÓGICAS,
QUÍMICAS Y APLICACION CLÍNICA”**

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

p r e s e n t a

IRIS EDITH ESCUDERO ABARCA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

A B R E V I A T U R A S

FT	Factor de Transferencia
ELD	Extracto de Leucocitos Dializable
HR	Hipersensibilidad Retardada
Ag	Antígeno
Ag Ia	Antígenos asociados a la región I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIF	Factor Inhibidor de Macrófagos
MMI	Inhibición de la Migración de Macrófagos
IM	Indice de Migración
IE	Indice de Estimulación
³ H-Td	Timidina Tritiada
RNA	Acido Ribonucléico
DNA	Acido Desoxirribonucléico
AMPC	Monofosfato de Adenosina cíclico
GMPC	Monofosfato de Guanosina cíclico
IMP	Inosina Monofosfato
PPD	Derivado de Proteína Purificada
SK-SD	Estreptocinasa-Estreptodornasa
HL	Hemocianina de Lapa
DNFB	Dinitroflucrobenceno
DNCB	Dinitroclorobenceno
OV	Ovalbúmina
GT	Copolímero de Acido Glutámico-Tirosina
cpm	Cuentas por minuto

mm	Milímetros
nm	Nanómetros
UV	Luz Ultravioleta
DO	Densidad Optica
PHA	Fitohemaglutinina
Con. A	Concanavalina A

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN -----	1
OBJETIVOS -----	2
I).- INTRODUCCION -----	3
II).- METODO GENERAL DE PREPARACION DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA -----	7
III).- ACTIVIDAD BIOLOGICA DE FT	
A.- Descripción y Metodología de los ensayos inmunológicos involucra- dos en el estudio de FT -----	10
B.- Efectos in vivo de FT	
1.- Transferencia específica de HR ----	18
2.- Otros Efectos in vivo -----	36
C.- Efectos in vitro de FT contenido en el ELD	
1.- Efecto sobre migración de macrófagos -----	37
2.- Efectos sobre Blastogénesis de Linfocitos -----	49
3.- Efecto sobre concentración intracelular de nucleótidos cíclicos-----	59
4.- Efecto sobre células formadoras de Rosetas -----	62
IV).- PROPIEDADES QUIMICAS DE FT -----	65

	PAGINA
V).- APLICACIONES CLINICAS DE FT -----	95
A.- Factor de Transferencia en desordenes de inmuno- deficiencia congénita -----	96
B.- Factor de Transferencia en el tratamiento de enfermedades infecciosas -----	105
1.- Infecciones Virales -----	106
2.- Infecciones Micobac- terianas -----	110
3.- Infecciones Fúngicas -----	113
C.- Factor de Transferencia en la Inmunoterapia del Cáncer -----	117
D.- Factor de Transferencia en algunas Enfermedades Autoinmunes -----	122
VI).- CONCLUSIONES -----	127
VII).- COMENTARIO -----	129
VIII).- BIBLIOGRAFIA -----	131

LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla 1	Datos Inmunológicos de un donador de FT. (Steel, 108)	----- 22
Tabla 2	Porcentaje de respuestas positivas de Hipersensibilidad Retardada en receptores no inmunes de FT específico. (Steel, 108)	----- 24
Tabla 3	Protocolo Experimental para un estudio en cobayos de la actividad in vivo de FT (Welch, 122)	----- 28
Tabla 4	Efectos de ELD de bovino sobre la migración de macrófagos humanos (Wilson, 124)	----- 40
Tabla 5	Datos comparativos de las propiedades de ELD y las de un Factor Inmovilizante de Neutrófilos (NIF) (Wilson y Smith, 125)	----- 44

LISTA DE TABLAS (Continuación)

		PAGINA
Tabla 6	Datos que muestran la Inhibición ----- de la migración de macrófagos pro- ducida por FT, en un estudio en humanos. (Wilson y Welch, 126)	48
Tabla 7	Efecto del ELD humano sobre ----- la respuesta a PHA y Con A de células esplénicas murinas (Huard, 48)	55
Tabla 8	Efecto Inhibitorio de ELD ----- sobre la Blastogénesis en cul- tivos de linfocitos (Mueller y Ritts, 79)	57
Tabla 9	Efecto de ELD sobre la concen- ----- tración de GMPC de leucocitos humanos (Sandler y Kirkpatrick, 92)	61
Tabla 10	Algunas Propiedades del Factor ----- de Transferencia (Lawrence, 69 y Schulkind, 96)	67

LISTA DE FIGURAS

PAGINA

- | | | |
|----------|--|----------|
| Figura 1 | Espectro de absorción a 260 y 280 nm de ELD después de la filtración sobre Sephadex G-25.
(Lawrence, 69) | ----- 69 |
| Figura 2 | Cromatografía de exclusión sobre Sephadex G-25 de ELD conteniendo actividad de FT.
(Burger, 17) | ----- 71 |
| Figura 3 | Cromatografía de fase inversa sobre Octadecil Silane, en condiciones de alta presión; de una fracción activa de FT
(Burger, 17) | ----- 73 |
| Figura 4 | Fraccionamiento de ELD por filtración sobre Sephadex G-10
(Gottlieb, 39) | ----- 77 |
| Figura 5 | Fraccionamiento de ELD sobre Sephadex G-10
(Krohn, 65) | ----- 79 |

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

PAGINA

Figura 6	Filtración sobre Sephadex G-25 de ELD capaz de trans- ferir hipersensibilidad retardada. (Wilson, 126)	-----	84
Figura 7	Cromatografía sobre Bio-Gel P-2 de Hipoxantina y de una fracción de ELD con actividad biológica. (Wilson, 126)	-----	86
Figura 8	Cromatografía que muestra cuatro fracciones de ELD activo, las cuales incre- mentan el GMPC de leucocitos (Sandler, 92)	-----	89

R E S U M E N

El Factor de Transferencia (FT), representa el material dializable de bajo peso molecular (menos de 10 000 daltons) del extracto total de leucocitos periféricos. Tal Factor es capaz de transferir sensibilidades antigénicas del donador a receptores no sensibilizados. El efecto del Factor de Transferencia, puede mostrarse a través de varios indicadores de inmunidad celular, tales como: fenómeno de Hipersensibilidad Retardada; Blastogénesis de Linfocitos; Liberación de Factor Inhibidor de Macrófagos (MIF); aumento de células formadoras de rosetas con eritrocitos de carnero. Aunque la naturaleza bioquímica de su componente activo ha sido ampliamente analizada, ésta permanece aún desconocida, sin embargo, ha sido establecido que dicho material contiene Ribosa y es resistente a la actividad de RNAasa, DNAasa y Tripsina, pero no a Pronasa. Así mismo, tampoco su mecanismo de acción ha sido confirmado. El interés en el estudio de FT, ha sido intensificado por su demostrada eficacia en algunos pacientes con inmunodeficiencias, neoplasias y enfermedades infecciosas por virus, hongos, protozoarios o de etiología micobacteriana. Su uso en inmunoterapia se ha incrementado dramáticamente, ya que este tratamiento simple y sin riesgo ofrece grandes ventajas sobre otras estrategias terapéuticas.

O B J E T I V O S

El objetivo de este trabajo es presentar una integración bibliográfica acerca del FACTOR DE TRANSFERENCIA, dada la importancia de éste en la Inmunología Clínica, proporcionando así un panorama amplio y actualizado del mismo, para su mejor comprensión. Para tal propósito se abordan tres aspectos en el estudio de Factor de Transferencia:

- I ACTIVIDAD BIOLÓGICA
- II PROPIEDADES QUÍMICAS
- III APLICACIONES CLÍNICAS

I.- INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

El desencadenamiento de una respuesta inmunológica, es una consecuencia de la estimulación de células linfoides por parte de un antígeno (34). Tal estimulación, puede resultar en: la síntesis de anticuerpos humorales contra el antígeno; aparición de inmunidad celular respecto de dicho antígeno, o ambos tipos de respuesta (38, 83). A pesar de que los dos mecanismos no son totalmente independientes, y de que la cooperación entre ellos es importante, son distintos. La base de esta dualidad en el Sistema Inmune, reside en la existencia de dos poblaciones diferentes de células linfoides: los linfocitos B, que son precursores de células plasmáticas, las cuales producen anticuerpos y las células T, que participan en la inmunidad celular (34, 83), siendo un modelo de ésta, el fenómeno de hipersensibilidad retardada, el cual se ejemplifica por una respuesta inflamatoria tardía cuando ciertos antígenos solubles son inyectados por vía subcutánea o intradérmica en sujetos y animales sensibilizados (34).

La inmunidad celular es un importante mecanismo de defensa contra muchos tipos de antígeno extrínsecos y contra las tumoraciones neoplásicas formadas en el organismo. Es también primordial en el rechazo de injertos (27, 38). Así, el poder transferir inmunidad, tanto humoral como celular, cuando existe

inmunoincompetencia es algo que siempre ha preocupado a los investigadores. A través del estudio de ciertas enfermedades de inmunodeficiencia se ha establecido que en el suero los anticuerpos pueden ser transferidos, no así la inmunidad celular. La transferencia de inmunidad celular ha sido objeto de un gran número de investigaciones. Landteiner y Chase en 1942 (28, 34, 67, 96) descubrieron que la sensibilidad cutánea tardía a simples compuestos, así como a tuberculina, podía ser transferida por la inyección de células de exudado peritoneal de cobayos sensibilizados a animales no sensibilizados. Subsecuentemente, H. Sherwood Lawrence, (70, 96) demostró que la hipersensibilidad cutánea a tuberculina y a antígenos de *Estreptococo*, podía ser transferida en hombres, por la inyección intradérmica de leucocitos viables de la sangre, de donadores con reactividad cutánea positiva a receptores con reacción negativa a esos antígenos. En una extensión de este trabajo, el mismo, mostró que tal transferencia de sensibilidad retardada podía lograrse con extractos de leucocitos tan eficientemente como con leucocitos viables. El seleccionó el término FACTOR DE TRANSFERENCIA como una designación conveniente para el material extraído de leucocitos, el cual fue responsable de la transferencia de hipersensibilidad retardada a receptores no inmunes (70, 96).

A esto siguió el interés por conocer el mecanismo de acción, así como la caracterización de dicho material. El Factor

de Transferencia (FT) resultó ser una molécula dializable de peso molecular de menos de 10 000 daltons; no antigénica, ni con características de una inmunoglobulina. (69, 96, 106). Cuando es inyectado a los receptores, no induce respuesta humoral detectable ni respuesta inmune celular en contra de sí mismo. (34, 69, 96)

A pesar de los avances en las técnicas de separación de varias subpoblaciones de leucocitos, no se han presentado todavía datos para definir la asociación del Factor de Transferencia con una subpoblación de leucocitos específica. Los primeros reportes indicaron que las células necesarias para la transferencia de hipersensibilidad retardada eran células mononucleares no adherentes, predominantemente linfocitos, (96, 102), esto condujo a suponer que tal FT estaba asociado con linfocitos T. (69, 96). El sitio de acción de FT y las células sobre las cuales ejerce su efecto son aun desconocidas. Algunas evidencias sugieren que linfocitos T y monocitos pueden ser esenciales para su actividad, (69) pero el papel exacto de la participación de cada una de esas células no ha sido aclarado. Muchas de las características de la actividad biológica de FT fueron derivadas de los estudios originales efectuados por Lawrence in vivo. Se ha propuesto que además de conferir hipersensibilidad retardada, FT causa una nueva proliferación de leucocitos en la circulación, (70, 96), los cuales pueden transferir inmunidad medida por células a otros

receptores no inmunes. Estudios subsecuentes usando FT repetidamente han mostrado la presencia de linfocitos de respuesta antígeno-específica en los receptores (96), los cuales no habían estado presentes antes de la administración de éste. En experimentos diseñados para observar el efecto de FT sobre el rechazo de aloinjerto en humanos, Lawrence y sus colaboradores, notaron que individuos normales no poseen FT aloinjerto-específico dirigido en contra de los antígenos de histocompatibilidad de otros individuos, a menos que los primeros hayan sido inmunizados con el injerto (69). FT aloinjerto específico solo puede causar un acelerado rechazo del injerto usado para inmunizar al donador y no tiene efecto sobre otros injertos. (27, 34, 69, 96). Estudios adicionales in vitro han reportado otros efectos inespecíficos y específicos de FT, tales como: aumento de células formadoras de rosetas; aumento o supresión de la blastogénesis de linfocitos antígeno o mitógeno inducida; modificación de la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos; efectos sobre la migración de macrófagos (34, 38, 69, 96). Diversos modelos animales usando cobayos, conejos, ratones, bovinos y primates, se han descrito para el estudio de las propiedades inmunológicas y clínicas de FT (34, 108, 122, 124). Sin embargo, no se ha presentado un ensayo in vitro ni un modelo animal que conteste todas las interrogantes acerca de este factor.

**II.- METODO GENERAL DE PREPARACION DE FACTOR DE
TRANSFERENCIA.**

II. - METODO GENERAL DE PREPARACION DE FT

La preparación de Factor de Transferencia dializable, incluye varias etapas básicas (19, 70):

- A).- AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS
- B).- LISIS DE LAS CELULAS
- C).- DIALIS DE LOS LISADOS
- D).- LIOFILIZACION DE LOS DIALIZADOS
- E).- RECONSTITUCION DEL MATERIAL LIOFILIZADO

A).- AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS:

Los leucocitos de donadores apropiadamente sensibles a uno o varios antígenos, son aislados de sangre venosa con heparina y dextrans, dejándose sedimentar a 37°C. El plasma sobrenadante rico en leucocitos es removido y centrifugado, haciéndose repetidos lavados del paquete celular con solución salina fisiológica para remover eritrocitos contaminantes y trazas de plasma. Las células suspendidas en el menor volumen posible son contadas (70, 79, 106).

B).- LISIS DE LAS CELULAS:

Las células son tratadas por uno de los siguientes procedimientos para su lisis (106):

B.1).- Lisis con agua destilada.- Los leucocitos son suspendidos en agua destilada, incubándose a 37°C con agitación frecuente. Observaciones microscópicas hechas durante el curso de la leucocitolisis indican que en este procedimiento, inicialmente ocurre la ruptura de la membrana celular con subsecuente liberación de componentes citoplasmáticos dentro del sobrenadante, siguiendo a esto el rompimiento de la membrana nuclear. (69, 70)

B.2).- Congelamiento-Descongelamiento y tratamiento enzimático. Los leucocitos son suspendidos en solución salina fisiológica y congelados en una mezcla de CO₂ y alcohol al 90% o acetona, permaneciendo así aproximadamente dos horas, antes del primer descongelamiento en un baño de agua a 37°C. Varios ciclos de congelamiento-descongelamiento son efectuados. El número total de éstos es determinado por la evidencia microscópica de la completa destrucción de los leucocitos, (70) El material es tratado a 37°C con desoxirribonucleasa (DNAasa), en la presencia de Sulfato de Magnesio para activar a la enzima. (69, 70).

C).- DIALISIS DE LOS LISADOS

Los lisados son dializados a 4°C contra agua destilada estéril; o bien, pueden ser ultrafiltrados en un sistema Millipore, usando una membrana con límite de exclusión de 25 000 daltons (70, 89, 101). El material dializado con agua, para uso

in vivo, ha presentado una disminuída actividad in vitro y frecuentemente es tóxico para los cultivos de linfocitos. Este problema es solucionado dializando contra medio de cultivo de tejidos (9, 79).

D y E).- LIOFILIZACION Y RECONSTITUCION

Después de la diálisis, el material es liofilizado y almacenado a -20°C . Antes de su uso es reconstituído con agua destilada, ajustando el material extraído de 5×10^8 leucocitos en un mililitro, representando esta cantidad una UNIDAD INTERNACIONAL DE FT (50, 69, 89, 124). Finalmente para esterilizar el producto, es pasado éste a través de un filtro Millipore.

III.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FACTOR DE TRANSFERENCIA.

III.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA.

La transferencia de inmunidad celular, actividad biológica atribuida al Factor de Transferencia, ha sido generalmente demostrada a través del modelo in vivo de hipersensibilidad retardada (34, 69, 70, 96). No obstante, una serie de controversias se han desencadenado en torno al mecanismo de acción y a la posible especificidad o inespecificidad antigénica de tal actividad. Varios ensayos in vitro, que reflejan el efecto in vivo de FT han sido descritos, con el propósito de dar solución a estas interrogantes. Dichos ensayos han permitido conocer una variedad de efectos específicos e inespecíficos de FT sobre la inmunidad celular. El presente capítulo aborda el estudio de tales efectos, vislumbrados tanto de ensayos in vivo como in vitro. Por tal motivo, se presenta preliminarmente una breve descripción y metodología de tales pruebas involucradas.

A.- DESCRIPCIÓN Y METODOLOGÍA DE LOS ENSAYOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO DE FACTOR DE TRANSFERENCIA.

1.- Ensayo de Hipersensibilidad Retardada.- La hipersensibilidad, definida como una alteración de tejido, resultante de la exposición a material antigénico, (34, 38) es manifestada por una variedad de reacciones biológicas. De acuerdo al tiempo de aparición y mecanismo de la reacción, la hipersensibilidad

puede ser inmediata o tardía. La primera requiere la presencia de anticuerpos y aparece en un lapso de 4 a 6 horas después de la exposición al antígeno. La hipersensibilidad retardada es mediada por linfocitos sensibilizados, y los cambios en el tejido se vuelven máximos en un lapso de 24 a 48 horas (24, 34). Después de la inyección intradérmica de un antígeno específico en un individuo hipersensible, ocurre la migración de células mononucleares con formación de induración (23). La reacción a tuberculina es un ejemplo clásico de hipersensibilidad retardada (23, 34, 38). En adición a la tuberculosis, otras infecciones bacterianas (tularemia, brucelosis), infecciones virales (paperas, viruela) y enfermedades micóticas (histoplasmosis, coccidiosis); también inducen hipersensibilidad retardada (23, 24). Las hipersensibilidades por contacto son también del tipo tardío, en donde simples compuestos tales como dinitroclorobenceno y clorato de picrilo actúan como agentes sensibilizantes (26, 34, 38). Los antígenos de trasplante, así como algunos antígenos tumorales inducen también hipersensibilidad de tipo celular (23, 27, 96). La medida del diámetro de induración es un índice del grado de sensibilización (34,69).

2.- Ensayo de Blastogénesis de Linfocitos.- La activación de un linfocito T, se inicia con una serie de procesos biológicos que ocurren cuando el linfocito sensibilizado se pone en contacto con el antígeno específico (38) Dichos procesos incluyen, la

transformación de linfocitos en células metabólicamente activas, que poseen la morfología de blastos. Esta transformación, se acompaña de una serie de complejos eventos bioquímicos que incluyen: elevación de la adenilato ciclasa y elevación consecuente de Monofosfato de Adenosina cíclico (AMPc) intracelular; fenómenos relacionados con la membrana, como, aumento de síntesis de fosfolípidos, aumento de permeabilidad a los cationes divalentes. La síntesis de proteínas; de RNA y finalmente de DNA, ocurre poco tiempo después (34, 38, 83).

In vitro, la transformación de los linfocitos T, puede ser inducida, no solo por antígenos específicos, sino también por mitógenos, como, concanavalina A (extracto de Conavalia ensiformis) y la Fitohemaglutinina (extracto de Phaseolus vulgaris) las cuales son lectinas que estimulan un gran número de linfocitos (34, 38, 83).

La técnica in vitro de transformación linfocítica es comúnmente empleada para evaluar la inmunidad celular en enfermos con inmunodeficiencia, autoinmunidad, enfermedades infecciosas y neoplasias (26, 38). Los parámetros utilizados en el laboratorio para medir la transformación incluyen:

- a).- Conteo de la proporción de células que sufren alteraciones morfológicas, como, aumento de tamaño.

b).- Medición de la síntesis de DNA, por medio de la captación de precursores de éste, marcados con radiactividad (34, 38).

Este método es el más empleado y comprende las siguientes etapas: Los linfocitos sensibilizados son purificados a partir de sangre periférica heparinizada por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hipaque, y cultivados a una concentración aproximada de 1×10^6 linfocitos/ml. El antígeno específico es adicionado a los cultivos en concentraciones adecuadas, y son incubados éstos en una mezcla de CO₂ al 5% en aire durante 5-7 días, tiempo en el cual, los antígenos producen su máximo efecto sobre la síntesis de DNA. (34). En el caso de estimulación por mitógeno, los métodos de cultivo son idénticos a los empleados en la estimulación por antígeno, pero en contraste con ésta, no se requieren células sensibilizadas y el tiempo de respuesta máxima ocurre en 72 horas (34).

Una medición de la síntesis de DNA, es lograda, marcando los cultivos con Timidina tritiada (³H-Td), un precursor de nucleótidos, el cual es incorporado al DNA recién sintetizado. La cantidad de Timidina tritiada incorporada, es determinada por el número de cuentas en un espectrofotómetro de centelleo para líquidos.

Cálculo del Índice de Estimulación:

$$IE = \text{Índice de Estimulación} = \frac{\text{cpm en cultivos estimulados}}{\text{cpm en cultivo control}}$$

cpm = Cuentas por minuto

Cultivos Controles = Cultivos sin estimulantes antigénicos
o mitogénicos (9,11,34,79,124).

3.- Ensayo de la Inhibición de la Migración de Macrófagos.-
Numerosas sustancias son liberadas por los linfocitos sensibilizados, cuando éstos son puestos en contacto con el antígeno; estas sustancias actúan como mediadores inmunológicos y son denominadas linfocinas, las cuales, a través de su actividad biológica son capaces de reclutar células inflamatorias del huésped, activándolas y manteniéndolas en el sitio de reacción. Entre estos mediadores de linfocitos, se encuentra aquél que inhibe la migración de los macrófagos. La determinación in vitro de este factor ha sido útil para evaluar la inmunidad mediada por células, implicando ésto, que tal ensayo puede ser usado para detectar y estudiar in vitro la actividad de Factor de Transferencia en ELD (123), así como el efecto de éste en los receptores.

La base del ensayo de Inhibición de la Migración de Macrófagos (MMI), es la determinación de respuestas que son consecuencia de la liberación del Factor Inhibidor de la Migración

de Macrófagos (MIF), por los linfocitos sensibilizados (34). La producción de MIF es específica, es decir, los linfocitos cultivados en ausencia de Ag específico o en presencia de un Ag para el cual, el donador de linfocitos no es sensible, no producirán este factor.

Las suspensiones purificadas de leucocitos de individuos inmunizados, son colocadas en pequeños tubos capilares de vidrio, los cuales son sellados en un extremo, centrifugados y luego cortados en la interfase célula-líquido. La porción del capilar que contiene las células es colocada en la cámara de cultivo de tejidos; a ésta se le adiciona medio de cultivo que puede o no contener Ag. Las cámaras son incubadas a 37°C durante 18-48 horas. En este período las células migran fuera de los tubos capilares sobre la superficie de vidrio de la cámara. En presencia de un antígeno específico, se puede demostrar que las células sensibilizadas no migran tan lejos como las células que no se encuentran expuestas al Ag. (31, 34, 90, 93, 125).

Suspensiones purificadas de macrófagos pueden ser colocadas en el tubo capilar dentro de la cámara de cultivo. En el período de incubación, los macrófagos salen del tubo y se extienden por las paredes de vidrio de la cámara. Si hay en esta un pequeño número de linfocitos T sensibilizados y se adiciona una cantidad de Ag específico, se impide la migración de macró-

fagos fuera del tubo capilar. Las áreas de migración celular son medidas, y se calcula el índice de migración, el cual indica indirectamente la cantidad producida de MIF (34, 93, 125).

$$\text{IM} = \text{Índice de Migración} = \frac{\text{Área de migración en presencia de Ag}}{\text{Área de migración en ausencia de Ag}}$$

Para evaluar los efectos in vitro de ELD sobre la inhibición de la migración de macrófagos; poblaciones purificadas de leucocitos no sensibilizados son incubadas bajo condiciones individuales de: medio de cultivo, antígeno, sustancia de prueba, o, sustancia de prueba + antígeno.

Sustancia de prueba = Extracto de Leucocitos Dializable o fracciones de éste.

Un método indirecto puede ser también empleado: la suspensiones celulares de macrófagos son incubadas con sobrenadante libre de células obtenido de cultivo de linfocitos no sensibilizados, estimulados con sustancia de prueba y/o Ag. (31, 93, 125).

Mediante estas técnicas, es posible analizar, tanto efectos Ag-independientes, Ag-Dependientes de FT, así como también su especificidad (124, 125). Para determinar actividad Ag-inde-

pendiente, el siguiente índice de migración es calculado:

$$IM_A = \frac{\text{Area de migración en presencia de sustancia de prueba}}{\text{Area de migración en presencia de medio de cultivo}}$$

Efectos Ag-Dependientes sobre la migración de macrófagos causados por la sustancia de prueba, son indicados por el cociente: (124)

$$IM_B = \frac{\text{Area de migración en presencia de Ag + Sustancia de prueba}}{\text{Area de migración en presencia de Ag.}}$$

4.- Ensayo de la Formación de Rosetas.- Los linfocitos T, con un grado de maduración, que les permite ser activos, presentan en su membrana receptores para eritrocitos de carnero, por lo que pueden unirse a éstos formando rosetas (34, 124). La determinación de la formación de rosetas, es uno más de los ensayos in vitro empleados para medir actividad inmune celular y por consiguiente adecuado en el estudio de FT. (34,81,119,124)

Una suspensión celular en solución salina balanceada de Hanks, conteniendo eritrocitos de carnero estandarizado al 2% y linfocitos purificados en una concentración de 4×10^6 células/ml, suplementada con 10-25% de suero, es incubada a 37°C por aproximadamente 5 minutos, seguida por centrifugación ligera para aglutinar las células; dejándose después toda la noche a 4°C. Las células son suspendidas de nuevo y el número absoluto de rosetas es contado en una cámara de Newbawer. Una roseta es contada como un linfocito ligado a 3 o más eritrocitos de carnero.

B.- EFECTOS IN VIVO DE FACTOR DE TRANSFERENCIA.

Desde que el Factor de Transferencia fué definido, como un extracto de leucocitos dializable, capaz de transferir hipersensibilidad retardada específica, muchos debates han surgido en torno a éste. Mientras unos autores aseguran que FT transfiera inmunidad celular específica de donadores sensibilizados a receptores no sensibilizados; otros consideran la posibilidad de que el efecto de FT en la inmunidad celular es el de un inmunopotenciador. Si el efecto de FT, ya sea el de transferir o inmunopotenciar inmunidad celular, es específico o inespecífico, ha sido también controversial, aunque la mayoría de los hallazgos han sido más compatibles con un mecanismo específico.

1.- Transferencia específica de hipersensibilidad retardada.- Muchos investigadores han demostrado la facilidad de transferir hipersensibilidad retardada en respuesta a una gran variedad de antígenos bacterianos, fúngicos y virales, por medio de FT. Han postulado que las variables que gobiernan el éxito de tal transferencia son: la intensidad de la reacción cutánea al antígeno de prueba expresada por el donador de leucocitos y la dosis empleada de extracto de leucocitos dializable. (34, 69, 70)

El papel de la dosis, es ilustrado por los datos obtenidos por Lawrence, de que 0.1 ml de ELD (8.5×10^6 células), fueron

suficientes para la transferencia de sensibilidad a tuberculina a cada uno de los receptores no inmunes. Sin embargo, con 0.05 ml (4.2×10^6 células) obtenido del mismo donador e inyectado a cada uno de los mismos receptores, no fue posible la transferencia de sensibilidad. (69). En una transferencia similar de hipersensibilidad retardada a proteína de Estreptococo, los resultados fueron similares a aquellos obtenidos usando tuberculina como antígeno (23). Ha sido demostrado también que la sensibilidad por contacto a dinitrobenceno, puede ser transferida de sujetos normales activamente sensibilizados a otros individuos normales a través de la inyección subcutánea de grandes volúmenes de leucocitos ($5-8.4 \times 10^8$) (69).

De interés fueron los hallazgos de Lawrence (69), de que donadores con pruebas cutáneas negativas a un Ag determinado no transfieren sensibilidad para ese Ag, y que la transferencia de hipersensibilidad es inmunológicamente específica, adquiriendo el receptor, el perfil exacto e intensidad aproximada de las reactividades cutáneas tardías expresadas por el donador.

Good y colaboradores (69), en un estudio efectuado en pacientes agammaglobulinémicos, transfirieron hipersensibilidad retardada para toxoide diftérico mediante ELD, obtenido de donadores que presentaban reacciones cutáneas tardías a dicho Ag. Los leucocitos de donadores que presentaban reacciones cutáneas

contra globulina de caballo, transfirieron hipersensibilidad retardada contra esa globulina a individuos normales (Martin y Good. 69). En un intento para demostrar la transferencia de inmunidad celular con un antígeno de polen, Becker y colaboradores (13) empleando leucocitos obtenidos de individuos sensibilizados naturalmente a ese Ag, prepararon FT, el cual fue inyectado a individuos normales, desarrollando éstos una respuesta de hipersensibilidad retardada a tal Ag (13). Maurer, reportó que lisados de leucocitos de sangre periférica de donadores con HR a óxido de etileno, podían transferir reacción cutánea para ese compuesto a receptores no inmunes. (60)

En un estudio de pacientes con malignancia avanzada, Hattler y Amos (69), estudiaron la transferencia de inmunidad celular empleando para ello suspensiones de linfocitos puros. Los donadores presentaron patrones variables de reactividades positivas y negativas a: virus de paperas, Trichophyton, Cándida, tuberculina e Histoplasmina. Los receptores del TF, quienes eran uniformemente no reactivos a esa batería de antígenos, adquirieron solo las sensibilidades que poseían los donadores. Los datos confirman una vez más el hallazgo de una correlación directa entre reacción expresada por el donador y la adquirida por el receptor.

Investigando la transferencia de inmunidad celular de humanos a primates no humanos, Steel (108), seleccionó un donador de FT que tenía una alta respuesta en piel a los antígenos de Cándida, toxoide tetánico, virus de paperas, coccidiodina, y no presentaba respuesta a los Antígenos de histoplasmina y PPD (tabla 1). Dicho Factor de Transferencia fue inyectado a 9 monos, los cuales fueron criados en un medio ambiente libre de gérmenes y no presentaban reactividad a ninguno de los antígenos en estudio. La transferencia de sensibilidad solo ocurrió para aquellos antígenos a los cuales el donador de leucocitos era sensible. 4 de 6 animales presentaron respuesta de HR a Cándida; 4 de 9 a toxoide tetánico; 2 de 9 a virus de paperas; 3 de 9 a coccidiodina, indicando estos datos que el porcentaje de respuestas positivas fue de 39% (tabla 2). Los receptores no mostraron respuestas con antígenos para los cuales FT no era específico.

Zuckerman y col. fueron capaces de transferir reactividad cutánea tardía al antígeno de Hemocianina de Lapa (HL) con factor de transferencia de un donador sensible a HL a 10 receptores no inmunes. El donador también presentó reactividad a PPD, y 8 de los 10 receptores obtuvieron respuesta a este Ag (60). Otras dos preparaciones de FT, una de un donador con respuesta cutánea negativa para HL y positiva para PPD; y la otra de varios donadores de sensibilidad desconocida, fracasaron ambas para transferir reactividad contra HL; pero los receptores de FT

T A B L A 1

DATOS INMUNOLOGICOS DE UN DONADOR DE FT-HUMANO
(Respuesta Cutánea de Hipersensibilidad retardada)

Antígeno	Respuesta Cutánea ^a
Cándida	43 mm
Toxoide Tetánico	19 mm
Virus de Paperas	17 mm
Coccidioidina	70 mm

^a Expresada como mm de induración en 48 horas.

La tabla nos muestra la respuesta cutánea de hipersensibilidad retardada, por un donador a varios antígenos. La reacción se consideró positiva si el diámetro de induración fue mayor a 5 mm a las 48 horas. (Steel, 108).

específico para PPD desarrollaron reactividad a tuberculina (60). En 1979, Burger y col. (17) estudiando las propiedades estructurales de FT demostraron también la especificidad de éste en el fenómeno de hipersensibilidad retardada. En los experimentos de Burger, los donadores de leucocitos fueron inmunizados por administración intradérmica con HL; 4 semanas más tarde, la reactividad en piel en los donadores fué de 22-25 mm de induración a las 24 horas. El ELD o fracciones seleccionadas de éste obtenidas por cromatografía, fueron inyectadas subcutáneamente a receptores en quienes no se había determinado la reactividad cutánea antes de la administración de FT, debido a que la exposición al Ag podría constituir una dosis primaria del mismo. Se consideraron los receptores sin reactividad a HL, ya que 40 voluntarios normales no respondieron a éste Ag, y, además, ninguno de los receptores respondió al Ag en un ensayo in vitro de blastogénesis de linfocitos antes de recibir FT. 4 a 7 días después de la administración de FT, se les efectuó a los receptores una prueba cutánea, y el diámetro de induración fue de 14 ± 3 . Controles positivos incluyeron pruebas cutáneas con Fitoheماغلوتينina en todos los receptores, asegurando así, la habilidad de éstos para desarrollar respuesta dérmica. Las respuestas no fueron menores de 12 mm de induración. El Ag de coccidioidina fue empleado como control negativo, sólo 2 de 33 receptores tuvieron reacción positiva a coccidioidina. Los receptores de ELD de donadores sin reactividad a HL no respondie-

T A B L A 2

PORCENTAJE DE RESPUESTAS POSITIVAS DE HR EN RECEPTORES
NO INMUNES DE FT-ESPECIFICO.

Antígeno	Número de receptores que mostraron respuesta positiva/Número de receptores estimulados.
Cándida	4/6
Toxoide Tetánico	4/9
Virus de Paperas	2/9
Coccidioidina	3/9
Total de respuestas positivas	13/33 (39%)

Se muestra el número de receptores que obtuvieron respuesta positiva a varios antígenos después de la administración de FT-específico, dividido entre el número total de receptores. Las respuestas cutáneas se consideraron positivas cuando el diámetro de induración fue mayor o igual a 5 mm. (Steel, 108)

ron al Ag. En este trabajo se empleó un Ag no microbiano, el cual no se encuentra normalmente en la población de receptores, esto permitió, la evasión de una exposición primaria, la cual debería ser requerida para seleccionar individuos insensibles a antígenos microbianos. De esta manera, se pudo relacionar más claramente la reactividad dérmica en el receptor con la sensibilidad del donador. Los datos soportan el concepto de transferencia específica para FT.

Burger y Vetto, buscando técnicas de preparación de FT, reportaron la transferencia específica de HR. FT de donadores con reactividad cutánea a coccidioidina, fué inyectado a receptores sin reactividad dérmica detectable a este Ag. Todos los receptores presentaron respuestas de HR a coccidioidina (19), no respondiendo a otros antígenos diferentes.

La transferencia específica de inmunidad mediada por células ha sido también observada en ciertas situaciones clínicas, como, transfusiones sanguíneas y trasplantes renales, ya que en estos casos puede ocurrir un rechazo de las células transfundidas por el huésped inmunocompetente. Como un resultado de este rechazo, hay lisis celular, con la subsecuente liberación de componentes celulares, incluyendo a FT. (69)

En la mayoría de los experimentos en los que se ha estudiado el efecto de FT sobre el fenómeno de transferencia de HR, se han empleado antígenos ubicuos, tales como: tuberculina, proteína de Estreptococo, toxoide diftérico, cándida, etc. (60). Esto conduce a postular que la mayoría de los receptores de FT han tenido un contacto con el Ag, previo a la administración de FT. Ha sido esta la base sobre la cual varios investigadores, consideran la alternativa de un papel inmunopotenciador para FT. Esta posibilidad ha llevado a diseñar ensayos controlados, que incluyen receptores no inmunizados y preinmunizados.

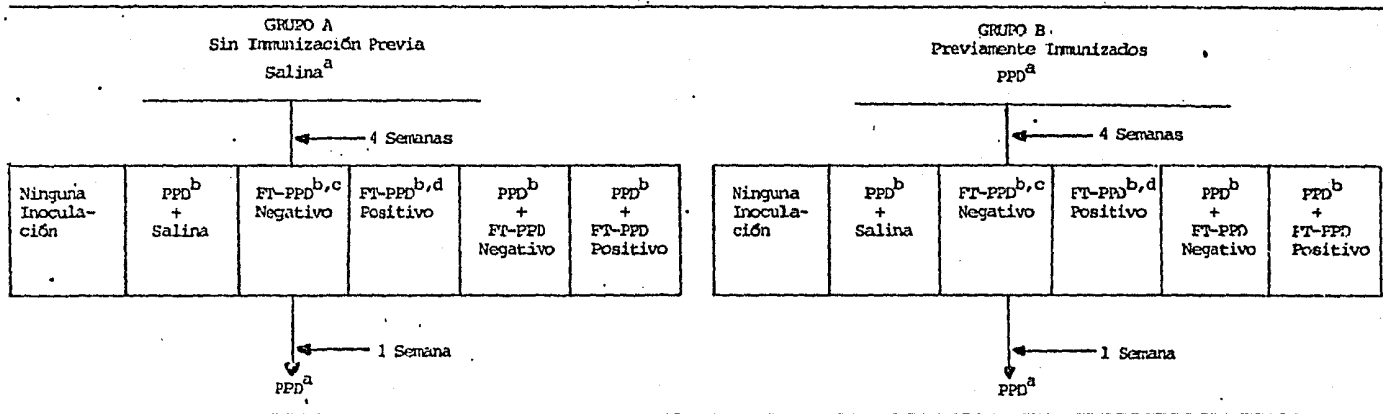
En un estudio efectuado en cobayos, Welch y col. (122) reportaron la necesidad de una inmunización previa para observar el efecto de FT sobre la hipersensibilidad retardada. Los donadores de leucocitos para tal estudio fueron seleccionados por sus respuestas in vivo e in vitro para el Ag PPD. El FT de donadores con diámetros de induración mayores a 5 mm a las 48 horas después de la exposición al Ag, fué considerado FT-PPD positivo. Los individuos que no presentaron reacción fueron donadores de FT-PPD negativo. El protocolo experimental es resumido en la Tabla 3. Ochenta y ocho cobayos fueron divididos en dos grupos. Un grupo A, recibió inyecciones de solución salina, un segundo grupo B recibió inyecciones de PPD . 24 horas después, los animales no mostraron ninguna reactividad, 4 semanas más tarde, los grupos A y B fueron divididos en

subgrupos, cada uno de los cuales fué tratado por una de las siguientes maneras:

- a).- Ninguna Inoculación.- Este subgrupo representó controles para determinar si los animales presensibilizados producen respuesta de HR 5 semanas después de la inmunización.
- b).- Inoculados con PPD.- Para determinar si la segunda inyección de Ag inducía HR, sin la adición de FT.
- c).- FT-PPD negativo fué administrado, en ausencia del Ag específico. Este subgrupo representó un control para determinar si FT-PPD negativo podía producir por sí solo HR a tuberculina.
- d).- FT-PPD positivo fué administrado en ausencia de Ag específico. Este grupo fué útil para determinar si FT-PPD positivo producía por sí mismo HR a tuberculina.
- e).- Inoculados con FT-PPD negativo y Ag específico. Para determinar si la adición de Ag a FT-PPD negativo induce HR.
- f).- Inoculados con FT-PPD positivo y PPD. Para determinar si la adición de Ag específico a FT-PPD positivo induce HR.

T A B L A 3

PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA UN ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD IN VIVO DE FACTOR DE TRANSFERENCIA, EN COBAYOS.



^aInyección Intradérmica

^bInyección Intramuscular

^cFT-PPD Negativo, obtenido de un donador con reactividad negativa para PPD

^dFT-PPD Positivo, obtenido de un donador con reactividad positiva para PPD

La tabla muestra un diagrama experimental para demostrar si una inmunización previa, es necesaria o no, para el efecto de FT sobre la respuesta de HR. 38 cobayos fueron divididos en dos grupos, el A y el B. El grupo A recibió inyecciones de solución salina antes de la administración de FT, Ag ó FT + Ag; el grupo B fue inmunizado previamente con Ag (PPD). Estos grupos fueron divididos en subgrupos, cada uno de los cuales recibió el tratamiento que se indica. (Welch, 122)

Las reacciones de HR no ocurrieron cuando los animales preinmunizados y no inmunizados recibieron: solo Ag, FT-PPD positivo o negativos solos, FT-PPD negativo en presencia de Ag. Los animales que no estaban presensibilizados no desarrollaron respuestas de HR cuando se les administró FT-PPD positivo y Ag específico. La HR fue transferida exitosamente a la mayoría de los animales preinmunizados que recibieron FT-PPD positivo en presencia de Ag específico. Los resultados sugieren que para que FT induzca respuestas de HR, es necesario una preinmunización de los receptores con el Ag específico, y además, que FT sea administrado junto con el Ag. Los autores proponen que la preinmunización es también importante en receptores humanos. La observación de que FT de donadores negativos a PPD no produjo HR contra este antígeno aún cuando fué administrado junto con éste, sugiere que FT no actuó como un adyuvante no-específico en esos experimentos. El estudio plantea que FT actúa sobre especificidades latentes del receptor. Así, la sensibilidad demasiado baja a un antígeno expresada por HR cutánea, puede ser aumentada a un nivel demostrable de un modo específico por la inyección de FT de un donador con prueba cutánea positiva para tal Ag.

La exposición previa al Ag puede explicar algunos de los éxitos de FT sobre reactividades de HR en animales, por ejemplo, las ratas descritas por Liburd (73), las cuales presenta-

ron reactividad a coccidioidina por la acción de FT. Este Ag es ubicuo para ratas que no son criadas en medio ambiente libre de gérmenes.

Un estudio similar al de Welch, fue reportado por Wilson y col. (126) en el cual, cobayos preinmunizados con PPD fueron inyectados con FT específico para PPD, acompañado del Ag específico. Subsecuentemente se les efectuó una prueba cutánea con Ag de PPD. Los animales mostraron resultados positivos (7.5 mm de induración). Como controles, se incluyeron pruebas cutáneas con antígenos no relacionados y además, administraciones de FT de donadores sin reactividad a PPD. Menos de 1 mm de induración fué observado cuando cobayos preinmunizados con PPD y que recibieron FT-PPD positivo en presencia de Ag específico, fueron probados con antígenos tales como, proteínas de estreptococo (Estreptocinasa-Estreptodornasa), histoplasmina y coccidioidina. FT-PPD negativo, no transfirió HR contra PPD.

En general, los casos de pacientes tratados con FT, quienes presentan una infección con un Ag determinado y muestran inmunidad dañada hacia dicho antígeno, pueden considerarse como circunstancias en las cuales existe una preinmunización, es decir, que hay contacto del huésped con el antígeno antes de la administración de FT. Kirkpatrick, (59) reportó que 21 de 23 pacientes con candidiasis mucocutánea, desarrollaron hiper-

sensibilidad retardada a cándida, después de recibir FT de donadores sensibles a cándida. En un estudio efectuado en 7 pacientes con leishmaniasis cutánea, los cuales no presentaban reactividad de HR al Ag de Leishmania, fueron tratados con ELD de donadores con reactividad positiva para ese Ag. 4 de 7 receptores obtuvieron respuesta cutánea Ag-específica, después de la administración de ELD. Los diámetros de induración estuvieron en el rango de 7 a 12 mm (30).

Catanzaro y col. (24), en un caso de histoplasmosis, empleando terapia con FT de donadores con reacción positiva a histoplasmina, reportaron que después de la administración de éste, la respuesta a histoplasmina en el paciente tuvo una conversión de negativa a positiva. En adición, el paciente mostró reactividad a antígenos que no estaban relacionados con la sensibilidad del donador. Este reporte representa uno de los pocos estudios in vivo que sugiere que FT no solo actúa en forma específica, sino también de manera inespecífica en el fenómeno de transferencia de HR.

En un estudio reciente, Gottlieb y Sutcliffe (40), mostraron que una fracción purificada de ELD intensificaba la respuesta de HR cuando era inyectada intradérmicamente junto con un Ag para el cual el receptor era ligeramente sensible. Los resultados también demostraron que el efecto de tales fraccio-

nes fué Ag-dependiente pero no Ag-específico, ya que la reacción de amplificación ocurrió independientemente de que el donador de leucocitos presentara o nó sensibilidad al Ag de prueba.

Ha resultado difícil establecer la manera por la cual el ELD induce HR. Seguramente en este dializado existen muchas moléculas diferentes, y cada una de ellas contribuye de manera distinta para desencadenar la reacción. Probablemente, unos tienen la función de transferir, mientras que otros se encargan de amplificar una sensibilidad ya existente. Un correcto fraccionamiento así como el conocimiento de la naturaleza química de ELD, contribuirán en mucho para descifrar el mecanismo de los efectos de FT en la Hipersensibilidad Retardada. Así también para poder atribuirle a FT un carácter específico o inespecífico, es necesario la descripción de un ensayo, en el cual, experimentos cruzados puedan realizarse, es decir, empleando preparaciones de donadores con reactividad cutánea exclusivamente positiva para el Ag A y negativa para el Ag B; y otra preparación con reactividad negativa para A pero positiva para B, las cuales sean administradas a receptores no inmunizados. Esto no ha sido fácil de lograr, debido a que para ello, es necesario el empleo de antígenos que no sean ubicuos en el medio ambiente, tales como, simples compuestos químicos. Desafortunadamente la transferencia con estos compuestos no ha tenido mucho éxito. Sin embargo, algunos investigadores lo han intentado.

Good y col. (69) lograron transferir sensibilidad por contacto a dinitrofluorobenceno (DNFB) de donadores normales sensibilizados a receptores no sensibilizados. Epstein y Kligman (69), reportaron sobre el éxito de la transferencia a tres compuestos químicos: pentadecilcatecol (PDC), p-nitrosodimetilanilina (NDMA) y dinitroclorobenceno (DNCB). La transferencia de sensibilidad a PDC pareció más fácil que para NDMA o DNCB. Dicha sensibilidad a PDC fué reportada exitosamente en 17 de 19 intentos. La transferencia de sensibilidad fue sistémica y persistió de 5 a más de 14 meses en 5 receptores. Brandriss (21), usando preparaciones de FT obtenido de donadores sensibilizados a DNCB, logró transferir una débil reacción de HR en 2 de 8 receptores. Arala-Chávez y Pinto (7), también intentaron la transferencia de sensibilidad a DNCB con lisados de leucocitos, pero ninguno de sus receptores desarrolló reactividad. Epstein y Byers, reportaron otro intento de transferencia de HR a fluoruro de Berilio (60). Una cuestión central en su estudio, fué el hecho de que la sensibilización con FT solo ocurrió en personas quienes habían sido presensibilizadas con el Ag. Ninguno de los 20 sujetos quienes recibieron repetidas dosis de fluoruro de berilio, sin la administración de FT, obtuvieron reactividad. Los 14 sujetos estimulados con FT, pero que no recibieron ninguna inmunización previa, no obtuvieron reactividad. 14 de 38 receptores, quienes fueron repetidamente expuestos a sales de Berilio y que recibieron en presencia de Ag específico, FT de donadores sensibles, desarrollaron

reactividad contra fluoruro de Berilio. El estado de sensibilidad pareció ser transitorio; 12 receptores presentaron reactividad una semana después de la administración de FT, pero solo 4 permanecieron sensibles semanas más tarde. En el diseño experimental, no se incluyó ningún grupo que recibiera FT de donadores insensibles a Berilio; si esto se hubiera considerado y tales receptores no obtenían reactividad, una fuerte evidencia para especificidad de FT se habría obtenido, además de la comprobación del requerimiento de una preinmunización para la transferencia de HR con FT.

Es posible que la sensibilidad a dichos compuestos químicos esté regida genéticamente. En tal caso, esto representaría una limitante para el estudio de la especificidad de FT. No obstante, un modelo que ha argüido una especificidad indiscutible para el efecto de FT, es el representado por el rechazo de injertos, en el cual se ha demostrado, que la transferencia de HR hacia un injerto por medio de FT, no es posible si el donador de leucocitos no ha sido inmunizado previamente con las células del injerto.

El poder transferir Hipersensibilidad Retardada de un individuo a otro, a través de extracto de leucocitos, indica que tal extracto no contiene antígenos asociados al CMH (106). Dicha transferencia ha sido posible no solo entre individuos de la misma especie, sino también entre diferentes especies. La

transferencia in vivo de HR de humanos a primates no humanos ha sido lograda por Maddison y col. (76) empleando FT; la conversión de negativa a positiva de la reacción inmune celular a Schistosoma mansoni y a cuatro especies de Mycobacterium fué evidente. Burger (96), ha reportado la transferencia de reactividad de cobayos a conejos a través de ELD. Welch y col. (122) describieron que la administración de FT humano a cobayos, resultaba en una transferencia de HR a un antígeno específico. Estudios por Kleisus (63), Wilson (80) y Fudenberg (106) han mostrado que extractos dializables de nódulos linfáticos de bovinos inmunes transfieren HR a humanos, conejos, perros, monos y ratones.

En un estudio efectuado por Etchberg y col. se evaluó la capacidad de tres especies de primates para desarrollar HR, después de la administración de FT de donadores humanos sensibilizados o bien de FT de babuinos inmunes. Los primates incluyeron: babuinos (Papio cynocephalus); monos cebús (Cebus albifrons) y monos de América del Sur (Saguinus oedipus). Estas especies fueron seleccionadas porque exhiben diferencias en susceptibilidades a agentes infecciosos y oncogénicos, así como también demuestran competencia inmune celular variante. Las respuestas inmunológicas de babuinos son relativamente normales, las de monos cebús, intermedias, y las de los monos de América del Sur son deficientes; todas ellas en comparación con las de humanos. La

transferencia de HR, se logró tanto con FT humano como con FT de babuino, no encontrándose diferencias significantes entre las tres especies. Las respuestas usando FT de babuino no fueron tan extraordinarias como aquellas observadas siguiendo la administración de FT-humano. Esta diferencia pudo haberse debido a que los donadores de FT-humano, fueron seleccionados sobre la base de presentar extraordinaria reactividad en piel a los antígenos de prueba, en cambio en el caso de los donadores babuinos, menos de la mitad de ellos tuvo reacción positiva densa.

Bouchix y col. reportaron el éxito de la transferencia in vivo de inmunidad celular al antígeno de Hemocianina de Lapa, en humanos con cáncer, después de administrarles ELD de células de bazo de ratas adultas inmunes a HL (69).

2.- Otros Efectos in vivo.- Algunos investigadores han demostrado que ELD tiene efectos sobre el Sistema Reticulo Endotelial de los receptores (47, 124). Después de la administración de ELD a ratones, el bazo de éstos presenta un decremento en su peso, comparado con el de animales controles inyectados con solución salina fisiológica. Una alteración en la apariencia del bazo es también notada después del tratamiento con ELD, apreciándose la existencia de nódulos linfoides y de una desorganización general de la estructura esplénica. Ha habido evidencia

de que estos cambios detectados en el tejido linfoide, son diferentes a los efectos notados después de la inyección de Ag. (124) Esto sugiere que la actividad de ELD, no es el resultado de material antigénico que pudiera estar contenido en éste. La observación de que ELD produce cambios morfológicos y funcionales en el tejido esplénico de los receptores, propone que el ELD tiene un efecto inmune regulatorio, además de la capacidad de transferir Hipersensibilidad Retardada.

C.- EFECTOS IN VITRO DE FACTOR DE TRANSFERENCIA CONTENIDO EN EL ELD.

Varios ensayos in vitro han surgido con el propósito de estudiar por medio de ellos, el mecanismo por el cual FT transfiere inmunidad celular. Tales estudios han otorgado información pertinente de la actividad in vitro de FT.

1.- Efectos sobre la migración de Macrófagos.- Por medio del ensayo de Inhibición de la Migración de Macrófagos (MMI), se ha demostrado que el Factor de Transferencia, tiene efectos sobre la migración de éstas células. Muchos estudios han demostrado que FT aumenta la inhibición de la migración de las mismas, argumentando que tal efecto se debe a que FT confiere habilidad a los linfocitos para producir Factor Inhibidor de la migración de

Macrófagos (MIF) (80, 93, 124). Sin embargo se ha contemplado también la posibilidad de que, en el ELD existan componentes, los cuales inhiben directamente a los macrófagos (124, 125). Por otro lado, un aumento en la migración de macrófagos es otro efecto de FT que también ha sido reportado. (80, 124).

Paque (69) reportó que cuando linfocitos humanos no sensibilizados a histoplasmina eran incubados en presencia de antígeno específico con ELD preparado de donadores sensibles a histoplasmina; el sobrenadante del cultivo contenía un material, el cual inhibía la migración de macrófagos normales de coyo, sugiriendo así, que el extracto de leucocitos, había estimulado de un modo Ag-específico a los linfocitos no sensibilizados para que produjeran MIF.

Gregory B. Wilson y T. Newell, estudiando los efectos in vitro de extractos dializables de leucocitos de bovinos, sobre la inmunidad mediada por células en humanos, emplearon el ensayo de Inhibición de la Migración de Macrófagos (124). Usaron dos preparaciones de ELD obtenidas de donadores bovinos que presentaban sensibilidad cutánea al antígeno PPD (preparaciones ELD-PPD positivas); y otra de donadores sin reactividad a este Ag. (preparaciones ELD-PPD negativas). Los lotes fueron empleados a cuatro diferentes concentraciones. Dos efectos de tales extractos sobre la inmunidad celular in vitro fueron con-

siderados:

a).- Efectos Ag-Independientes

b).- Efectos Ag-Dependientes

Para determinar efectos Ag-Independientes, poblaciones de leucocitos no sensibilizados fueron incubadas directamente con preparaciones de ELD-PPD positivas o negativas, en ausencia de Ag. Los valores de los índices de migración indicaron los efectos Ag-independientes de ELD.

$$\text{Índice de Migración} = IM_A = \frac{\text{Área de migración en presencia de ELD}}{\text{Área de migración en presencia de medio de cultivo.}}$$

Tanto preparaciones ELD-PPD positivas como negativas, cuando fueron usadas a bajas concentraciones, produjeron un significativo aumento Ag-independiente de la migración de macrófagos ($IM_A > 1.10$) (Tabla 4).

Para determinar efectos Ag-Dependientes, los leucocitos no sensibilizados, fueron incubados con ELD-PPD positivo o bien, con ELD-PPD negativo, en presencia de Ag.

Las preparaciones de ELD-PPD positivas, produjeron una inhibición de la migración de leucocitos Ag-dependiente. Tal efecto fué demostrado por los valores de los índices de migración. ($IM_B < 0.9$ y que IM_A) (Tabla 4)

T A B L A 4

EFFECTOS DE EXTRACTOS DE LEUCOCITOS DIALIZABLES DE BOVINO (ELD-B) SOBRE LA MIGRACION DE MACROFAGOS HUMANOS.

Lote de ELD-B	Reactividad del bovino a PPD	Reactividad de leucocitos humanos a PPD (IM ^A)	Indice de migración cuando los leucocitos son incubados con ELD. (IM _A / IM _B) ^b			
			40 uI ^c	30 uI ^c	20 uI ^c	10 uI ^c
1	Positivo	0.97 ± 0.02	0.87 ± 0.04	0.93 ± 0.05	1.01 ± 0.08	1.22 ± 0.14 ^e
			0.72 ± 0.08 ^d	0.73 ± 0.09 ^d	0.84 ± 0.08	0.95 ± 0.06
2	Positivo	0.93 ± 0.03	0.90 ± 0.05	1.01 ± 0.03	1.02 ± 0.03	1.15 ± 0.03 ^e
			0.69 ± 0.06 ^d	0.76 ± 0.02 ^d	0.89 ± 0.06	0.97 ± 0.07
3	Negativo	0.97 ± 0.02	0.79 ± 0.10	0.92 ± 0.04	1.01 ± 0.08	1.21 ± 0.11 ^e
			0.80 ± 0.11	0.97 ± 0.02	0.97 ± 0.12	1.00 ± 0.06
4	Negativo	0.93 ± 0.03	0.85 ± 0.06	0.92 ± 0.02	0.95 ± 0.05	1.14 ± 0.04 ^e
			0.88 ± 0.05	1.01 ± 0.02	1.05 ± 0.04	1.09 ± 0.14

Indice de Migración = $\frac{\text{Área de migración en presencia de Ag}}{\text{Área de migración en medio de cultivo}}$

^a IM ≥ 0.9 , indica que los leucocitos no responden a PPD

^b IM_A, calculado cuando los leucocitos son incubados solo con ELD

IM_B, calculado cuando los leucocitos son incubados con ELD y PPD

^c Microlitros de ELD por 100 microlitros de medio de cultivo

^d Inhibición significativa de la migración. IM_B < IM (Efecto Ag-Dependiente)

^e Aumento significativo de la migración. IM > 1.10 (Efecto Ag-Independiente)

La tabla muestra los valores de los diferentes Indices de Migración, obtenidos cuando leucocitos no sensibilizados se incubaron en presencia de Ag (IM), ELD (IM_A), ELD + Ag (IM_B). Los datos manifiestan efectos Ag-Dependientes y Ag-Independientes de ELD sobre la migración de macrófagos. (Wilson, 124).

$$IM_B = \frac{\text{Area de migración en presencia de ELD + Ag}}{\text{Area de migración en presencia de Ag}}$$

Tal efecto no fué producido por las preparaciones ELD-PPD negativas, así como también, fué evadido cuando antígenos diferentes fueron empleados. Lo cual sugiere que el efecto Ag-dependiente es también Ag-específico.

En este estudio se consideró la posibilidad de que el efecto Ag-Dependiente de ELD, de inhibir la migración de macrófagos, fuera el resultado de la liberación de MIF por parte de los linfocitos estimulados con ELD. Con el propósito de aceptar o rechazar esta hipótesis, otros dos experimentos fueron diseñados:

a).- Suspensiones de macrófagos fueron incubadas con ELD-PPD positivo en presencia o ausencia de PPD.

Con concentraciones bajas de ELD, se obtuvo nuevamente un aumento Ag-independiente de la migración de macrófagos. La inhibición de la migración Ag-Dependiente no fué notada.

b).- Los macrófagos fueron incubadas con sobrenadante de cultivos de linfocitos estimulados con ELD-PPD positivo y PPD.

Una significativa Inhibición de la Migración Ag-dependiente fué producida.

Los resultados de este estudio, demuestran dos actividades de ELD:

1º.- ELD es quimiocinético para Macrófagos, ya que produce un aumento Ag-independiente de la migración, cuando es usado a bajas concentraciones. Tal efecto fué causado por componentes de ELD que actúan directamente sobre macrófagos.

2º.- Una inhibición de la migración de macrófagos fué también promovida por ELD, y se comprobó que el componente de ELD que es responsable de este efecto, actúa sobre linfocitos, confiéndole a éstos la habilidad de producir MIF. Evidencias de que MIF fue el mediador involucrado en la Inhibición de la Migración de Macrófagos, se derivan del hecho de que, para el proceso de liberación de MIF, los linfocitos sensibilizados deben estar en presencia del Ag-específico, y en estos experimentos fue necesaria la adición de Ag-específico a los cultivos de leucocitos estimulados con ELD, para apreciar la inhibición de la migración de macrófagos.

Un trabajo presentado por Wilson y Smith (125), reporta la existencia de un componente en ELD, el cual causa una inhibición no citotóxica de la migración de macrófagos humanos. Demuestran que el efecto no fué dependiente de la presencia de Ag, y por lo tanto, no indujo la liberación de MIF. La inhibición

de la migración de macrófagos Ag-independiente fué promovida por la acción directa de un componente de ELD sobre macrófagos. Estos autores describieron que tal componente es similar a un factor reportado por Goetzl (36), el cual, inhibe el movimiento de neutrófilos (NIF: Factor Inmovilizante de Neutrófilos), y está presente en extractos ácidos de leucocitos, siendo también liberado de polimorfonucleares fagocíticos. Dicho factor (NIF), inhibe tanto la migración así como la quimiotáxis de polimorfonucleares.

El componente en ELD que causa inhibición de la migración de macrófagos y NIF, presentan propiedades idénticas, entre ellas, peso molecular, susceptibilidad enzimática y actividad biológica (Tabla 5). La demostración de la existencia en ELD de componentes que afectan inespecíficamente la inmunidad celular, así como estudios de la caracterización de éstos, contribuyen para el conocimiento del mecanismo por el cual, ELD induce respuestas celulares.

Dunnick y Burger (31), estudiando aspectos de la caracterización de FT de cobayos, describieron una actividad Ag-dependiente de tal factor sobre la migración de macrófagos. El efecto fué además, dependiente de la inmunidad del donador. Las preparaciones de FT fueron obtenidas de cobayos inmunizados con Ovalbúmina o con copolímeros de Acido Glutámico-Tirosina, con-

T A B L A 5

COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DE UN FACTOR INMOVILIZANTE DE NEUTROFILOS (NIF) Y LAS DE ELD CON ACTIVIDAD INHIBITORIA Ag-INDEPENDIENTE SOBRE LA MIGRACION DE MACROFAFOS.

PROPIEDAD	NIF	ELD
Peso molecular ^a	10 000 -15 000	10 000-15 000
Estabilidad térmica	Estable a 56°C 30 minutos Actividad destruída a 80°C 30 minutos	Parcialmente inacti- tivado a 56°C 30 minutos Actividad destruída a 80°C 30 minutos.
Sensibilidad Enzimática:		
Quimiotripsina	Actividad destruída	Actividad destruída
Tripsina	Actividad parcialmente destruída	Actividad parcialmen- te destruída.
Pronasa	Actividad destruída	Actividad destruída
Inhibición no cito- tóxica de polimorfo- nucleares	Sí	Sí

a.- Expresado en Daltons.

Los datos muestran la similitud entre un componente de ELD que promueve inhibición de la migración de macrófagos Ag-independientes y un Factor inmovilizante de Neutrófilos liberado de polimorfonucleares fagocíticos. (Wilson y Smith, 125).

tando así, con FT específico para Ovalbúmina (FT-OV positivo) y FT-Glutámico-Tirosina específico (FT-GT positivo). Una inhibición de la migración de macrófagos ocurrió cuando leucocitos no inmunes fueron incubados con FT-OV positivo adicionado de Ovalbúmina, o bien, con FT-GT positivo en presencia del copolímero Glutámico-Tirosina. En ausencia de Ag, no ocurrió inhibición de la migración, así como también cuando, las fracciones purificadas de ELD fueron incubadas con un Ag para el cual no eran específicas.

Experimentos realizados por Siriani y Fiorilli, también confirman que ELD induce la inhibición de la migración de macrófagos, y que tal efecto es Ag-dependiente y específico. Reportan además otros efectos de ELD sobre la migración de macrófagos, los cuales son consecuencia de la concentración del extracto (101). Individuos inmunes a Citomegalovirus y cándida, fueron donadores de ELD. ELD específico para citomegalovirus, causó una inhibición de la migración de macrófagos cuando este Ag fué adicionado al sistema. El mismo efecto fué observado, si los leucocitos eran incubados con ELD-cándida específico, en presencia de cándida. Altas concentraciones del extracto de leucocitos, provocaron una inhibición Ag-independiente y no específica de la migración de macrófagos, tal efecto fué consecuencia de una acción citotóxica.

Sargent y Salomon, estudiaron en el ensayo de inhibición de la migración de macrófagos, los efectos de FT. Preparaciones de FT de cobayos sensibles e insensibles a tuberculina fueron empleados. El diseño experimental consistió en emplear células insensibilizadas de cobayo para ser incubadas, ya sea con FT-tuberculina positivo ó FT-tuberculina negativo, en presencia o ausencia de Ag. Los resultados fueron compatibles con un efecto Ag-dependiente y específico, es decir, una inhibición de la migración de macrófagos fué observada solo cuando las células insensibilizadas fueron incubadas con FT-tuberculina positivo en presencia de tuberculina; no ocurriendo este efecto en ausencia de Ag y cuando preparaciones de FT-tuberculina negativo fueron empleadas. (93) Los datos sugieren que FT operó según el mecanismo, por el cual, los linfocitos son estimulados para producir MIF, ya que el efecto fué Ag-dependiente y específico. Por otra parte, los autores también estudiaron los efectos de FT sobre células sensibilizadas (70). Una obvia inhibición de la migración ocurrió cuando las células sensibilizadas fueron incubadas con el antígeno específico. Una leve respuesta ocurrió cuando las células se incubaron con FT-tuberculina positivo en ausencia de Ag; pero en presencia de éste, una significativa inhibición de la migración fue observada; mayor que cuando la incubación fue solo con Ag. De acuerdo con los resultados, se postuló que FT amplifica respuestas de linfocitos sensibilizados, operando de una manera específica, además, de su efecto Ag dependiente específico sobre poblaciones de células no inmunes.

Un efecto de FT Ag-dependiente específico, sobre la migración de macrófagos, fue también demostrado por Wilson y Welch (126), haciendo énfasis en la especificidad del efecto. Emplearon cuatro preparaciones de FT de diferente especificidad a los antígenos: PPD y coccidioidina (dos lotes de FT de donadores sensibles a PPD; uno de un donador insensible a PPD y el otro de un donador sensible a coccidioidina pero insensible a PPD). Tres de las preparaciones de FT, las dos de donadores sensibles a PPD (FT-PPD positivo) y la otra del donador insensible a este Ag (FT-PPD negativo), no indujeron inhibición de la migración de macrófagos en ausencia de PPD; pero cuando este Ag fué adicionado a los sistemas que contenían preparaciones de FT-PPD positivo, se produjo significativa inhibición de la migración de macrófagos. La adición de PPD al sistema con FT-PPD negativo, no provocó tal efecto. FT específico para coccidioidina, pero inespecífico para PPD, causó inhibición de la migración cuando coccidioidina estuvo presente, pero no cuando PPD fue empleado. (Tabla 6).

Cuando los lotes de FT-PPD positivos, fueron fraccionados, se obtuvo solo una fracción con actividad inhibitoria específica y Ag-dependiente sobre la migración de macrófagos. Otra de las fracciones, a concentraciones elevadas, indujo inhibición de la migración de macrófagos, pero tal efecto no fue notado cuando se incubó a una concentración menor en presencia de

T A B L A 6

INHIBICION DE LA MIGRACION DE MACROFAGOS PRODUCIDA POR FT.

Lote de FT	Antígeno	Indice de Migración		
		IM _A ^a	IM _B ^a	Decremento ^b (%)
FT-PPD Positivo	PPD	0.90	0.69	23
FT-PPD Positivo	PPD	0.95	0.77	19
FT-PPD Negativo	PPD	0.91	0.92	+1
FT-Coccidioidina positivo PPD-Negativo	Coccidioidina	0.86	0.72	16
FT-Coccidioidina positivo PPD-Negativo	PPD	0.94	0.94	0.0

^a Los diferentes Indices de Migración se calcularon como sigue:

$$IM_A = \frac{\text{Area de migración en presencia de FT solo}}{\text{Area de migración en presencia de Ag solo}}$$

$$IM_B = \frac{\text{Area de migración en presencia de FT + Ag}}{\text{Area de migración en presencia de Ag}}$$

IM \geq 0.90, indica que no existe actividad

^b El porcentaje del decremento es calculado por la fórmula:

$$\left[1 - \frac{IM_B}{IM_A} \right] \times 100$$

Los datos de la tabla muestran un efecto específico Ag-dependiente de EID sobre la inhibición de la migración de macrófagos. (Wilson y Welch, 126).

PPD. Esto sugiere que un material tóxico para macrófagos puede estar incluido en esta fracción, o bien, que esta puede tener un efecto adyuvante Ag-independiente.

En el estudio de los efectos de ELD sobre MMI influyen varios factores para la interpretación de los resultados, tales como, diseño experimental; fracciones usadas de ELD; así como técnicas empleadas en la preparación de éste. Diversas actividades han sido detectadas, debido a la intensa variación en estos parámetros. Sin embargo, el efecto in vitro Ag-dependiente específico de ELD ha sido atribuido al componente responsable de la transferencia de hipersensibilidad retardada in vivo y los componentes responsables de los otros efectos han quedado excluidos del concepto de FT. La mayoría de las investigaciones aceptan la hipótesis, de que ELD induce la Inhibición de la Migración de Macrófagos estimulando a los linfocitos para producir MIF.

2.- Efectos sobre la Blastogénesis de Linfocitos.- Otro de los efectos in vitro de ELD ha sido detectado a través del ensayo de blastogénesis de linfocitos.

Cuando linfocitos sensibilizados, se ponen en contacto con el antígeno específico, se produce el fenómeno de Blastogénesis. Ha sido demostrado que el ELD, induce la blastogénesis de células no sensibilizadas cuando éstas son expuestas a un Ag.

Si este efecto de ELD es específico o inespecífico y si es una actividad de Factor de Transferencia, ha permanecido controversial. Varios investigadores han indicado que tal actividad es debida a componentes inespecíficos contenidos en ELD, los cuales son distinguibles del componente responsable de la transferencia específica de Hipersensibilidad retardada. Otros autores afirman lo contrario.

La especificidad de la actividad de ELD de inducir blastogénesis de linfocitos, ha sido reportada por Steel y col. (108). Como receptores de ELD, emplearon monos que presentaban reacción negativa a varios antígenos en el ensayo in vitro de blastogénesis antes de la administración de ELD (mostraban índices blastogénicos bajos). Un donador de leucocitos de la misma especie, tuvo una alta respuesta blastogénica a los antígenos: cándida, toxoide tetánico, virus de paperas, virus Herpes Simplex I y coccidioidina; mientras que sus respuestas a PPD e histoplasmina fueron negativas. Después de que los receptores fueron inoculados con ELD, sus linfocitos se cultivaron en presencia de cada uno de los antígenos de prueba. Una gran presencia de blastos ocurrió en aquellos cultivos que fueron incubados con los antígenos para los cuales ELD era específico. Cultivos incubados con PPD o con Histoplasmina (antígenos para los cuales ELD no era específico), presentaron respuestas negativas en el ensayo in vitro de blastogénesis. Los resultados muestran un efecto específico de ELD sobre este ensayo. Pruebas cutáneas de

HR, fueron efectuadas en los receptores con el propósito de establecer una relación entre reactividad de blastogénesis in vitro y reactividad cutánea. El 91% de las respuestas positivas de HR, fueron compatibles con las respuestas in vitro, indicando ésto una correlación entre los componentes de ELD que causan ambas actividades.

Fireman y col. (69), han también adaptado el ensayo de transformación de linfocitos al estudio de los efectos de FT dializable. Prepararon cultivos de linfocitos, tanto de individuos sensibilizados a tuberculina, como de individuos no sensibilizados a este Ag. Encontraron que la adición de FT solo, no tuvo efecto sobre ambas poblaciones de células. Cuando FT-tuberculina específico y tuberculina, fueron adicionados a cultivos de células no sensibilizadas, éstas respondieron con una transformación de linfocitos. FT-tuberculina negativo, con o sin la adición de tuberculina, no tuvo efecto sobre células no sensibilizadas; pero pareció inhibir la transformación de células sensibilizadas. Finalmente, un reforzamiento en la transformación de linfocitos fué observado cuando FT-tuberculina positivo y tuberculina fueron adicionados a poblaciones de células sensibilizadas. Los resultados de este estudio confirman que FT estimula específicamente la blastogénesis de linfocitos. La presencia de ELD de un componente que inhibe inespecíficamente la blastogénesis, es también sugerida, ya que la transformación de las células sensibles en presencia de Ag fué

inhibida cuando se adicionó al cultivo ELD-inespecífico.

Lawrence y Valentine (69) demostraron una actividad inmunológica específica para FT, en el ensayo de blastogénesis, y establecieron una relación entre esta actividad y la transferencia in vivo de HR. FT preparado de leucocitos de un donador sensible a tuberculina pero no sensibilizado a toxoide diftérico fué incubado con linfocitos obtenidos de un individuo con reacciones negativas a esos antígenos. Este individuo fue más tarde receptor de FT in vivo. La transformación de blastos de los linfocitos no sensibilizados ocurrió solo en aquellos cultivos conteniendo FT y tuberculina, pero no en los cultivos de linfocitos en los cuales habían sido adicionados FT y toxoide diftérico o bien Ag solos o FT solo. El mismo dializado tuberculina-positivo, toxoide diftérico negativo, fue inyectado en el individuo insensible a los dos antígenos, de quien los linfocitos habían sido obtenidos para el estudio in vitro, resultando una marcada transferencia de sensibilidad a tuberculina in vivo, demostrada por una reacción positiva de HR. Mientras que la reacción de toxoide diftérico permaneció negativa. Después de la transferencia in vivo, linfocitos obtenidos del mismo individuo, sufrieron transformación blastoide cuando fueron cultivados en presencia de tuberculina, pero no cuando el toxoide diftérico fue adicionado. Estos resultados sugieren que tanto en el ensayo in vitro como in vivo, los linfocitos son sensibilizados, induciéndolos a responder solo al Ag para el cual dicho extracto es específico.

Ascher y Andron (9), han indicado que el efecto in vitro de ELD sobre la transformación de linfocitos, es independiente de la especificidad del donador. Sus donadores de leucocitos, presentaron espectros variados de reactividad en el ensayo de blastogénesis para los siguientes antígenos: PPD y SK-SD (proteínas de estreptococo), de tal manera que se obtuvieron lotes de ELD los cuales eran específicos para PPD e inespecíficos para SK-SD y viceversa. Resultados como estos fueron encontrados: respuestas positivas de transformación de linfocitos se observaron cuando células no inmunes fueron incubadas con un lote determinado de ELD, en presencia ya sea de Ag específico o inespecífico; no habiendo distinción entre estas respuestas. La sensibilidad transfereida a las células no inmunes no fué equivalente al grado de sensibilidad del donador de ELD. Se concluyó que no hubo ninguna relación entre la respuesta de blastogénesis de células no inmunes incubadas con ELD y las sensibilidades de los donadores de éste, y que por lo tanto, el ELD, aumenta la transformación blastoide de manera inespecífica.

Los hallazgos descritos por Basten y Croft (11), también indican que FT aumenta la transformación de linfocitos inespecíficamente. Para su estudio emplearon un modelo murino. Ratones sensibilizados y no sensibilizados con DNEFB (dinitrofluorobenceno) fueron donadores de ELD. Receptores murinos que no pre-

sentaban reactividad a ese Ag fueron inoculados con ELD específico o inespecífico para DNFB. Células de esos receptores fueron incubadas en presencia de DNFB; resultando una significativa transformación blastoide, no importando si el receptor había recibido ELD específico o inespecífico. Células controles de ratones que no recibieron ELD, no presentaron tal respuesta. Estudiando la presencia de contaminantes antigénicos en ELD, los autores demostraron que en aquellas fracciones del dializado que inducían respuesta blastogénica positiva en células no inmunes, no había evidencia de contaminantes específicos. De acuerdo con sus resultados, concluyeron que componentes inespecíficos de ELD son los encargados de aumentar o inducir una transformación blastoide de linfocitos.

En una investigación realizada por Huard, Sabet y Baram (49), los resultados indicaron un efecto inespecífico de ELD sobre la blastogénesis de linfocitos. Su diseño experimental consistió en inocular ratones con ELD de especificidad indeterminada, obtenido de donadores humanos. Las células esplénicas de los receptores fueron incubadas con mitógenos de células T (Fitohemaglutinina y Conacavalina A), los cuales estimulan inespecíficamente la blastogénesis de linfocitos. Después de 72 horas de cultivo, la transformación blastoide de las células de receptores de ELD estuvo aumentada, en comparación con

T A B L A 7

EFFECTO DE ELD-HUMANO SOBRE LA RESPUESTA A PHA Y Con. A DE CELULAS ESPLENICAS DE RATONES.

	Mitógenos	
	PHA	Con A.
Células no estimuladas con ELD	17530 + <u>3784</u> ^a	13320 + <u>1402</u> ^a
Células estimuladas con ELD	39925 + <u>770</u> ^a	27845 + <u>2065</u> ^a

^aCaptación de H³-Td en cpm.

Los datos confirman un aumento de la transformación blastoide de células esplénicas, cuando éstas son estimuladas con ELD. (Huard, 48).

aquella de células no estimuladas con ELD (Tabla 7). Los resultados sugieren que ELD tiene una actividad inmunológica no específica sobre la blastogénesis de linfocitos.

A pesar de que muchos estudios han indicado que ELD aumenta la blastogénesis de linfocitos, ya sea de un modo específico o inespecífico, existen también evidencias de que tal dializado tiene un efecto supresivo sobre tal transformación. Los experimentos de Mueller y Ritts (79) presentan datos que confirman este efecto. Células no sensibilizadas a PPD fueron incubadas con PPD en presencia o ausencia de ELD obtenido de donadores con gran reactividad a PPD. La síntesis de DNA, cuya medición es un parámetro para determinar la blastogénesis de linfocitos, no fue aumentada en los cultivos incubados con ELD. Por el contrario, estos cultivos presentaron una disminución de la síntesis de DNA, en comparación con los cultivos incubados en ausencia de ELD (Tabla 8). Este efecto ocurrió con dosis bajas y altas de ELD, y pareció ser inmunológicamente inespecífico, ya que no solo los linfocitos estimulados con Ag, sino que también las células estimuladas con mitógeno (PHA), fueron suprimidas en su reactividad con la presencia de ELD. Un efecto tóxico de ELD sobre los linfocitos, no fue demostrado, ya que la mayoría de las células estuvieron vivas al final del cultivo. Los datos de este reporte señalan que ELD tiene actividad inhibitoria inespecífica sobre la blastogénesis de linfocitos.

T A B L A 8

EFFECTO INHIBITORIO DE ELD SOBRE LA BLASTOGENESIS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS.

Donadores de linfocitos	Adiciones al cultivo	cpm
1	M	4457 ^a + 2429
	ELD	2157 + 1108
	PPD + M	6348 + 4184
	PPD + ELD	2174 + 1182
2	M	3848 + 2099
	ELD	1652 + 2035
	PPD + M	4450 + 2744
	PPD + ELD	1333 + 2110
3	M	1069 + 1324
	ELD	114 + 20
	PPD + M	749 + 324
	PPD + ELD	156 + 36
4	M	3103 + 2358
	ELD	2303 + 2869
	PPD + M	1404 + 944
	PPD + ELD	888 + 821

^aCaptación de H³-Td, expresada en cpm.

M.- Medio de cultivo (RPMI 1640).

Los linfocitos de cuatro individuos insensibles a tuberculina, fueron estimulados con PPD en presencia o ausencia de ELD específico para tuberculina. Una inhibición de la síntesis de DNA, es notada cuando ELD es adicionado a los cultivos (Mueller y Ritts, 79).

La presencia en ELD de moléculas supresoras de la blastogénesis de linfocitos, ha sido también reportada por Saito y Tamaki (89). Después de la filtración de ELD sobre Sephadex G-10, tres fracciones purificadas de peso molecular de menos de 3500 daltons, inhibieron la síntesis de DNA en cultivos de linfocitos. El alto grado de viabilidad celular, comprobó que la actividad supresora no fue debida a un efecto tóxico. La captación de Timidina tritiada en cultivos incubados con las fracciones de ELD estuvo disminuída en comparación con cultivos controles, los cuales no tuvieron contacto con dichas fracciones.

Burger y Vandebark han encontrado también en ELD una fracción responsable de la supresión de la transformación de linfocitos Ag-inducida. (16)

Si se ha demostrado que ELD, aumenta la transformación linfocítica, las moléculas superesoras en tales preparaciones pueden enmascarar el efecto estimulatorio, restándole potencia de Factor de Transferencia.

Los diversos efectos mostrados por ELD en los ensayos in vitro, así como controversias acerca de su especificidad, sugiere la presencia en este dializado, de una variedad de moléculas, encargada cada una de ellas de una actividad diferente,

El efecto de transferencia específica de inmunidad celular, puede estar relacionado con varios o quizá con solo uno de estos componentes. Sin embargo, la mayoría de los investigadores han asociado a los componentes que causan efectos específicos con aquellos responsables de la transferencia de HR.

3.- Efectos sobre la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos.- Se ha obtenido evidencia de que cambios en la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos modulan algunas respuestas inmunológicas. (74, 92, 111) Un incremento en la concentración de Monofosfato de Adenosina cíclico (AMPC), causa un bloqueo de la transformación de linfocitos en blastos; así como de diversas funciones de las células inmunocompetentes, como: secreción de anticuerpos, citotoxicidad mediada por células. Efectos recíprocos son atribuidos a un aumento en la concentración de Monofosfato de Guanosina cíclico (GMPC). Los agentes que inducen cambios en la concentración de tales moléculas, intensifican o suprimen indirectamente diversos aspectos de la respuesta inmunológica. El efecto de FT sobre la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos, ha sido estudiada por varios autores, con el propósito de conocer el mecanismo de acción del mismo. (52, 89, 92, 127)

Sandler y Kirkpatrick, demostraron que varias preparaciones de ELD, las cuales eran capaces de transferir Hipersensibi-

lidad Retardada a un Ag específico, incrementaban considerablemente el GMPC de leucocitos en cultivo (Tabla 9). Experimentos con poblaciones de células purificadas, revelaron que el efecto fue predominante sobre monocitos (92). Ningún efecto sobre la concentración de AMPc fue observado. Después de la filtración por gel de ELD, cuatro fracciones de éste, incrementaron el GMPC de leucocitos, pero solo una de ellas retuvo la capacidad de transferir HR. Los resultados señalan que un incremento en la concentración de GMPC intracelular, no es suficiente para causar una reactividad cutánea. Posiblemente, el componente de ELD responsable del aumento de GMPC está involucrado en la regulación de actividades Ag-inespecíficas de FT, y quizás el fenómeno de transferencia de inmunidad celular requiera la contribución de ambas actividades: Ag-específicas y Ag-inespecíficas.

Robinson y Terrill (58), demostraron también que una preparación de ELD con la propiedad de transferir HR, causa acumulación de GMPC en células mononucleares. Con subsecuente purificación de este material, han obtenido una fracción que mantiene la capacidad de transferir HR pero con actividad reducida sobre la acumulación de GMPC. Los resultados indican una diferencia entre las dos actividades. Kalmár y Nekám (52), también reportaron sobre el efecto de FT sobre la concentración de nucleótidos cíclicos en células mononucleares. Después de incubar una población de células rica en monocitos con ELD capaz de transfe-

T A B L A 9

EFFECTO DE ELD SOBRE LA CONCENTRACION DE GMPc DE LEUCOCITOS HUMANOS

Experimento	Estimulante	GMPc (pmol/10 ⁷ cel)	Incremento sobre buffer
1	Buffer ELD-1	1.5 ± 0.4 16.1 ± 1.0	+ 14.6
2	Buffer ELD-2	3.1 ± 1.7 16.0 ± 1.2	+ 12.9
3	Buffer ELD-3	3.5 ± 1.5 20.0 ± 0.9	+ 16.5
4	Buffer ELD-4	2.1 ± 0.2 11.2 ± 0.4	+ 9.1

Los datos indican que ELD incrementa considerablemente la concentración de GMPc de leucocitos en cultivo. (Sandler y Kirkpatrick, 92).

rir HR, un incremento de GMPC fue notado. Estos autores consideran que la actividad específica de FT está estrechamente relacionada con su efecto sobre nucleótidos cíclicos.

La mayoría de los estudios del efecto de FT sobre la concentración de nucleótidos cíclicos, proponen un aumento por parte de éste, del GMPC intracelular, y relacionan esta actividad con efectos Ag-inespecíficos de FT, los cuales contribuyen al fenómeno específico de transferencia de Inmunidad Celular.

4.- Efectos sobre las células formadoras de Rosetas con eritrocitos de carnero.- El estudio del mecanismo de acción del Factor de Transferencia, ha permitido el conocimiento de muchos de los efectos del mismo. Muchos investigadores que han demostrado un incremento en el número de células formadoras de rosetas con eritrocitos de carnero, en pacientes inmunodeficientes tratados con ELD, proponen, que FT contribuye en la maduración de células T y sobre la regeneración de receptores de membrana de dichas células (80, 81, 119, 124). Este efecto, es independiente de la sensibilidad del donador de ELD, es decir, es inespecífico.

Los reportes de Valdimarsson y Mc Guire (119); Mendes y col. (96); Khan y col. (58) y, Holzman y Lawrence (69), confirman que los linfocitos T, en los cuales se han removido por tripzinización sus receptores para eritrocitos de carnero; son

capaces de formar rosetas, después de ser incubados con ELD. Estos hallazgos indican que ELD contiene un componente, el cual, estimula la regeneración de los componentes de la membrana de los linfocitos T.

Estudiando los efectos Ag-independientes de ELD sobre la inmunidad mediada por células, Wilson (80), Newell y Burdash (81), mostraron también que varias preparaciones de ELD estimulan la generación de receptores para eritrocitos de carnero sobre células T, indicando una vez más los resultados la existencia en ELD del componente regenerador de receptores de membrana. La actividad de este componente, el cual ha sido denominado por muchos autores FACTOR DE MADURACION, (80, 81, 124), no estuvo relacionada con el efecto de transferencia de HR. Sin embargo, dicha actividad ha resultado de gran beneficio, cuando ELD es empleado en el tratamiento de pacientes con linfocitos T deficientes. Ha habido evidencia de que tal Factor de Maduración, actúa de manera similar a la Timosina, la cual causando un aumento en la concentración de GMPC en los tímocitos, promueve la diferenciación de éstos, incrementando así su actividad metabólica y acelerando la síntesis de receptores de membrana.

Hainaut y Devismes (44), han reportado que el número de linfocitos capaces de formar rosetas con eritrocitos de carnero es decrementado después de la incubación de dichos linfocitos con Teofilina, y que tal decremento es corregido por el tratamiento de los mismos, con ELD. El efecto involucra una acción

antagonista de la actividad de la teofilina sobre el balance intracelular de nucleótidos cíclicos.

La regeneración de receptores de membrana en linfocitos T, ha sido considerada como un ensayo *in vitro* útil para evaluar actividades Ag-inespecíficas de ELD, que pueden o no estar involucradas en la transferencia específica de reactividad cutánea. Las discrepancias entre las diferentes actividades podrán ser explicadas al conocer la naturaleza química de ELD.

IV.- PROPIEDADES QUIMICAS DE FACTOR DE TRANSFERENCIA

IV.- PROPIEDADES QUIMICAS DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA.

Ha sido demostrado por muchos investigadores, que el extracto de leucocitos dializable (ELD), tiene muchos efectos sobre la inmunidad celular y ha sido también argumentado que tal variedad de actividades biológicas, se deben a que el ELD representa una mezcla heterogénea de moléculas, siendo cada una de ellas responsable de uno o varios efectos (31, 60, 92, 93, 124).

La actividad de ELD que ha despertado mayor interés, es la capacidad de éste de transferir Hipersensibilidad Retardada. La caracterización del componente responsable de tal actividad ha sido ampliamente estudiada. Numerosos métodos de purificación de ELD han sido utilizados, y varios componentes puros han sido obtenidos. Sin embargo, no se tiene información precisa de este componente que transfiere inmunidad celular específicamente.

Fue sorprendente el hallazgo de Lawrence, de que una preparación no viva de extractos de leucocitos, cuando era inyectada a humanos adultos, transfería a éstos una reacción de hipersensibilidad retardada específica, presentada originalmente por el donador de leucocitos; siendo tal sensibilidad sistémica y por períodos prolongados. (69, 70, 96). El aspecto dilucional de este efecto era impresionante, considerando la pequeña cantidad

de extracto efectivo, en relación al área total del receptor y un comportamiento de fluido intra y extravascular de 35 litros. Del magnífico efecto biológico, surgió la idea de que FT podría ser una entidad que se replicaba por sí misma, o que por algunos otros medios, inducía a las células de los receptores a hacer más FT.

Estas hipótesis condujeron a Lawrence a tratar dicho extracto de leucocitos con enzimas específicas: DNAasa y RNAasa, para determinar si FT se inactivaba con tal tratamiento (69). Extractos de leucocitos de donadores sensibles a tuberculina, con o sin tratamiento enzimático, fueron administrados a receptores no sensibilizados a este Ag. Ocho receptores recibieron extracto de leucocitos no tratados. Otros 4, recibieron extracto tratado con DNAasa y 4 recibieron extracto RNAasa tratados. La sensibilidad a tuberculina con grado y duración equivalentes fueron transferidas a los 16 receptores. Se concluyó así que el tratamiento con DNAasa o RNAasa no afectaba la actividad de FT. (71)

En subsecuentes intentos para inactivar al FT, el extracto de leucocitos fue tratado con DNAasa y con Tripsina. Este tratamiento tampoco evadió el efecto sobre la transferencia de sensibilidad a tuberculina. Sin embargo, FT fue sensible a Pronasa (69, 72).

T A B L A 10

ALGUNAS PROPIEDADES DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA.

Biológicas	Bioquímicas	Inmunológicas
Transfiere HR local y sistémica.	Es Dializable	No es neutralizado por antígenos (no es inmunoglobulina)
La capacidad de transferencia depende del grado de sensibilidad del donador y de la dosis empleada.	Tiene bajo peso molecular (menos de 10 000 daltons)	No induce la producción de anticuerpos (No es inmunogénico)
No causa reacción incompatible, aún entre diversas especies.	Estable por varios meses a temperatura de -20°C a -70°C, liofilizado.	
Transfiere actividad de transformación de linfocitos y de inhibición de la migración de macrófagos.	Inactivado a 56°C	
Transfiere rechazo de aloinjertos.	Resistente a DNAasa y RNAasa	
	Resistente a tripsina	
	Sensible a Pronasa	
	Positivo a la reacción de orcinol (Específica para carbohidratos).	

(Lawrence, 69 y Schulkind, 96)

Así, FT empezó a emerger como un material que no solamente era fuertemente resistente a enzimas lisosomales liberadas endógenamente, sino que también a la adición exógena de DNAasa, RNAasa y Tripsina. (Tabla 10) (72). Otro progreso en el esfuerzo de aislar e identificar al FT, fue el hallazgo de que es un componente dializable de bajo peso molecular. Fue también demostrado que FT puede ser liofilizado sin dañar su actividad. (Tabla 10) (69, 96).

El material dializado de extractos de leucocitos tratado con DNAasa fue fraccionado a través de una columna de Sephadex G-25 por Lawrence. Dos picos de absorción máxima de luz U.V. fueron observados (Figura 1). El pico II, que correspondió a componentes de peso molecular de menos de 10 000 daltons, transfirió un marcado grado de sensibilidad cutánea para Ag-específicos. Esta fracción contuvo pentosa, fosfolípidos y Nitrógeno protéico, así como otras sustancias no identificadas (69).

Baram, en continuos estudios sobre estos materiales dializables, capaces de transferir HR, concentró una fracción activa por filtración a través de Sephadex G-25. Aunque múltiples picos fueron detectados en la elución, solo uno, al cual correspondió un bajo peso molecular, presentó actividad de FT. Esta fracción contuvo una alta concentración de ribosa. (96).

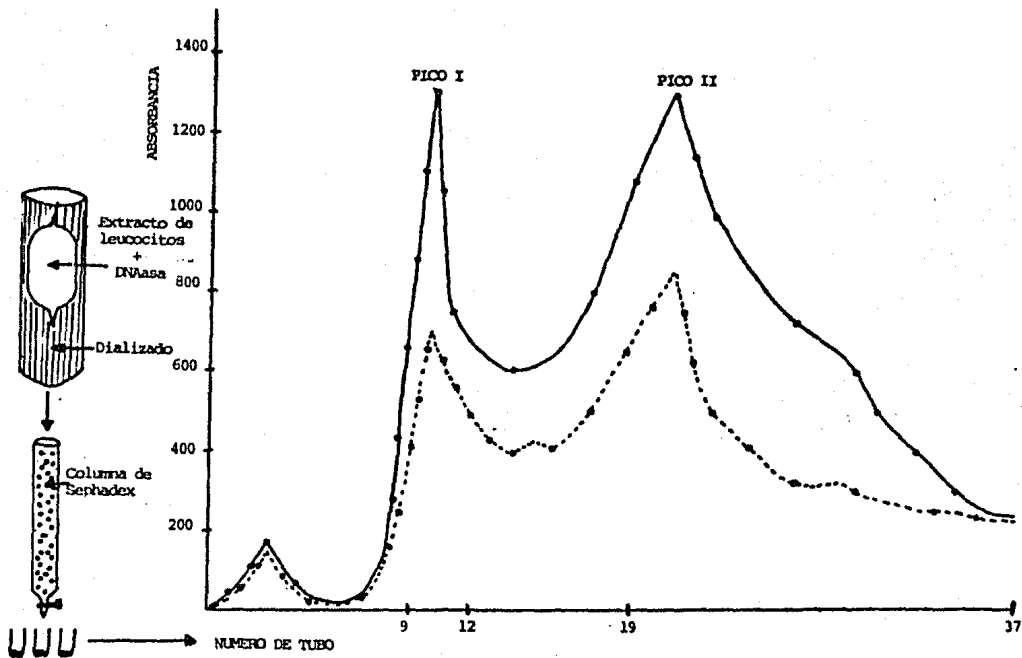


FIGURA 1.- Espectro de Absorción de ELD después de la filtración sobre Sephadex G-25. El pico II (PM < 10 000 daltons) transfiere sensibilidad específica a receptores no inmunes.

— Absorbancia a 260 nm

- - - Absorbancia a 280 nm

(Lawrence, 69)

Basados en la información entonces disponible y con las observaciones de que la actividad de FT se perdía después del tratamiento con pronasa, pero no con tripsina, DNAasa o RNAasa, Baram y Lawrence indicaron que un péptido asociado con RNA, estaba involucrado en la actividad de FT, y que el RNA asociado no era necesario para su función (69, 72, 96).

Arala-Chaves y col. aislaron también un FT dializable de bajo peso molecular (5000-15000 daltons) que transfirió sensibilidad a un Ag específico. Ellos propusieron una composición de polinucleótido-polipéptido para esta fracción activa.
(6)

Los estudios de Fireman y col. revelaron que la fracción activa de dializados de extractos de leucocitos, eluyó sobre una columna de Sephadex G-10 en la región correspondiente a materiales de peso molecular entre 700-4000 daltons. (69).

Burger, Vandenbark y col (17), han estudiado las propiedades estructurales de FT, analizando las sensibilidades enzimáticas de fracciones purificadas. Después del fraccionamiento sobre Sephadex G-25 de un ELD de un donador sensible a hemocianina de lapa (HL), solo una fracción tuvo la capacidad de transferir tal reactividad a un receptor no inmune (fracción IIIa,

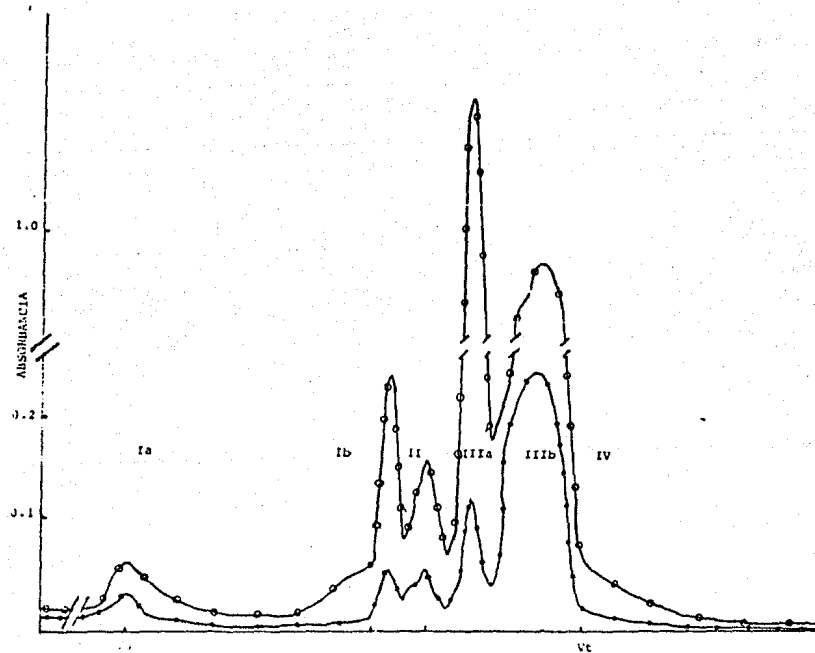


FIGURA 2.- Cromatografía de exclusión sobre Sephadex G-25 de ELD conteniendo actividad de FT. La fracción IIIa presentó actividad de transferencia dérmica.

— Absorbancia a 254 nm
 - - - - Absorbancia a 280 nm

Vo.- Volumen de Exclusión
 Vt.- Volumen total de la columna

(Burger, 17)

figura 2). Esta fracción fue aún más purificada empleando cromatografía de fase inversa sobre una matriz de Octadecyl silane, bajo condiciones de alta presión, resultando múltiples componentes. El perfil de fraccionamiento fue dividido en varias regiones, para determinar la reactividad de cada una de ellas en el ensayo de Hipersensibilidad Retardada para el antígeno de HL (figura 3): la región Pre RI, eluida antes de un volumen externo de la columna; la región I (RI), eluida antes del mayor cromóforo; la región 2 (R2), el mayor cromóforo; la región 3 (R3), región entre el mayor cromóforo y la última fracción eluyente; y la región 4, 5 (R4,5), el último eluyente. La transferencia de reactividad dérmica a HL estuvo asociada a dos regiones del cromatograma: R1, 2 y R4, 5 las cuales son cromatográficamente distintas. El mayor cromóforo en R1-2 fue identificado como 5' Inosina Monofosfato (IMP), mientras que el mayor cromóforo en R4-5 fué caracterizado como Inosina. Cuando el material IIIa fue tratado con fosfatasa alcalina, no se destruyó su actividad biológica, y al ser analizado éste, por cromatografía de fase inversa, no exhibió el cromóforo perteneciente a IMP. La conversión de IMP a Inosina por acción de la fosfatasa alcalina fué completa; el decremento en la absorción de luz UV en R1-2, fue compensado por un aumento en la absorción R4-5. El material activo que había eluido en la región R4-5, antes del tratamiento, adquirió características de retención de la región R1-2; quedando así confinada la actividad biológica en esta región (R1-2), la cual contuvo menos del

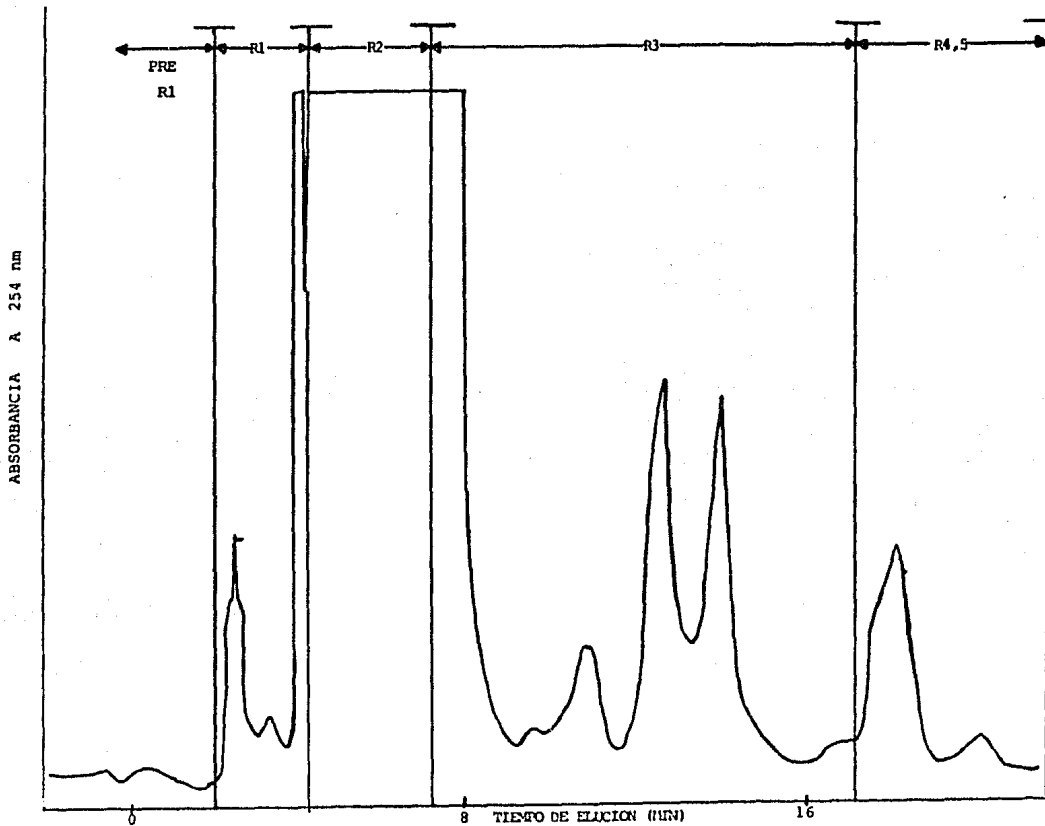


FIGURA 3.- Cromatografía de fase inversa sobre una matriz de octadecyl silane en condiciones de alta presión de la fracción IIIa obtenida por cromatografía Sephadex G-25. R1, R2, R3, R4, 5 representan regiones a las cuales se les determinó su actividad biológica. (Burger, 17)

1% del material que absorbió luz UV en la fracción IIIa, pero representó más del 90% del componente con actividad biológica. En dicha región se detectaron aminas primarias.

La sensibilidad de la fracción activa a dos enzimas proteolíticas: pronasa y proteínasa K, fue evaluada para determinar si un componente peptídico era esencial para la actividad de FT. Ambas enzimas eliminaron la capacidad de transferencia dérmica. La acción de las peptidasas pudo bloquearse con la adición al material activo de un polipéptido sintético; sugiriendo estos resultados, la presencia en FT de un polipéptido necesario para su función. Para investigar la existencia de enlaces fosfodiéster en la estructura de FT, se evaluó la sensibilidad de éste a dos exonucleasas: fosfodiesterasa I, una 3' exonucleasa, la cual requiere un grupo 3' hidroxilo libre y conduce a la formación de mononucleósido 5 fosfato. Esta enzima destruyó la actividad de FT, no así la fosfodiesterasa II (5' exonucleasa).

Estos experimentos condujeron a Burger y col. a formular la hipótesis de que FT posee un componente peptídico y un enlace fosfodiéster con un grupo 3' hidroxilo libre. Este tipo de estructura ha sido propuesta también por Dunnick y Bach (96) para componentes dializables de extractos de leucocitos de cobayo que produjeron efectos específicos in vitro.

El ELD fue fraccionado usando cromatografía de intercambio iónico en condiciones de alta presión, por Khan y col. 21 fracciones fueron obtenidas, las cuales fueron probadas para su efecto in vivo sobre células formadoras de rosetas. Dos fracciones fueron identificadas por comparación con estándares sobre cromatografía en capa fina y espectroscopía infrarroja como; Uracilo una, e Hipoxantina la otra. Ambos materiales fueron inactivos. La primera fracción de elución presentó una actividad de aumento máximo en la formación de rosetas, por lo que estuvo sujeta a una mayor purificación. La cromatografía en capa fina de esta fracción presentó 5 bandas, una de ellas, la cual fue intermedia entre la de mayor y la de menor movimiento, retuvo la capacidad de aumentar el número de rosetas. Esta subfracción contuvo proteína y ribosa. Fue designada como inmunopéptido, el cual de acuerdo con el análisis de aminoácidos presentó: Aspartato, Treonina, Serina, Glutamato, Glicina y Alanina. El peso molecular de dicha fracción fue de 1547, según el análisis de aminoácidos, mientras que por el método de equilibrio de sedimentación, fue de 1870; este aumento es atribuible a azúcares o posibles nucleótidos. El inmunopéptido caracterizado, aumentó el número de rosetas de células T con eritrocitos de carnero, en cuatro individuos con tal actividad, baja.

Un reporte de Gottlieb y col. (39) indica que el material de ELD capaz de transferir HR puede ser separado de otros compo-

nentes por filtración en gel. Describen que después de pasar ELD a través de Sephadex G-10, el perfil de absorbancia del eluyente, define tres fracciones: A, B y C (figura 4), de las cuales solo la fracción B transfirió HR a receptores no inmunes. La reacción conferida por esta fracción fue más severa que aquella inducida por ELD crudo. Esta observación puede indicar la presencia en ELD de materiales que suprimen la actividad inmunológica del componente B. El peso molecular de la fracción activa estuvo dentro del rango de 2000-4000 daltons. Tal fracción fue caracterizada como una molécula consistente de 12 aminoácidos y 3 6 4 bases de RNA.

Se ha demostrado la existencia en la fracción asociada con transferencia de HR, de varios componentes como: Hipoxantina y Uracilo. Los efectos in vitro de reactividad celular estan asociados con ésta y con otras fracciones. Algunos otros compuestos que se han identificado en estas fracciones activas incluyen: nicotinamida, serotonina y ascorbato. En adición, moléculas con características de productos codificados por la región I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, así como fragmentos antigénicos, han sido encontrados en preparaciones de FT.

Krohn, Uotila y Grön mostraron que en el fraccionamiento de ELD sobre columnas de Sephadex G-10, se obtienen varias

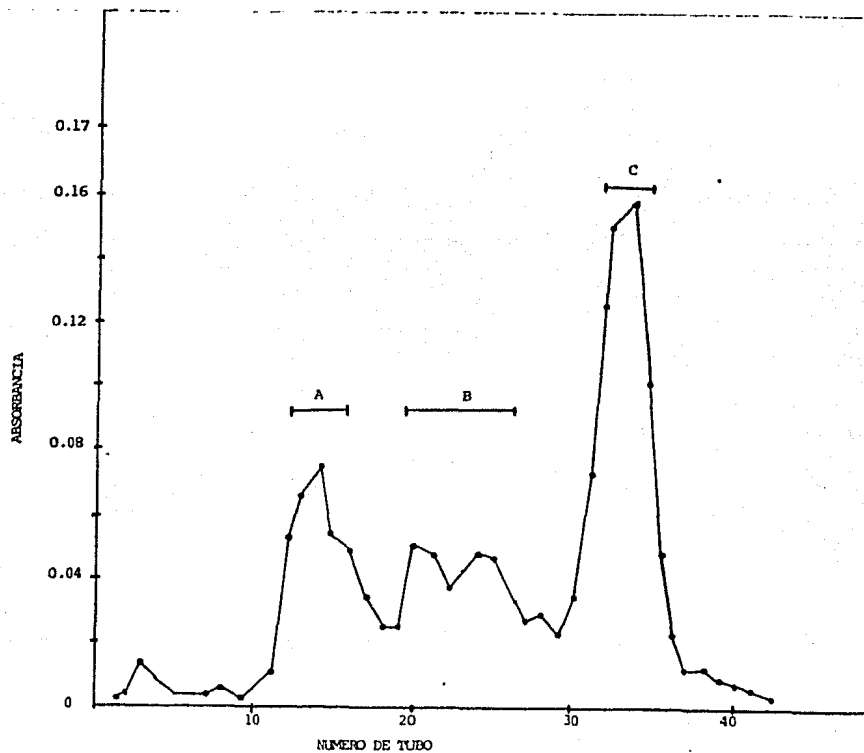


FIGURA 4.- Fraccionamiento del Extracto de leucocitos dializable por filtración en gel sobre Sephadex G-10. El perfil de absorbancia del eluyente a 260 nm define tres fracciones (A,B y C). Sólo la fracción B es capaz de transferir reacciones de Hipersensibilidad Retardada. (Gottlieb, 39)

fracciones, (figura 5) tres de las cuales (I, II y VI) presentan actividad biológica. Una subfracción de VI, denominada VIa, ha mostrado un efecto terapéutico sobre ciertas enfermedades inmunológicas. Análisis de esta fracción sobre cromatografía en capa fina, espectroscopía infrarroja y de masa, indicaron que cerca de la mitad de esta fracción estaba compuesta de Uracilo en adición con sustancias aromáticas y heterocíclicas no identificadas. La fracción adyacente (V) contuvo Tirosina y un pequeño polirribonucleótido; en la fracción VII se detectó hipoxantina así como componentes adicionales no identificados (65).

Los estudios químicos de la fracción VIa revelaron, que ésta contenía 13.9% de Nitrógeno. No fueron detectados Fósforo, D-Ribosa ni D-Desoxirribosa; indicando estos resultados que tal fracción no contiene cantidades detectables de nucleótidos. La administración de la fracción VIa, en algunos grupos de pacientes, causó un mejoramiento clínico en la mayoría de ellos; e incrementó significativamente la reactividad en piel a PPD.

La estructura propuesta por estos autores, no presenta el polimorfismo requerido para una molécula inmunológica informacional, y sugiere, por lo tanto, que FT, actúa en procesos involucrados con la expresión, más que con la fase de reconocimiento específico de la respuesta inmunológica.

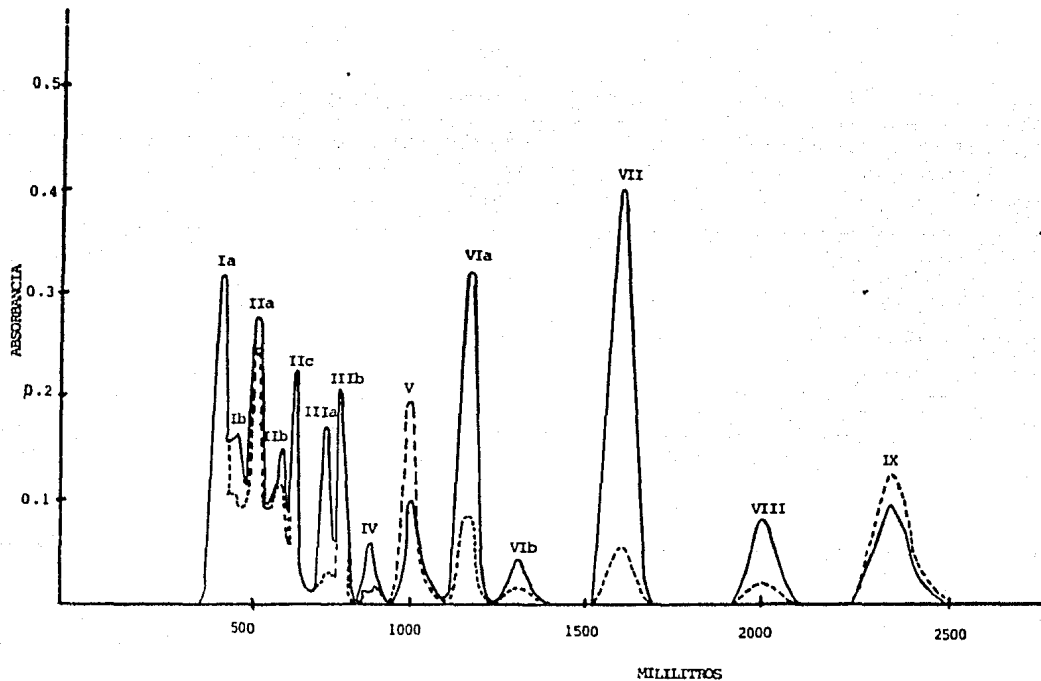


FIGURA 5.- Fraccionamiento de dializado de leucocitos sobre Sephadex G-10. El cromatograma muestra nueve fracciones, de las cuales, la fracción VI contiene actividad de FT.

_____ Absorbancia a 260 nm

----- Absorbancia a 280 nm

(Krohn, Uotila, Gröhn 65)

Un estudio sobre la naturaleza química de ELD capaz de transferir HR en humanos, fue efectuado por Volta (120), usando cromatografía sobre Sephadex G-10 y G-25, además de cromatografía en capa fina. Después de la filtración en gel, una fracción, mostró actividad de FT in vivo. El análisis sobre cromatografía en capa fina de esta fracción, mostró 52 componentes, de los cuales, 14 fueron identificados como: nucleobases, nucleósidos, azúcares, aminoácidos aromáticos y heterocíclicos.

Usando cromatografía en Sephadex G-25, Lo Buglio (84), obtuvo una fracción de ELD (Tfc), con la propiedad de transferir HR a tuberculina y a hemocianina de lapa. Reportes de Dunnick (84), Sandler (92) y Tomar (84), han también indicado que fracciones cromatográficas similares inducen respuestas Ag-específicas in vitro y transfieren HR a pacientes inmunodeficientes. Con el propósito de determinar el grado de heterogenidad en Tfc y su posible contenido de nucleótidos, Lo Buglio sometió esta fracción a cromatografía de intercambio iónico. Una fracción con las mismas características de Tfc fue obtenida. El mismo patrón de elución se observó después de una hidrólisis ácida o alcalina. La hidrólisis alcalina es suficiente para degradar RNA, mientras que la ácida, conduce a la formación de ácidos apurínicos a partir de DNA. De esta manera, los resultados indicaron que Tfc no contenía polinucleótido.

El patrón de elución de TFC obtenido a través de la cromatografía de intercambio iónico fue similar al presentado por el digerido alcalino de RNA de levadura, sugiriendo estos datos la presencia en TFC de un producto de degradación normal de polinucleótidos. La electroforesis en gel de poliacrilamida de TFC mostró una banda singular que fue negativa a las tinciones específicas para proteínas y RNA. TFC contuvo insignificantes cantidades de fosfato, sin embargo, presentó un alto contenido de nitrógeno; sugiriendo estos datos la presencia de una base púrica o pirimídica. Los espectros de UV, Infrarrojo y de Resonancia Magnética Nuclear de la fracción activa (TFC) fueron idénticos a los espectros de Hipoxantina.

Una evidencia confirmatoria de la presencia de Hipoxantina en TFC, se mostró cuando el sobrenadante de leucocitos lisados fue incubado con Xantina Oxidasa y pasado a través de una columna de Sephadex G-25. El patrón de elución mostró una disminución de la absorción UV del pico correspondiente a hipoxantina, y consecuentemente, fué observado un pico de absorbanza de un material que eluyó en un volumen de exclusión más grande que el de hipoxantina y fue identificado como Acido Úrico.

La Xantina, un intermediario en la conversión de hipoxantina a ácido úrico, eluyó entre el sustrato y el producto de la reacción con xantina oxidasa.

Un efecto Ag-específico de la hipoxantina en receptores no inmunes, no ha sido demostrado. Posiblemente el componente Ag-específico constituye una cantidad mínima de la fracción activa, mientras que la hipoxantina, la cual se encuentra en mayor proporción, sea responsable de algunos efectos no específicos de ELD.

Estudios efectuados por O'Dorisio y Tomar, (84, 114) han expuesto que la hipoxantina está presente en fracciones purificadas de ELD que son capaces de transferir HR, y han también demostrado que de los materiales contenidos en ELD, es éste el que presenta mayor absorción de luz UV.

Aunque O'Dorisio (84) encontró que la fracción activa en transferir HR contenía hipoxantina, no demostró el posible papel de ésta en tal actividad. Tomar y col., después del fraccionamiento por cromatografía sobre Bio Gel P-2 de ELD específico para proteínas de *Streptococo* (*Streptocinasa-Streptodornasa*) y *Cándida*, fueron capaces de demostrar, que la fracción conteniendo hipoxantina, fue activa en la transferencia de HR para ambos antígenos en un paciente con candidiasis mucocutánea crónica y un segundo paciente con ataxia telangiectasia. Aunque pudieron eliminar la hipoxantina de la fracción activa con xantina oxidasa, tampoco evaluaron la habilidad para transferir HR, de la preparación tratada con esta enzima (114).

Kirkpatrick (62) y col. confirmaron los hallazgos de O'Dorisio y Tomar, mostrando también que la hipoxantina estaba presente en una fracción activa de ELD obtenida por cromatografía sobre Sephadex G-25. Esta fracción transfirió HR para PPD, proteínas estreptococicas y cándida en monos rhesus, antes y después del tratamiento con xantina oxidasa, sugiriendo así, que la hipoxantina, no fue esencial para la transferencia de HR. La misma fracción incrementó la acumulación de GMPC de células mononucleares (un efecto Ag-independiente); reduciéndose solo parcialmente este incremento después del tratamiento con xantina oxidasa. La hipoxantina purificada no tuvo efectos sobre la transferencia de HR o sobre la acumulación de GMPC. El decremento en la concentración de GMPC después del tratamiento enzimático pudo haberse debido a la acción de un componente de la preparación enzimática. (62)

Una fracción activa de ELD (TFg) ha sido separada por filtración en gel sobre Sephadex G-25 por Wilson y col. (126). Esta fracción es capaz de transferir HR a cobayos, y presenta un alto rango de absorción a 260-280 nm (Figura 6). El cromatograma de TFg sobre Bio-Gel P-2 mostró dos picos: TFg1 y Tx (Figura 7). El menor pico, Tx contuvo la actividad biológica originaria de la fracción TFg. El pico TFg1 no fué activo en transferir HR, y contuvo la mayoría del material absorbente a 260 nm, originalmente presente en TFg. La posición de elución de TFg1 fue similar a la de hipoxantina, y ambos tuvieron un

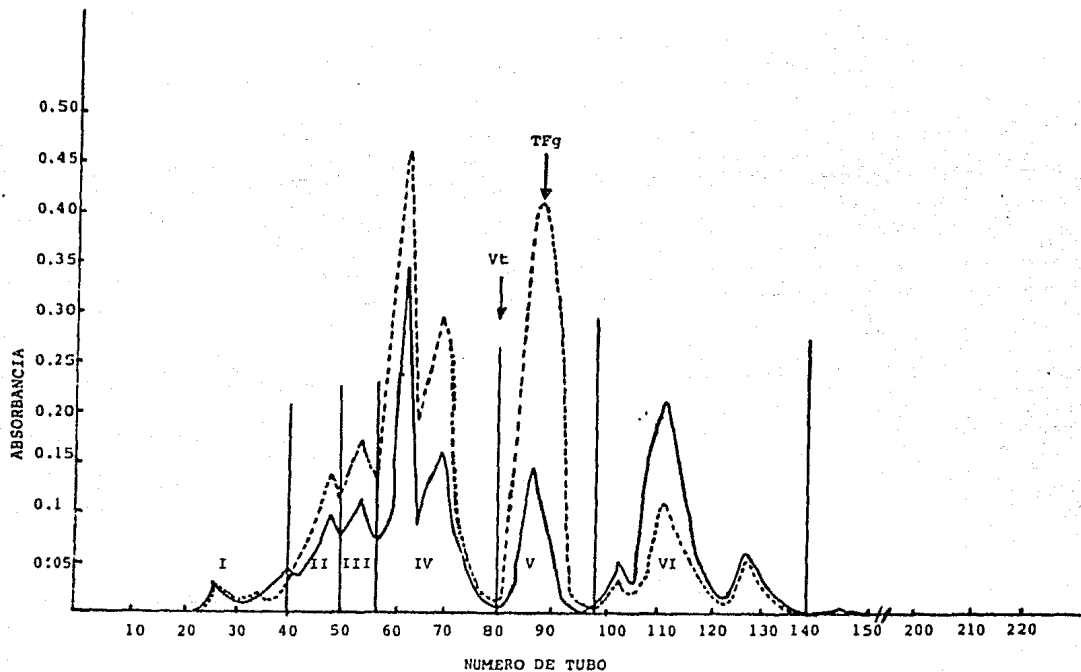


FIGURA 6.- Filtración en gel sobre Sephadex G-25 del Extracto de leucocitos dializable capaz de transferir Hipersensibilidad Retardada. Las secciones I-VI representan fracciones a las cuales se les determinó su actividad en cobayos. TFG (V) fue la única fracción que transfirió HR. Aborbancia registrada a 260 nm (----) y a 280 nm (____) . Vt = Volumen total de la columna. (Wilson, 126)

grado alto de absorción a 260-280 nm (Figura 7). La hipoxantina por sí sola no indujo reacciones de HR y no estimuló la producción por linfocitos humanos de Factor Inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF); contrariamente, causó un aumento de la migración de éstos. Los resultados de la filtración sobre Bio-Gel P-2, cromatografía de capa fina, espectroscopía UV y espectroscopía de masa, mostraron que el mayor componente en la fracción activa de ELD que transfiere HR, es hipoxantina, pero el estudio demuestra también que la presencia de ésta no es esencial para la actividad biológica de FT.

Aunque la hipoxantina no sea esencial para la transferencia de HR, las observaciones de que está presente en la fracción de ELD que transfiere HR, sugiere la investigación de posibles relaciones de hipoxantina con actividades funcionales de FT.

La hipoxantina, así como también la Adenosina y Timidina, estimulan el crecimiento de las células de mamíferos in vitro (62), y un efecto de FT in vitro, es mostrado por incrementos en la síntesis de DNA en cultivos de linfocitos. Sin embargo, recientemente, Littman y David han reportado que la fracción de ELD que contiene hipoxantina, no aumenta la síntesis de DNA de linfocitos Ag-estimulados (62).

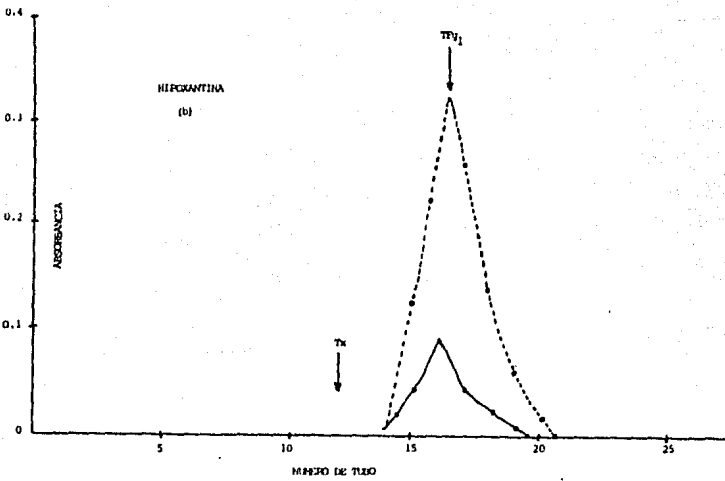
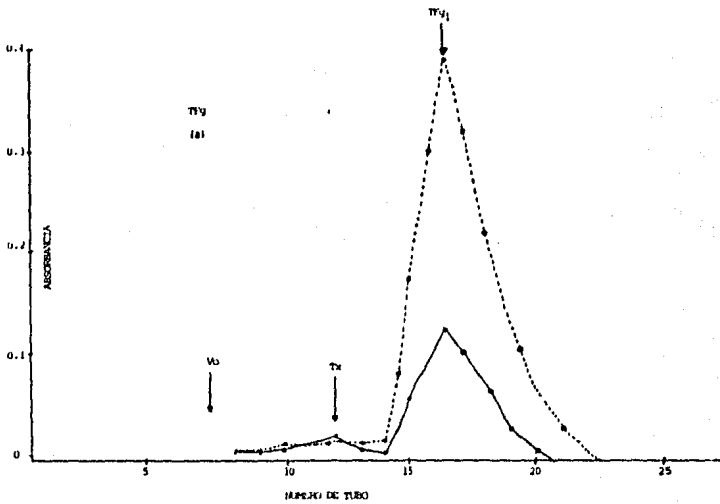


FIGURA 7.- Cromatograma sobre Bio-Gel P-2, de Hipoxantina (b) y de una fracción activa de ELD denominada TFG (a). Las posiciones de elución de las fracciones: activa (Tx) e inactiva (TFG₁) son indicadas en (a) y en (b). Fracciones de 2 ml fueron recolectadas. Absorbancia a 260 nm (-----) y a 280 nm (_____). Vo.- Volumen de elución (Wilson, 126).

Dos síndromes de inmunodeficiencia han sido asociados con deficiencias de enzimas de la vía de degradación de purinas. Estas observaciones clínicas, sugieren una interacción entre el metabolismo de purinas y la inmunocompetencia (35). Un mayor conocimiento de este mecanismo resultaría útil en el análisis del modo de acción de ELD. La presencia de purinas en éste, posiblemente podría explicar alguno de sus efectos sobre la Inmunidad Mediada por Células.

Los resultados de análisis cromatográficos sobre Sephadex G-25 de dializados de leucocitos lisados humanos, efectuados por Andron y Ascher, sugieren la presencia en estas preparaciones de una diversidad de componentes de peso molecular pequeño, los cuales aumentan la proliferación de linfocitos Ag-inducida in vitro. Estos componentes fueron caracterizados como: Timidina, Acido Fólico, Adenina e hipoxantina (5). Estas observaciones, están de acuerdo con experimentos que muestran tal actividad con cantidades fisiológicas de ácido fólico y por reportes que han demostrado que cantidades pequeñas de poliaminas aumentan la proliferación de linfocitos Ag-inducida (10). Sin embargo, la cualidad y cantidad del efecto de ELD sobre la proliferación de linfocitos Ag-inducida, sugiere la presencia en éste de otros componentes activos en adición a poliaminas y folatos. La relación entre estos componentes que aumentan la proliferación de linfocitos Ag-inducida y la habilidad de los dializados

para transferir HR in vivo, no ha sido aclarada. Sin embargo, se ha demostrado que algunas preparaciones que contienen componentes con actividad sobre la proliferación de linfocitos, han transferido HR (10).

Preparaciones de ELD conteniendo actividad de FT, fueron fraccionadas por Sandler y col. (92) empleando una columna de Sephadex G-25 calibrada con ^{14}C -Serotonina y ^{14}C -Acido Ascórbico. Cuatro fracciones que incrementaron el GMPC de leucocitos fueron obtenidos (I, II, III, IV) (Figura 8). Se demostró que dos de esas fracciones activas, una de las cuales (IV) transfirió HR, no presentaron cantidades detectables de ascorbato o serotonina. Ha sido demostrado que el ascorbato y la serotonina incrementan el contenido de GMPC de leucocitos, regulando así reacciones inmunológicas (91). Sin embargo, la presencia de ascorbato en ELD, no es suficiente para la transferencia de HR.

Otros estudios encaminados también a la identificación del componente específico de FT han sugerido que en éste, deben existir necesariamente fragmentos antigénicos para justificar tal especificidad (31). Muchas hipótesis formulan que para que FT actúe de una manera específica, debe actuar durante la fase de inducción de la respuesta de hipersensibilidad retardada (11), por ejemplo, sobre la clona relevante de células Ag-

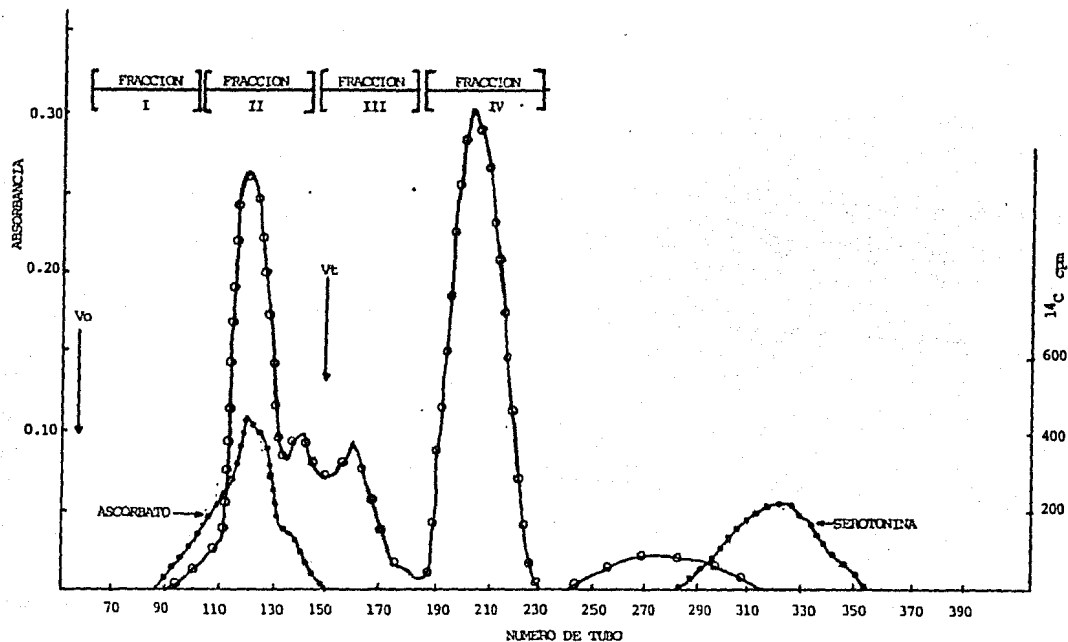


FIGURA 8.- Filtración sobre Sephadex G-25 de ELD conteniendo actividad de FT. Columna calibrada con ¹⁴C-Acido Ascórbico y ¹⁴C-Serotonina (●—●). La absorbancia de cada fracción a 255 nm es mostrada (○—○). Las cuatro fracciones incrementaron el GMPc de leucocitos, pero solo la IV fue capaz de transferir HR. Vo=Volumen de elución Vt=Volumen total de la columna. (Sandler, 92).

sensibles; y proponen, por lo tanto, la existencia en FT de moléculas definidas tales como contaminantes antigénicos, o bien, de productos codificados por la región I del complejo mayor de histocompatibilidad (11), ya que es conocido que los genes de esta región juegan un papel central en el control de respuestas de hipersensibilidad retardada. Alternativamente, se ha planteado la posibilidad de que en el material específico pueda estar involucrado un Superantígeno (RNA-inmune) (17,88), pero esta hipótesis ha sido menos aceptada, ya que FT es resistente a RNAasa.

Empleando un modelo murino, Basten y Croft (11) obtuvieron evidencias de la existencia en FT de productos codificados por genes de la región I en el componente específico; en asociación con pequeños fragmentos del Ag-inductor.

La producción de MIF in vitro fue usada para determinar la actividad del componente específico. Experimentos paralelos fueron hechos con el ensayo de Blastogénesis de linfocitos, considerando a éste como un parámetro para determinar actividad del componente no específico en FT. El Factor de Transferencia fue preparado de células de nódulos linfoides de ratones sensibilizados con 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB). Después de la inyección intravenosa de FT en receptores singénicos normales, las células de nódulos linfáticos de estos ratones mostraron una res-

puesta positiva en el ensayo de Inhibición de la Migración de Macrófagos en presencia de DNFB. La actividad de FT fue revocada por absorción de éste con un suero anti Ia (antígenos asociados a la región I), incluyendo un aloantisuero Ia y un antisuero xenogénico de conejo, el cual exclusivamente reconoce antígenos Ia-carbohidrato definidos. Análisis por cromatografía en papel, usando una técnica de purificación de antígenos Ia Carbohidrato-definidos, revelaron que la producción de MIF se obtuvo exclusivamente con aquellas fracciones que contenían actividad antigénica Ia (11).

El tratamiento de FT con Concanavalina A, la cual tiene una afinidad para Ag Ia carbohidrato-definidos resultó en una destrucción de la actividad. Estos hallazgos señalan la presencia en FT de productos codificados por genes de la región I. La absorción con anticuerpos dirigidos en contra del determinante dinitrofenil, abolió la capacidad de FT para estimular la producción de MIF, sugiriendo que FT puede también contener fragmentos antigénicos.

El tratamiento de FT con el aloantisuero Ia dirigido en contra de antígenos proteína y carbohidratos definidos causó una reducción parcial en la respuesta blastogénica. En contraste ningún cambio en tal respuesta fue observado cuando FT fue absorbido con concanavalina A o suero anti DNFB. De acuerdo con

estos resultados fue posible hacer una separación entre componentes específicos y no específicos de FT e indicar que la especificidad puede ser explicada en términos de la presencia de productos codificados por genes de la región I, en posible asociación con fragmentos antigénicos.

Los antígenos Ia carbohidrato-definidos tienen características semejantes a FT, entre ellas, su bajo peso molecular (menos de 10 000 daltons) (53, 86).

Basten y Croft argumentan que debido a la naturaleza glicolípida de los Ag Ia carbohidrato-definidos, las técnicas tales como cromatografía en Sephadex, diseñadas para separación de moléculas protéicas, resultan inefectivas para diferenciar claramente un componente específico de FT conteniendo productos codificados por la región I. Los Ag Ia carbohidrato-definidos en comparación con los proteína-definidos han sido más asociados con factores Ag-específicos secretados por células T. También arguyen, que la presencia en FT de productos de genes de la región I, no solo provee una explicación para su especificidad, sino que también para el modo de acción del componente específico. Las células T, responsables de la respuesta de Hipersensibilidad Retardada son estimuladas por antígenos asociados a moléculas de la región I, localizadas sobre la superficie de macrófagos. Así, si FT contiene antígenos I, podría sustituir a los macrófagos en la etapa de presen-

tación (a) nivel de inducción de la respuesta de HR, y conducir una estimulación directa de la clona apropiada de células T. Esto es consistente con la rápida acción de FT. Sin embargo, varias controversias de estas hipótesis necesitan ser aclaradas. Primero, si FT contiene productos codificados por la región I y además fragmentos antigénicos, porqué se requiere la adición de Ag para demostrar su actividad cuando es ensayada en cultivos in vitro? Segundo, porqué no existe evidencia de la producción de anticuerpos en receptores de FT, si los factores que contienen Ag asociados a I son capaces de estimular una respuesta humoral?. Basten dá una posible solución a estas controversias, argumentando para el primer punto, que FT contiene múltiples componentes, incluyendo moléculas con actividad inhibitoria, las cuales pueden enmascarar efectos directos de FT; y en tal caso el Ag-específico adicionado colabora manteniendo el estímulo sobre la clona de células T, resultando detectable de esta manera el efecto de FT. Para el segundo aspecto se arguye que, diferentes productos de los genes de la región I son requeridos para poner en acción a las distintas poblaciones de células T involucradas en los dos tipos de respuestas inmunológicas, por ejemplo: antígenos Ia proteína definidos pueden estar involucrados en la presentación de antígenos a células T ayudantes, las cuales contribuyen en la producción de anticuerpos; mientras que antígenos Ia carbohidrato-definidos, pueden mediar la presentación del Ag a célu-

las T involucradas en respuestas de Hipersensibilidad Retardada. Otra consecuencia de la presencia en FT de productos codificados por la región I, es que su uso entre diversas especies y entre individuos genéticamente diferentes no sería posible, ya que existirían barreras de histocompatibilidad.

Considerando la posibilidad de que la actividad de FT pudiera residir en un fragmento antigénico, Dunnick y Burger (11), realizaron una investigación, empleando como antígenos Ovalbúmina y copolímeros de Acido Glutámico-Tirosina, marcados con ^{125}I . FT fue preparado de leucocitos de cobayos inmunizados con uno u otro de esos antígenos en adyuvante completo de Freud. Las fracciones purificadas de los ELD con actividad de FT en el ensayo de Inhibición de la Migración de Macrófagos, no mostraron cantidad significativa de radiactividad. El diseño experimental permitiría la detección de fragmentos antigénicos, si éstos existieran en FT. Así los resultados de este estudio, conducen a pensar que la antigenicidad no es responsable de la actividad específica de FT.

Existen muchas controversias entre los diversos reportes existentes en relación a la naturaleza de FT, pero a medida que sean diseñados más estudios controlados y estandarizados, el FT emergerá como una entidad conocida.

V.- APLICACIONES CLINICAS -DE FACTOR DE TRANSFERENCIA.

V.- APLICACIONES CLINICAS DE FACTOR DE TRANSFERENCIA.

Cuando se logró la transferencia de inmunidad celular en animales, mediante leucocitos viables o con extractos de éstos (Lanstainer y Chase), y cuando tal transferencia se hizo extensiva en hombres, fue considerada la posibilidad de tratar con estos productos enfermedades en las cuales, un defecto en la inmunidad mediada por células tenía significancia etiológica. Las infusiones de leucocitos fueron usadas con limitado éxito en estas alteraciones, debido a la inducción de reacciones de rechazo de aloinjertos (69). Cuando el Factor de Transferencia, se obtuvo parcialmente purificado como un producto no antigénico y libre de constituyentes celulares macromoleculares, incluyendo antígenos de trasplante y con una potencia igual a aquella de leucocitos viables o extractos crudos, su aplicación clínica floreció, y fue considerado como un seguro y efectivo reactivo inmunológico para intentar la reconstitución de la inmunidad celular deficiente. (69) Desafortunadamente, la mayoría de los reportes sobre la aplicación clínica de FT, han reflejado aproximaciones empíricas y son muy anecdotaes. Sin embargo, algunos reportes están basados sobre ensayos clínicos controlados.

El propósito de este capítulo es ofrecer una información general acerca de las investigaciones efectuadas en relación a

la aplicación clínica de FT. Para ello, los desordenes en los cuales ha sido estudiado tal efecto se han agrupado de la siguiente manera:

A.- DESORDENES DE INMUNODEFICIENCIA CONGENITA

B.- ENFERMEDADES INFECCIOSAS

1.- Enfermedades Virales

2.- Enfermedades Bacterianas

3.- Enfermedades Fúngicas

C.- ENFERMEDADES NEOPLASICAS

D.- ENFERMEDADES AUTOINMUNES

A.- FACTOR DE TRANSFERENCIA EN DESORDENES DE INMUNODEFICIENCIA CONGENITA.

Este tipo de desordenes que están genéticamente determinados, comprenden errores innatos del metabolismo, que pueden reflejar fallas en la diferenciación y función de ciertas clases o subclases de células linfoides; insuficiente desarrollo y displasia del timo; anomalías o deficiencias del sistema del complemento; imperfección de los procesos efectores fundamentales que intervienen en la resistencia inmunológica (34)

Síndrome de Wiskott-Aldrich.- Cierta información acerca del uso de FT para la reconstitución de la inmunidad mediada por células, ha surgido del tratamiento de pacientes con el síndrome de

Wiskott-Aldrich (97, 99, 104, 105), el cual es una enfermedad recesiva ligada al sexo, que se caracteriza por trombocitopenia, eczema y notable sensibilidad a muchas infecciones (34, 38, 97, 99). Durante años recientes ha sido sugerido que el FT puede mejorar o restaurar la capacidad inmune celular en pacientes con este síndrome, conduciendo a una mejoría considerable de las condiciones clínicas. (97, 99)

Fudenberg y sus colaboradores (105), trataron 12 pacientes con este síndrome, con preparaciones estandarizadas de FT. 7 de los 12, adquirieron inmunidad celular a los antígenos para los cuales, el donador de FT era sensible. Estas respuestas se reflejaron por reacciones de hipersensibilidad cutánea y por la producción de Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos, in vitro. La mejoría clínica fue observada en aquellos pacientes en quienes la restauración de la inmunidad celular, siguió al tratamiento con FT. Seis de diez pacientes se recobraron de infecciones; en cinco de once, el eczema desapareció y en tres de diez, el número de plaquetas circulantes, aumentó, disminuyendo consecuentemente su tendencia a sangrar. Los pacientes en quienes el FT tuvo un mayor efecto benéfico, fueron aquellos que presentaron una deficiencia en receptores IgG de monocitos, antes del tratamiento. Ha sido sugerido por Fudenberg, que antes de empezar la terapia con FT en pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich, se debería determinar en éstos, la presencia de

receptores IgG de monocitos, para predecir la respuesta a dicha terapia (105).

En un intento para mejorar las condiciones clínicas de cuatro pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich, quienes presentaban respuesta inmune celular dañada hacia algunas bacterias, virus y hongos, Schut, Dooren y col. (97), emplearon la terapia con FT, obtenido de donadores con reactividad cutánea a los antígenos, PPD, Cándida albicans, virus de paperas, Trichophyton y Estreptocinasa-Estreptodornasa. Antes y durante el tratamiento, la reactividad celular a los antígenos de prueba fue seguida in vivo e in vitro a través de los ensayos de reactividad en piel de tipo tardío y transformación de linfocitos, respectivamente. Los resultados de las pruebas cutáneas de HR, durante la administración de FT, no fueron consistentes. Durante este período algunas de estas pruebas fueron positivas en todos los pacientes, sin correlación obvia entre estas observaciones y la administración de FT. Subsecuentemente, esas pruebas volvieron a ser negativas a pesar de continuar la terapia con FT. La reactividad de linfocitos in vitro, antes del tratamiento con FT, mostró una respuesta altamente disminuída al mitógeno Fitohemaglutinina, junto con una respuesta severamente dañada a linfocitos alogénicos en todos los pacientes. Durante el curso de la enfermedad y a pesar del tratamiento con FT, ningún incremento en la reactividad de linfocitos fue notada.

La administración de FT no tuvo ningún efecto sobre el curso clínico de la enfermedad, ni sobre indicadores de inmunidad celular, tales como, transformación de linfocitos in vitro y pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada in vivo. La falla de la terapia con FT, no solo fue vista durante el tratamiento con grandes dosis de FT, sino que también fue sostenida en un estudio de "doble ciego", en el cual, la administración de FT, durante un período de nueve meses fue alternada con placebo.

Considerando lo propuesto por Fudenberg, acerca de la correlación entre la respuesta al tratamiento con FT y un reducido número de monocitos con receptores IgG en los pacientes, en los estudios de Schut y Dooren, el número de estos monocitos no estuvo disminuído en comparación con controles normales.

A pesar de que algunos autores, no han reportado ningún beneficio sobre las condiciones clínicas en pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich con la terapia de FT, muchos otros, entre ellos, Spittler y col. han descrito un efecto favorable en estos pacientes. (105)

De interés son las observaciones de que un paciente con este síndrome, desarrolló anemia hemolítica autoinmune, y otros cinco presentaron linfomas mientras recibían la terapia con FT,

concomitante con una infección por virus Coxaquie B. Sin embargo, no puede ser establecida una relación entre la terapia con FT y la presencia de estas alteraciones, ya que, anemias hemolíticas, así como linfomas malignos, frecuentemente se presentan en pacientes con Síndrome de Wiskott-Aldrich.

Wray y col. detectaron nefropatías en 5 de 32 pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich, los cuales habían participado en un estudio de terapia con FT, obtenido de donadores normales (107). En dos pacientes, la nefropatía estuvo presente antes de la administración de FT y no aparecieron cambios con la terapia de éste. Un paciente, desarrolló subsecuentemente falla renal progresiva después de dos años con terapia de FT. En dos de los pacientes, la enfermedad renal apareció inmediatamente después de la administración de FT. Un paciente adicional, presentó anormalidades renales y nunca recibió FT. Los resultados de este estudio sugieren, que una falla renal, puede frecuentemente ocurrir en el síndrome de Wiskott-Aldrich, y que la administración de FT, posiblemente precipite o acelere el daño renal. Si FT contiene ácidos nucleicos, quizá, éstos reaccionen con anticuerpos preformados contra estos ácidos, pudiendo ser de esta manera como se produce la enfermedad.

Deficiencia Inmune Combinada.- Los pacientes que presentan enfermedades por deficiencia en la inmunidad mediana por cé-

lulas y por anticuerpos, son susceptibles a un amplio espectro de agentes microbianos (1). La terapia es con frecuencia, difícil y a menudo no se encuentra disponible. La inmunoterapia con el uso de FT, en individuos con estos desordenes inmunológicos, está siendo investigada (3, 30, 34, 96, 99).

Tres pacientes con inmunodeficiencia combinada, respondieron parcialmente al tratamiento con FT (77, 78), en un estudio efectuado por Montgomery y col. Dos de ellos, mostraron desarrollo de reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada y varias respuestas de inmunidad celular in vitro. En uno de los pacientes, una mejoría clínica de la infección con cándida fue también notada. En otros dos pacientes, quienes recibieron una o dos dosis de FT, ningún cambio en la inmunidad mediada por células o mejoría clínica fueron observadas (78). Un infante con inmunodeficiencia combinada, no presentó cambios en la función de células T cuando fue tratado con FT; sin embargo, cambios evidentes in vivo e in vitro de la función de células B fueron observados tres semanas después de la administración de FT. El niño desarrolló gammapatía policlonal, linfoproliferación, y murió. Aunque el desarrollo de gammapatía policlonal pudo haber sido coincidente con el uso de FT, los autores sugieren que su posible desarrollo, debe ser considerado, cuando FT sea administrado a pacientes con deficiencia inmune combinada (42).

Seis pacientes con un espectro de enfermedades de inmunodeficiencia fueron tratados con FT (3), con el propósito de evaluar el efecto de éste sobre anomalías clínicas e inmunológicas de estos pacientes. FT fue obtenido de donadores quienes presentaron fuerte reactividad cutánea a virus de paperas, cándida, Estreptocinasa-Estreptodornasa y PPD. La mejoría clínica ocurrió en tres pacientes. La conversión de reacciones de hipersensibilidad retardada de negativas a positivas, fue favorable. Antes de la terapia con FT, los linfocitos de tres de los pacientes, no respondieron a la estimulación con fitohemaglutinina in vitro, mientras que los otros tres, presentaron una disminuída respuesta en este ensayo. En 5 de los pacientes, no hubo diferencia significativa en la respuesta a la estimulación de linfocitos por el mitógeno, después de que el FT fue administrado. Mientras que el otro paciente presentó una respuesta normal a PHA después del tratamiento con FT, el cual había sido precedido por tres trasplantes de timo; sugiriendo estos resultados, que ambos procedimientos inmunoterapéuticos actuaron sinérgicamente. FT pudo haber expandido una población de células tímicas inmunocompetentes. En ninguno de los pacientes hubo cambios en la inmunidad mediada por anticuerpos. Se propone en este estudio, que la terapia con FT, debería ser intentada en todos los pacientes con desordenes de inmunodeficiencia combinada, aunque es imposible predecir quienes responderán. Si la terapia con FT, no reconstituye la inmunidad, entonces, una terapia combinada con FT y una fuente de células

inmunocompetentes (tal como trasplante de timo) debería considerarse (3, 110).

En el Síndrome de Nezelof, el cual se caracteriza por una inmunidad celular ausente o deprimida asociada con un defecto en la producción de anticuerpos; el uso de FT, ha indicado en algunos de estos pacientes, una mejoría clínica aunada al desarrollo de inmunidad mediada por células; mientras que en otros pacientes, ningún cambio ha sido notado (68, 110).

En pacientes con ataxia telangiectasia, la terapia con FT ha sido también empleada (42, 99), y muchos pacientes con este desorden hereditario, han respondido, desarrollando inmunidad celular in vivo e in vitro; algunos de los mismos han manifestado disminución de sus lesiones respiratorias por varios meses después de la aplicación de FT.

Miscelánea de Deficiencias Inmunes.- Otros síndromes de deficiencia inmune mediada por células, en los cuales, FT ha sido benéfico, se han descrito (69, 96, 99). Una paciente presentó recurrentes úlceras en piel, asociadas con fiebre y otros síntomas sistémicos. La investigación acerca de su mecanismo de defensa, reveló que éste era normal, excepto, por una inmunidad medida por células, deficiente. El FT corrigió esta deficiencia y produjo marcada disminución de la enfermedad (118). En

otros pacientes que también desarrollaron recurrentes úlceras en piel, estudios de su sistema inmune manifestaron ausencia de inmunidad mediada por células y baja concentración de IgA sérica, además de una falla en la formación de anticuerpos contra la vacuna tifoide. Después de la terapia con FT, sus lesiones se clarificaron y se desarrolló la inmunidad celular, así como también la habilidad para formar anticuerpos en contra del antígeno H de Salmonella, después de la inmunización (8).

Un paciente de 55 años de edad, había presentado psoriasis por más de 25 años, la cual había sido recalcitrante al tratamiento, empezó a recibir terapia con FT oral. Después de una semana, se observó un remarcable cese de sus lesiones. La respuesta continuó con cuatro dosis más. La mejoría clínica se observó solo cuando FT fue administrado y no cuando éste fue sustituido por un placebo de cloruro de sodio 0.15 M. FT fue preparado de linfocitos del hijo del paciente, quien no presentó psoriasis.

Lawrence, revisó los resultados de la terapia con FT en pacientes con inmunodeficiencias congénitas y encontró, que esta, tuvo efecto en la restauración de la inmunidad mediada por células en 24 de 36 pacientes (66%), y estuvo asociada con mejoramiento clínico en 16 de los mismos (44%). Aunque todos esos estudios no fueron controlados y una relación entre la

administración de FT y la recuperación clínica, no fue claramente establecida, el ensayo de la terapia con FT, en pacientes con esos síndromes, es indicada cuando otras modalidades terapéuticas tales como, trasplantes de médula ósea, no son disponibles (96).

El FT ha sido también usado para tratar la deficiencia de inmunidad celular adquirida en pacientes con malnutrición calórico-protéica; FT ha restaurado tal inmunidad y ha tenido un efecto benéfico sobre las condiciones clínicas de los pacientes (23, 33, 121).

B.- FACTOR DE TRANSFERENCIA EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

La respuesta inmune celular juega un papel importante en la resistencia y recuperación de enfermedades infecciosas, donde el agente infectante, exhibe una preferencia por residir dentro de células fagocíticas mononucleares (69). En todas las infecciones virales, la residencia intracelular es obligatoria para la iniciación y propagación de la enfermedad (69). Las infecciones bacterianas que son caracterizadas por un parasitismo intracelular preferencial, son ejemplificadas por las infecciones por Mycobacteria (Tuberculosis, lepra), Salmonella y Brucella. La mayoría de las infecciones fúngicas sistémicas

caen dentro de esta categoría, ejemplo de ellas son: coccidiodomicosis, histoplasmosis y moniliasis (51).

Este tipo de relación huésped-parásito exhibe ciertas características, como: la multiplicación intracelular, habilidad del microorganismo para resistir a la destrucción y consecuentemente, la residencia prolongada de éste dentro de la célula (69). Muchos esfuerzos e intensa investigación han sido dirigidas hacia la elucidación de la contribución de la inmunidad celular para la recuperación de infecciones de este tipo. Ha sido expuesto que las enfermedades de deficiencia inmune primaria y los desordenes inmunológicos secundarios producidos por otras enfermedades asociadas o por terapia inmunosupresiva, contribuyen en muchas ocasiones a una infección diseminada por virus, hongos y bacterias con consecuencias fatales para el huésped, a pesar de la terapia antimicrobiana apropiada (69). El FT ha sido empleado para controlar estas infecciones y en algunos pacientes ha tenido efectos benéficos (51, 69, 96, 100, 107, 123).

Infecciones Virales:

La infección con virus de Epstein-Barr o Citomegalovirus, induce la producción de células T-supresoras (4,46). Esas células inhiben la activación policlonal de células B, conduciendo esto a una agamaglobulinemia y una persistencia de la enfermedad.

El restablecimiento de esta infección depende de una función normal y balanceada del Sistema Inmunológico, particularmente de la inmunidad mediada por células (4). Tomando como base estos desordenes inmunológicos, el tratamiento con FT ha sido empleado en estos padecimientos.

Un niño con infección combinada con virus de Epstein-Barr y Citomegalovirus, que no tuvo respuesta linfocítica in vitro a CMV (Citomegalovirus), estuvo sujeto a una terapia oral con FT xenogénico (51). El FT fué obtenido de leucocitos de bovino inmunizados con Mycobacterium tuberculosis atenuado. Un mes después de la inmunización, el animal tuvo reacciones fuertes a tuberculina y a la vacuna de Rinotraqueitis. La reacción cruzada de virus de rinotraqueitis con citomegalovirus fue confirmada por similitud del DNA de ambos (51). La desaparición simultánea de síntomas y la aparición de una reactividad in vitro a CMV dos meses después de iniciado el tratamiento, indicó un efecto directo de FT. La viruria recurrente cesó después de que FT fue administrado.

Tres infantes con infección por citomegalovirus, fueron tratados con FT, y después de dos dosis, sus cultivos urinarios estuvieron libres de citomegalovirus (112). Aunque la terapia con FT no condujo a un alivio completo de esos pacientes, se sugiere que tal tratamiento puede ser benéfico en la prevención del desarrollo de esta infección.

Un paciente con trasplante renal que recibió drogas inmunosupresivas, desarrolló retinitis bilateral debida a citomegalovirus. Respondió exitosamente a la terapia con FT (69).

La infección con virus de Varicela-Zoster, es un gran problema para los pacientes que reciben terapia inmunosupresiva. El FT, preparado de donadores convalecientes de Varicela, ha sido exitosamente usado en el tratamiento de tales pacientes, en quienes, una disminución de la sintomatología ha sido simultánea con respuestas evidentes de inmunidad celular en contra del virus de Varicela-Zoster (69, 82, 103).

La Pneumonía causada por virus de sarampión se ha tratado acertadamente con FT en varios pacientes (96). La recuperación clínica ha estado asociada con el desarrollo de inmunidad celular para el virus de Sarampión. La panencefalitis esclerosante subcutánea, causada también por el virus de sarampión, generalmente es acompañada con una depresión de la inmunidad mediada por células hacia dicho virus. Varios niños con esta enfermedad han recibido terapia con FT de donadores sensibles al virus de sarampión (69,96). Los resultados han sido variables. Tres de ocho niños manifestaron restablecimiento clínico, el cual ocurrió cuando apareció inmunidad celular contra el Ag de sarampión. Sin embargo, otros tres pacientes, los cuales también presentaron respuestas de inmunidad celular a dicho Ag, no me-

mejoraron en sus condiciones clínicas.

Estableciendo la hipótesis de que la hepatitis activa crónica resulta de una deficiencia parcial de la inmunidad celular hacia el virus de hepatitis, varias investigaciones han estudiado el efecto del tratamiento con FT en pacientes con hepatitis activa crónica (43), con la esperanza de que la restauración de la inmunidad celular contra el virus de hepatitis, conduzca al restablecimiento clínico del paciente. En los primeros reportes del uso de FT en esta enfermedad, no se indicaron efectos benéficos de tal terapia (43, 96). En un estudio reciente, dos pacientes con hepatitis activa crónica B, recibieron FT. Uno de ellos, tuvo evidencias químicas de mejoramiento, mientras que el otro no (63). Otros seis pacientes fueron tratados con una de dos preparaciones de FT; una específica para el antígeno de hepatitis y la otra inespecífica. Uno de los tres pacientes tratados con FT-específico, presentó una corrección de su inmunidad celular, pero ningún efecto clínico fue notado (49).

En un estudio controlado de los efectos de FT sobre la hepatitis activa crónica, unos pacientes, con esta enfermedad, recibieron inyecciones de solución salina y otros de FT preparado de donadores quienes se habían recuperado de hepatitis viral. Cuatro de los cinco receptores de FT mostraron moderada o

marcada mejoría de su estado clínico, así como en sus pruebas bioquímicas e histológicas; mientras que en ninguno de los cuatro pacientes que recibieron placebo, se notó recuperación. No hubo cambios significantes de inmunidad celular tanto en el grupo placebo como en el que recibió FT (99).

La vaccinia diseminada y generalizada, es otra infección viral que ha sido tratada con lisado de leucocitos sensibles al virus causante, y una rápida regresión de las lesiones se ha observado, la cual, generalmente se acompaña de una inmunidad celular incrementada hacia el virus de Vaccinia (55).

Infecciones Micobacterianas:

Las micobacterias, causan infecciones en las cuales, el organismo reside intracelularmente. La inmunidad mediada por células, es el mecanismo de defensa más importante que limita la difusión del agente a través del tejido del huésped (69). La lepra lepromatosa y la tuberculosis miliar, son dos enfermedades en las cuales se ha postulado como mecanismo patológico principal, un defecto en la inmunidad celular en contra del Ag infectante (69, 96).

Algunos de los primeros reportes del uso clínico de FT, ha sido en el tratamiento de lepra lepromatosa (43, 69, 99).

En un estudio controlado, 10 de 13 pacientes con esta enfermedad tratados con FT preparado de células sensibles e lepromín, desarrollaron hipersensibilidad cutánea de tipo tardío al Ag, la cual fue confirmada por exámenes histológicos de biopsias de los sitios de reacción. Tales reacciones aparecieron en el día 22-35 del tratamiento con FT y permanecieron después de que éste fue suspendido. Pacientes controles tratados con quimioterapia, no presentaron esas reacciones. La terapia con FT, estuvo asociada con un decremento en el número de micobacterias viables en las improntas de piel, y con un restablecimiento clínico (96).

Un paciente con tuberculosis miliar ha sido exitosamente tratado con múltiples inyecciones de FT específico para tuberculina. El paciente no había respondido a la terapia antituberculosa, hasta que FT fue adicionado a ésta. La respuesta a dicha terapia, estuvo asociada con reacciones positivas de hipersensibilidad retardada a tuberculina; producción de factor inhibidor de macrófagos por los linfocitos del paciente y con respuestas de blastogénesis de éstos, cuando fueron estimulados con tuberculina. La recuperación clínica ha sido sostenida en el paciente (96).

Otras evidencias de la eficacia de ELD en el tratamiento de infecciones por Mycobacterium intracellulare, han sido repor-

tadas. Un paciente con esta infección, presentaba respuestas cutáneas negativas a PPD y cándida. En el ensayo *in vitro* de transformación blastoide, sus linfocitos no respondían al ser estimulados con esos antígenos; un número reducido de linfocitos T fue detectado; indicando estos parámetros una deficiencia en la respuesta inmune celular hacia los antígenos en cuestión. La terapia antituberculosa fue inefectiva. Repetidas administraciones de ELD, obtenido de donadores que respondían positivamente a PPD y a cándida, produjeron en el paciente una restauración de su respuesta inmune celular a esos antígenos, así como un restablecimiento clínico (100).

Wilson y Fudenberg (123), han efectuado un estudio sobre el efecto de FT en una infección pulmonar con Mycobacterium fortuitum. El paciente no había respondido a la terapia con drogas antituberculosas y su evaluación inmunológica indicó un defecto Ag-selectivo de la inmunidad celular para este Ag. El paciente recibió una terapia con ELD conteniendo FT específico para PPD fortuitum. Las cantidades administradas de ELD fueron en proporción a la potencia de éste, la cual fue evaluada por medio del ensayo de Inhibición de la Migración de Macrófagos. Durante el curso del tratamiento, el paciente mostró recuperación clínica, y su respuesta positiva *in vivo* a PPD-fortuitum se mantuvo con inyecciones profilácticas de ELD cada 4-6 meses. Se ha considerado que la selección adecuada de donadores, así

como la determinación de la potencia de FT en ELD, son dos factores esenciales para obtener efecto benéfico de FT en este tipo de enfermedades. Se ha propuesto también que para la actividad inmunoterapéutica de ELD son requeridas repetidas y suficientes cantidades de éste.

Infecciones Fúngicas:

El FT ha sido usado para tratar dos tipos de infecciones fúngicas, aquellas que son intensamente diseminadas, tales como coccidioidomicosis e histoplasmosis y las superficiales que involucran piel y membranas mucosas, entre ellas, candidiasis mucocutánea crónica generalizada (43, 69, 99).

Una imperfección en la inmunidad mediada por células ha sido frecuentemente encontrada en pacientes con enfermedades diseminadas severas, quienes no responden al tratamiento químico. Un reporte, describe a tres pacientes con coccidioidomicosis diseminada que recibieron múltiples inyecciones de FT específico (41). Aunque los linfocitos de los tres receptores, produjeron Factor Inhibidor de Macrófagos en presencia de coccidioidina; solo dos de esos pacientes tuvieron una remisión de la enfermedad, la cual estuvo asociada con respuestas positivas de hipersensibilidad cutánea retardada. Otros 49 pacientes con coccidioidomicosis severa también recibieron tratamiento con FT específico para coccidioidina; 31 de ellos tuvieron

un efecto favorable sobre su enfermedad, aunque la recuperación estuvo claramente asociada con la terapia de FT en 21 de los pacientes (25).

En la histoplasmosis diseminada, la inmunidad mediada por células, juega un papel central en la respuesta del huésped a la infección. El desarrollo de inmunidad celular a histoplasmina, es generalmente asociado con una remisión de la infección. A pesar del violento curso de la enfermedad, muchos pacientes han manifestado restauración clínica después de recibir múltiples dosis de FT específico. (24, 69, 96).

Un caso interesante de un paciente con histoplasmosis crónica recurrente, asociada con enfermedad de Hodgkin, ha sido reportado por Catanzaro y Spitler (24). El estudio de la inmunidad celular del paciente indicó una falta de reactividad a histoplasmina. Análisis clínicos e inmunológicos fueron realizados durante el tratamiento con 19 dosis de FT, preparado de un donador normal, con una severa respuesta celular a histoplasmina. Después de la administración de 8 unidades de FT, fue demostrada una transferencia de inmunidad celular por las pruebas cutáneas de HR; por el ensayo de transformación de linfocitos y por la liberación de MIF. Sin embargo, esta inmunidad celular no fue sostenida y repetidas dosis de FT fueron necesarias para mantener la reactividad. El paciente aparentemente se liberó de la infección, pero finalmente murió de histoplasmosis. La

enfermedad de Hodgkin, probablemente influyó para impedir un restablecimiento total. No se conoce como influye la enfermedad de Hodgkin en la acción de FT. Los pacientes con esta patología presentan defectos en la inmunidad celular (24). La importancia clínica de este defecto es aparente cuando es analizado el curso de una infección intracelular en tales pacientes.

En el tratamiento de candidiasis mucocutánea crónica, el FT ha sido también ampliamente usado (69, 96, 99). Cándida albicans, un hongo oportunista, puede causar una infección diseminada en individuos debilitados que presentan una inmunodeficiencia a cándida, manifestada como ausencia de una respuesta de HR, así como de muchos parámetros in vitro (96).

En un reporte reciente, Lawrence, cita la experiencia con 25 pacientes con candidiasis mucocutánea crónica resistente a quimioterapia, quienes fueron tratados con FT específico para Cándida albicans. Todos los pacientes presentaron anergia a este microorganismo antes de la terapia con FT. 21 de ellos presentaron respuesta inmune celular a cándida después del tratamiento; pero sólo en 14 (56%), la terapia erradicó la enfermedad o prolongó la mejoría clínica. Uno de los pacientes, ha recibido FT por 9 años sin presentar efectos colaterales; ha permanecido libre de lesiones cutáneas, manifestando lesiones orales, sólo cuando el período entre las inyec-

ciones de FT es prolongado (96).

Una paciente con candidiasis cutánea generalizada, no presentaba respuestas de HR a una batería de antígenos, entre ellos Cándida albicans. Después de recibir FT cándida específico, las lesiones en piel desaparecieron, y en general, las condiciones clínicas del paciente mejoraron (99).

La respuesta de los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica, no puede predecirse, sin embargo, en pacientes con la forma granulomatosa de la enfermedad, se han obtenido mejores resultados (96).

Enfermedades Parasitarias:

Una de las enfermedades parasitarias, en la cual una apropiada respuesta inmune celular del huésped es importante para el restablecimiento, es la Leishmaniasis cutánea (30,115). La terapia combinada con ELD Ag-específico y quimioterapia, ha mejorado las condiciones clínicas de pacientes con esta enfermedad. (30, 115).

Delgado y Romano, (30) trataron con ELD a 7 pacientes con Leishmaniasis cutánea que presentaban inmunodeficiencia celular al antígeno de leishmania. El ELD fue obtenido de donadores sanos que previamente habían manifestado leishmaniasis,

los cuales presentaban reacciones positivas de HR y de blastogénesis de linfocitos para el Ag específico. Los pacientes recibieron FT antes de la administración de la droga de elección y después de ésta. Cuatro de ellos obtuvieron mejoramiento clínico e inmunológico. Los otros tres, en quienes el síndrome típico de leishmaniasis cutánea difusa había estado presente por más de 10 años, ningún alivio clínico o inmunológico pudo ser observado. Posiblemente en estos pacientes, el defecto inmune celular, era ya muy severo, y la completa restauración de la competencia inmune con la terapia de FT, no fue posible; o quizás, en leishmaniasis cutánea de larga duración, se requieran dosis prolongadas de FT.

Sharma y col., reportaron una completa restauración de tres pacientes con leishmaniasis administrando FT Ag-específico por un largo período. (98).

C.- FACTOR DE TRANSFERENCIA EN LA INMUNOTERAPIA DEL CANCER.

Además de su uso en restaurar la inmunidad mediada por células en pacientes con deficiencia inmune y en aquellos con severas enfermedades infecciosas, el FT ha sido empleado para tratar pacientes con tumores (27). Su uso ha sido fundado sobre el concepto de que tumores malignos, representan un aloinjerto que evade las respuestas de la inmunidad celular (27). Así, el

uso de FT en estos estados patológicos, es con el propósito de restaurar dicha inmunidad, conduciendo de esta manera al rechazo del tumor. FT es usualmente obtenido de individuos de quienes se supone poseen una inmunidad a los antígenos específicos del tumor. Los donadores son generalmente familiares del paciente, quienes presentan una gran asociación física con éste; o bien, de pacientes que se han recuperado de cáncer (34, 96).

El melanoma maligno es uno de los pocos tumores, en el cual, estudios in vitro rigurosamente controlados, han demostrado la presencia de antígenos de superficie celular. Este tipo de tumores ha sido uno de los primeros en el que la terapia con FT se ha empleado (20). En un estudio inicial, el extracto dializable de leucocitos (ELD), fue preparado de un donador que había sido sensibilizado a los supuestos antígenos del tumor del paciente. Después de una inyección de ELD, el paciente desarrolló una respuesta inflamatoria en el sitio del tumor metastásico y un rechazo de los nódulos tumorales en la piel (20). En otro estudio, 9 pacientes con melanoma fueron tratados con FT preparado de familiares de los pacientes. Uno de los 9 respondió con desarrollo de transformación de linfocitos en presencia de sus antígenos tumorales y con regresión del melanoma (75). Otros investigadores, usando FT preparado específicamente contra los tumores de los pacientes

con melanoma, o bien, de miembros de la familia de éstos, notaron una regresión del tumor en 7 de 21 pacientes. (96)

En adición a un adecuado tratamiento quirúrgico de la lesión primaria en melanoma maligno, una variedad de terapias adyuvantes, entre ellas inmunoterapia, han sido empleadas para prevenir el desarrollo de tumores recurrentes (27). La facilidad de administración y ausencia de efectos colaterales, hacen a FT un agente inmunológico ideal para ensayos experimentales en pacientes con esta enfermedad (75).

Después de la terapia quirúrgica, 100 pacientes fueron tratados con FT obtenido de donadores normales. 91 permanecieron libres de la enfermedad, mientras que 9 desarrollaron melanomas recurrentes, muriendo uno de ellos. Al mismo tiempo, en otro grupo de 46 pacientes, quienes no recibieron ninguna terapia adyuvante después de la cirugía, la recurrencia de la enfermedad fue desarrollada en 11 pacientes, de los cuales 6 murieron. Los resultados indican que el índice de sobrevivencia fue mayor en aquellos pacientes que recibieron FT, y sugieren, por lo tanto un efecto benéfico de éste (15).

Se ha considerado la posibilidad, de que grandes dosis de FT sean necesarias para que éste cause la regresión de tumores. (15, 57). Un estudio diseñado por Khan (57), explora los efec-

tos de estas dosis en dos pacientes con melanoma maligno, investigando, además la consecuencia de tal tratamiento sobre la respuesta inmune. En uno de los pacientes, una reducción del diámetro del tumor fue confirmada, mientras que en el otro, ningún efecto antitumoral fue observado. En lo que se refiere al efecto que estas dosis tuvieron sobre la respuesta inmune, fue notorio que algunas de las reacciones de HR fueron inhibidas, mientras que la respuesta de linfocitos a fitohemaglutinina así como el número de células de rosetas, fueron aumentados.

Otras cinco pacientes con cáncer de seno, fueron tratadas con cantidades elevadas de FT preparado de donadores normales. Solo una de las cinco pacientes, mostró una temporal y parcial regresión del tumor (85).

Los resultados de estos estudios, sugieren que la administración de grandes dosis de ELD, puede llevarse a cabo sin ningún riesgo, pero quizá, no sea este el factor principal para la regresión de tumores.

Varios investigadores (43, 75, 96), han reportado restablecimiento clínico de pacientes con Sarcoma Osteogénico, quienes recibieron terapia con FT obtenido de leucocitos de sus familiares que presentaban inmunidad celular contra los antígenos del tumor del paciente. En algunos de esos pacientes las reci-

divas de la enfermedad no han sido manifiestas.

FT ha sido también empleado con efectos clínicos benéficos en el tratamiento de linfosarcomas, carcinomas renales y adenocarcinomas de colon (75, 96).

Debido a que se cree que el desarrollo de carcinoma nasofaríngeo está asociado a infecciones con virus de Epstein-Barr, Goldenberg y Brandes (37), prepararon FT de adultos normales que se habían recuperado de mononucleosis infecciosa y presentaban anticuerpos contra el virus de Epstein/Barr. Este FT fue administrado a dos pacientes con carcinoma nasofaríngeo, que no habían respondido a la terapia regular. La regresión del tumor fue notada solo en uno de ellos.

La experiencia del uso de FT, en el tratamiento de tumores malignos, ha mostrado efectos benéficos limitados. Sin embargo, tales efectos han ocurrido en varios pacientes que no han respondido a otro tipo de terapia. Es aparente que el papel de FT en el tratamiento de cáncer no ha sido bien definido, y que experimentos adicionales incluyendo estudios controlados bien diseñados son necesarios para establecer este papel.

D.- FACTOR DE TRANSFERENCIA EN ALGUNAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

La investigación del uso clínico de FT ha sido extendida a enfermedades en las que la autoinmunidad puede ser de importancia etiológica. Sobre la base de que la autoinmunidad es atribuida a una actividad excesiva o anormal por parte de las células efectoras o bien de células supresoras, se ha considerado que el Extracto de Leucocitos Dializable, probablemente contribuya a restaurar el equilibrio inmunológico, ya que hay evidencias de que el ELD contiene diversos residuos que pueden actuar sobre diferentes subpoblaciones de células T (2).

Muchos virus están siendo implicados en varias enfermedades autoinmunes y ha sido demostrado que FT induce la producción de Interferón, siendo este otro mecanismo por el cual el FT puede ser efectivo en estas enfermedades (2, 96).

En la edad avanzada, una enfermedad en la piel caracterizada por la aparición de penfigoides, esta asociada con un desorden autoinmune (56, 87). Se producen anticuerpos en contra de la sustancia intercelular de las células epiteliales. La administración de FT, ha sido benéfica en el tratamiento de esta afección. (43, 56). Un paciente con pénfigo recibió FT obtenido de donadores normales. Los estudios inmunológicos iniciales del paciente, revelaron una cuenta baja de linfocitos, nive-

les de inmunoglobulina E (IgE) aumentados; la respuesta blastogénica de linfocitos al mitógeno de fitolaca (mitógeno de células B), fue normal, mientras que la respuesta a fitohemaqlutinina (mitógeno de células T) estuvo disminuída, sugiriendo tales datos, que el paciente presentaba una función dañada de células T. Un mejoramiento clínico fue observado con la terapia de FT, el cual fluctuó con cambios en la frecuencia de las inyecciones (56). Las lesiones en piel desaparecieron; la función de células T se restauró y decreció el título de IgE. Ningún efecto colateral atribuible a FT fue notado.

En el tratamiento de esclerosis múltiple, FT ha sido también empleado, ya que se considera que en esta enfermedad existe una disfunción inmunológica, la cual puede manifestarse como un defecto inmune en contra un antígeno específico, posiblemente un virus, o bien, como un fenómeno de autoinmunidad (12, 66, 116, 117). Si se asume, que una anomalía en la función de células T supresoras puede contribuir a la expresión de autoinmunidad y que un defecto en la función de células T efectoras puede resultar en la persistencia de una infección viral; el uso de FT, es razonable en esta enfermedad, ya que este tiene la capacidad de restaurar la reactividad inmune celular.

En un ensayo recientemente reportado, 58 pacientes con esclerosis múltiple, fueron divididos en dos grupos iguales, uno de los cuales recibió FT, mientras que el otro recibió placebo. FT fue obtenido de leucocitos donados por familiares de los pacientes, quienes presentaron una alta respuesta inumne a los virus de sarampión y para-influenza. Después de 18 meses de terapia con FT, los pacientes con un grado moderado de afección, tuvieron un ligero mejoramiento clínico, en comparación con el grupo placebo. Este efecto no fue visto en pacientes con severo daño inicial. A pesar del gran número de pruebas inmunológicas efectuadas a los pacientes, ninguna transferencia de función inmune fue demostrada (12).

Otro reporte presentado por Behan y Melville (32) indica, que ninguna evolución clínica favorable fue observada en 30 pacientes con esclerosis múltiple, tratados con FT durante 3 meses. Cuarenta y ocho pacientes de Copenague y cincuenta y ocho de New York fueron tratados por 16 y 12 meses respectivamente con FT. Ninguno de los dos ensayos confirmó la remisión de la enfermedad (14).

Los estudios existentes enfatizan, que el tratamiento con FT, debe ser prolongado, y que es más probable obtener beneficio en el inicio de la enfermedad. (12,14,32,117).

En base a una reciente teoría sobre la patogénesis de artritis reumatoide, la cual propone un defecto en la regulación de la inmunidad celular, el tratamiento con FT ha sido aplicado en esta enfermedad con el propósito de corregir los desordenes inmunológicos. Sin embargo, en varios estudios controlados, ninguna diferencia ha sido obtenida entre los grupos controles y aquellos que recibieron FT (43, 96, 99).

El efecto de la terapia con FT, ha sido reportado también en enfermedades donde una concentración elevada de IgE es característica, tal es el caso de dermatitis atópica (1, 109, 113). Estudios efectuados en estos pacientes han revelado además, una disfunción en la inmunidad celular (45, 50). Investigaciones en modelos animales sugieren que las células T supresoras están involucradas en un control no específico de la producción de IgE (50). Katz y col. (54), demostraron que niveles incrementados de IgE pueden ser disminuidos a través de la transferencia pasiva de timocitos o células T esplénicas.

La influencia de FT sobre el nivel de anticuerpos IgE, así como sobre la función de las células T en pacientes con dermatitis atópica, ha sido analizada (1,50). Diversas publicaciones presentan resultados variables. Thulin y col. (113) no encontraron ningún beneficio in vivo ni in vitro de FT en

pacientes adultos. Jarisch y col. (50) evaluaron el efecto de la administración de FT sobre: la población de linfocitos formadores de rosetas; la respuesta a fitohemaglutinina de linfocitos; la concentración de IgE en suero; así como también sobre el estado clínico de pacientes con dermatitis atópica. Antes de la terapia, los parámetros mencionados presentaban niveles bajos, excepto la concentración de IgE, la cual estaba aumentada. El más extraordinario efecto de FT fue la disminución de IgE en 8 de 10 pacientes, observándose con mayor eficiencia en aquellos que presentaban niveles muy elevados antes de la terapia. Algunos pacientes de un grupo control tuvieron un decremento de IgE con menor intensidad.

Parece probable que el decremento en los niveles de IgE atribuido a FT, pueda estar relacionado con un incremento en la supresión inmunológica. En contraste con los resultados in vitro, cambios clínicos importantes no fueron demostrados.

VI.- CONCLUSIONES .

VI.- CONCLUSIONES

El Factor de Transferencia, es un término empleado para designar el material dializable extraído de leucocitos, el cual es responsable de la transferencia específica de sensibilidades dérmicas, de un donador sensible a un receptor no sensible. A tal material corresponde un peso molecular inferior a 10 000 daltons, resistente a la actividad de DNAasa, RNAasa, tripsina pero no a la de pronasa; no induce respuesta humoral ni celular en contra de sí mismo. Un modelo tentativo de la molécula incluye, la presencia de purinas, ribosa, un enlace fosfodiéster y de un péptido, sugiriendo que el FT está compuesto de polinucleótidos asociado a un péptido específico.

El dializado de leucocitos conteniendo actividad de FT, presenta otras actividades biológicas específicas o inespecíficas tanto in vivo como in vitro, tales como, contribución en la maduración de células T y en la regeneración de receptores de membranas de dichas células; estimulación generalizada de elementos del sistema reticuloendotelial; efectos sobre la migración de macrófagos y blastogénesis de linfocitos; incremento en la concentración de GMPc intracelular. La existencia en ELD de múltiples componentes, explica las diversas actividades de éste sobre la inmunoregulación en subpoblaciones de linfocitos T.

La reputada especificidad de la transferencia de Hiper-sensibilidad Retardada, separa a ésta, de otras actividades de ELD. Sin embargo, no queda excluida la posibilidad de que el componente responsable de la transferencia dérmica, participe en los otros efectos atribuidos a ELD.

El aislamiento y caracterización de cada uno de los componentes del Extracto de Leucocitos Dializable, así como el estudio de las bases moleculares de la respuesta inmune celular, son dos aspectos importantes y necesarios para conocer el mecanismo de acción de FT.

El FT puede ser considerado un agente inmunoterapéutico para ser usado en pacientes con enfermedades en las cuales un defecto en la inmunidad celular ha sido detectado. Ha sido benéfico en el tratamiento de algunos pacientes en los cuales terapias tales como, trasplantes de médula ósea no son disponibles. En el presente, el papel de FT en el tratamiento de cánceres está aún en fase de investigación. La función de FT en medicina clínica, será dependiente de los trabajos de investigación que conduzcan a la estandarización de los métodos de preparación de FT; delimitación de sus propiedades físicas y químicas; desarrollo de un ensayo reproducible, y de los resultados de estudios bien controlados de su eficacia clínica en las enfermedades mencionadas.

VII.- COMENTARIO .

VII.- C O M E N T A R I O

Son muchas las controversias que existen en torno al Factor de Transferencia. Su propia existencia se ha puesto en duda. Se han formulado interrogantes tales como, si el FT verdaderamente transfiere Hipersensibilidad Retardada o actúa simplemente como un adyuvante para desencadenar la respuesta celular. Una diversidad de versiones existen con respecto a esta interrogante, mismas que se han derivado de la variedad de diseños experimentales. Sin embargo, la mayoría de tales experimentos afirman que FT es capaz de transferir HR de un modo específico. Por otro lado, si es un componente o varios los responsables de esta actividad, es otro aspecto que permanece aún controversial. La no uniformidad en los métodos de separación y fraccionamiento de ELD, conduce a aislar componentes variables. La presencia en ELD de un polipéptido, ha sido una hipótesis atractiva, ya que con los aminoácidos contenidos en éste, se podrían generar múltiples combinaciones requeridas para la especificidad. Por otro lado, la existencia en FT de ribosa, purinas y enlaces fosfodiéster con un grupo 3'hidroxilo libre, sugieren que en FT, está presente también un nucleótido de RNA, el cual podría estar involucrado en la regulación de algunas respuestas de inmunidad celular.

Es difícil pensar que FT represente o contenga estructuras antigénicas, ya que no desencadena ninguna respuesta inmuno-

lógica en contra de sí mismo.

Las controversias en relación a su estructura y mecanismo de acción quedarán descifradas cuando un claro y amplio conocimiento de las bases moleculares de la respuesta inmunológica sea alcanzado, además del logro de experimentos muy bien diseñados, es decir, controlando todas las variables existentes en el estudio de FT.

A pesar de las controversias de FT, su aplicación en el área clínica va en expansión. A medida que FT sea más y mejor conocido, un mayor provecho podrá ser obtenido de éste.

VIII.- BIBLIOGRAFIA .

VIII.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alfonso, A.: "Transfer Factor in atopic dermatitis".
Lancet 1: 1352 1976.
- 2.- Allison, A.C., Denman, A.M., y Barnes, R.D.: "Cooperating and controlling function of thymus derived lymphocytes in relation to autoimmunity".
Lancet 11: 135 1971
- 3.- Ammann, A.J., Wara, D., y Salmon, S.: "Transfer Factor: Therapy in patients with deficient cell-mediated immunity and deficient antibody-mediated immunity".
Cellular Immunology 12:94 1974.
- 4.- Andiman, W.A.: "The Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus infections in childhood" .
J. Pediatr 95: 171 1979
- 5.- Andron, L.A. y Ascher, M.S.: "Transfer Factor in vitro; Chromatography of components that enhance antigen-induced lymphocyte proliferation".
Clinical Immunology and Immunopathology 9: 157 1978.
- 6.- Arala-Chaves, M.P., Leback, E.G., y Heremans, J.F.: "Fractionation of human leukocyte extracts transferring delayed hypersensitivity to tuberculin".
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol 31: 353 1967.
- 7.- Arala-Chaves, M.P. y Pinto, A.S.: "Transfer Factor with dinitrochlorobenzene".
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 43: 410 1972.
- 8.- Arala-Chaves, M.P., Proenca, R., y Sousa, M.: "Transfer Factor Therapy in a case of complex immunodeficiency".
Cell. Immunol 10: 371 1974.
- 9.- Ascher, M.S. y Andron, L.A.: "Transfer Factor in vitro: Nonspecificity of components that enhance lymphocyte proliferation to antigen",
Clinical Immunology and Immunopathology 12: 72 1979.
- 10.- Bain, B.: "Folate requirement for blast cell transformation in mixed leukocyte cultures".
Cell Immunol 15 (2): 237 1975

- 11.- Basten, A., Croft, S., Parish, C.R. y Mc. Kenzie, I.F.C.: "Transfer of cell-mediated immunity with cell-free leukocyte extracts. III.- Demonstration of Ia antigen in the specific component". Cellular Immunology 56: 440 1980.
- 12.- Basten, A., Pollard, J.D., Steward, G.J., Frith, J.A., McLeod, J.G., Walsh, J.C., Garrick, R., y Van der Brink, C.M.: "Transfer Factor in treatment of multiple sclerosis". The Lancet. Saturday 1 November 1980.
- 13.- Becker, R.J.: "Transfer of delayed sensitivity to ragweed extract with viable leukocytes". J. Allergy 32: 229 1962.
- 14.- Behan, P.O., Melville, I.D., y Durward, W.F.: "Transfer Factor therapy in multiple sclerosis". Lancet 1: 853 1978.
- 15.- Blume, M.R., Rosenbaum, E.H., Cohen, R.J., Gershow, J., Glassberg, A.B., y Shepley, E.: "Adjuvant immunotherapy of high risk stage I melanoma with transfer factor". Cancer 47: 882 1981
- 16.- Burger, D.R., Vandebark, A.A., Daves, G.D., Anderson, W.A., Vetto, R.M., y Finke, P.: "Nicotinamide: Suppression of lymphocyte transformation with a component identified in human transfer factor". Journal of Immunology 117 (3): 797 1976.
- 17.- Burger, D.R., Vandebark, A.A., Dunnick, W., Kraybill, W., Daves, G.D., y Vetto, M.: "Human transfer factor: Structural properties suggested by HPRP chromatography and enzymatic sensitivities". The Journal of Immunology 122: 3 1979.
- 18.- Burger, D.R., Vetto, R.M., y Malley, A.: "Transfer Factor from guinea pigs sensitive to dinitrochlorobenzene". Science 175: 1473 1972.
- 19.- Burger, D.R., Vetto, R.M., y Vandebark, A.A.: "Preparation of human transfer factor: A time-saving modification for preparing dialyzable transfer factor". Cell. Immunol 14: 332 1974.
- 20.- Brandes, L.J., Galton, D.A., y Wiltshaw, E.: "New Approach to immunotherapy of melanoma". Lancet 2: 293 1971.
- 21.- Brandriss, M.W.: "Attempt transfer contact hypersensitivity in man with dialyzate of peripheral leukocytes". J. Clin. Invest. 47: 2152 1968.

- 22.- Brown, R.E., y Katz, M.: "Passive transfer of delayed hypersensitivity reaction to tuberculin in children with protein caloric malnutrition".
J. Pediatric 70: 126 1967.
- 23.- Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E., y Sussdorf, D.H. "Methods in Immunology"
W.A. Benjamin Inc. New York 2a. edición 1971.
- 24.- Catanzaro, A., Spitler, L.E., Campbell, G.D., y Moser, K.M.: "Transfer factor therapy for histoplasmosis in a patient with Hodgkin's disease".
Arch. Intern. Med. 141: 533 1981.
- 25.- Catanzaro, A., Spitler, L.E. y Moser, K.M.: "Cellular immune response in coccidioidomycosis".
Cell Immunol 3: 606 1972.
- 26.- Crowle, A.I.: "Hipersensibilidad Retardada".
Libros de Investigación y Ciencia. Ed. Labor, S.A., Barcelona 1960.
- 27.- Currie, G.A.: "El Cáncer y la Respuesta Inmunológica".
Ed. El Manual Moderno, S.A., México 1975.
- 28.- Chase, M.W.: "The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin".
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 59: 134 1945.
- 29.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B., y Mc. Carty, M.: "Tratado de Microbiología".
Ed. Salvat, S.A. España 1979.
- 30.- Delgado, O., Romano, E.L., Belfort, E., Pifano, F., Scorza, J.V. y Rojas, Z.: "Dialyzable leukocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis".
Clinical Immunology and Immunopathology 19: 351 1981.
- 31.- Dunnick, W., Burger, D.R., y Vandenbark, A.A.: "Lack of antigen fragments in guinea pig transfer factor-like activity".
Clinical Immunology and Immunopathology 17: 55 1980.
- 32.- Fog, T., Pedersen, L y Raun. N.E.: "Long term transfer factor treatment for multiple sclerosis".
Lancet 1: 851 1978.
- 33.- Ford, G.W., y Welch, J.S.: "Therapy with parent's lymphocytes transfer factor in children with infection and malnutrition".
Lancet 1: 263 1976.

- 34.- Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L., y Wells, J.: "Manual de Inmunología Clínica".
Ed. El Manual Moderno, S.A. 2a. Ed. México 1980.
- 35.- Giblett, E.R., Ammann, A.J., Wara, D.W., Sandman, R., y Diamond, L.K.: "Nucleoside-Phosphorylase deficiency in a child with several defective T-cell immunity and normal B-cell immunity".
Lancet 1 (7914): 1010 1975.
- 36.- Goetzl, E.J., y Austen, K.F.: "A neutrophil immobilizing factor derived from human leukocytes. I.- Generation and partial characterization".
J. Exp. Med. 136: 1564 1972.
- 37.- Goldenberg, G.J., y Brandes, L.J.: "Immunotherapy of nasopharyngeal carcinoma with transfer factor from donors with previous infectious mononucleosis".
Clin. Res. 20: 947 1972.
- 38.- Gordon, B.L.: "Lo Esencial de la Inmunología".
Ed. El Manual Moderno S.A. 2a. Ed. México 1975.
- 39.- Gottlieb, A.A., Foster, L.G., y Waldman, S.R.: "What is Transfer Factor?".
The Lancet, October 13, 1973.
- 40.- Gottlieb, A.A., y Sutcliffe, S.B.: "In vivo modification of delayed type hypersensitivity by small molecular weight components derived from human leukocytes: Partial purification of components causing amplification of response".
Clin. Exp. Immunol. 50: 434 1982.
- 41.- Graybill, J.R., Silva, J., Alford, R.H., y Thor, D.E.: "Immunologic and clinical improvement of progressive coccidioidomycosis following administration of transfer factor".
Cell. Immunol. 8:120 1973.
- 42.- Griscilli, C., Revillard, J.P., Betuel, H., Herzog, G., y Touraine, J.L.: "Transfer Factor therapy in immunodeficiencies".
Biomedicine 18: 220 1973.
- 43.- Grob, P.J., Franke, C., Reymond, J.F. y Freiwettstein, M.: "Therapeutic use of transfer factor".
J. Clin. Invest. 5: 33 1975
- 44.- Hainaut, J. y Devismes, D.: "Increase by the total dialyzate leukocyte extract of E-rosette formation in human theophylline treated lymphocytes".
C.R. Acad. Sci. 7: 290 1980.

- 45.- Hanifin, J.A. y Lobitz, W.: "Newer concepts of atopic dermatitis".
Arch. Dermatol 113: 663 1977.
- 46.- Henle, G. y Henle, W.: "Observations on childhood infections with the Epstein-Barr virus".
J. Inf. Dis 121: 303 1970.
- 47.- Holtzman, R.S., y Lawrence, H.S.: "Effects of transfer factor on the reticuloendothelial system".
J. Immunol. 118: 1672 1977.
- 48.- Huard, T.K., Sabet, T. y Baram, P.: "In vivo effects of dialyzable leukocyte lysates (DLL): Changes in the responses of murine spleen cell to T and B cell mitogens, weight and morphology of splenic tissue".
Clinical Immunology and Immunopathology 11: 229 1978.
- 49.- Jain, S., Thomas, H.C. y Sherlock, S.: "Transfer Factor in the attempted treatment of patients with HBS Ag-positive chronic liver disease".
Clin. Exp. Immunol. 30: 10 1977.
- 50.- Jarisch, R., Eibl, M., Sandor, I. y Boltz, A.: "Influence of dialyzable transfer factor on IgE concentrations in patients with atopic dermatitis".
Allergy 36: 99 1981.
- 51.- Jones, J.F., Jeter, W.S., Fulginiti, V.A., Minnich, L.L., Pritchett, R.F. y Wedgwood, R.J.: "Treatment of childhood combined Epstein-Barr virus/Cytomegalovirus infection with oral bovine transfer factor".
The Lancet, July 18 122-124 1981.
- 52.- Kalmár, L., Nékman, K., Láng, I., Kelemen, G y Gergely, P.: "In vitro effects of transfer factor on the cyclic nucleotides level of human lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia and of mouse lymphocytes".
Acta Medica Academiae Scientiarum Hungaricae 35 (1): 43 1978.
- 53.- Kapp, J.A., Pierre, C.W. y Benacerraf, B.: "Genetic control of immune responses in vitro. Experimental conditions for the development of helper T-cell activity specific for the terpolymer L-glutamine acid, 60, L-alanine 30, L-Tyrosine 10 (GAT) in nonresponder mice".
J. Exp. Med. 142 (1): 50 1975.
- 54.- Katz, D.H.: "Control of IgE-antibody production by suppressor substances".
J. Allergy Clin. Immunol. 62: 44 1978.

- 55.- Kempe, C.H.: "Studies on smallpox and complication of smallpox vaccination".
Pediatrics 26: 176 1960.
- 56.- Khan, A., Ayyar, R., Michaelson, J.D., Weaver, R.E., y Hill, N.O.: "Transfer Factor treatment in bullous pemphigoid. Impaired T-cell function".
Dermatologica 161: 243 1980.
- 57.- Kahn, A., Benjamin, C., Antonetti, A., y Hill, J.M.: "Effects of large doses of dialyzable leukocyte extract".
Proceedings of the society for experimental biology and medicine 165: 91 1980.
- 58.- Khan, A., Garrison, O., Hill, J.M., Antonetti, A., Hill, N.O., y Gracy, R.W.: "Isolation and characterization of immunopeptide from dialyzable leukocyte extract".
Cellular Immunology 55: 420 1980.
- 59.- Kirkpatrick, C.H.: "Transfer of delayed cutaneous hypersensitivity with transfer factor".
Cell. Immunol. 41: 62 1978.
- 60.- Kirkpatrick, C.H.: "Transfer of cellular immunity with transfer factor".
The Journal of Allergy and Clinical Immunology 62 (2): 71 1979.
- 61.- Kirkpatrick, C.H., Rich, R.R., y Smith, T.K.: "Effects of transfer factor on lymphocyte function in anergic patients".
J. Clin. Invest. 51: 2948 1972.
- 62.- Kirkpatrick, C.H., Robinson, L.B., y Terril, K.S.: "The identification and significance of hypoxanthine in dialyzable transfer factor".
Cellular Immunology 24 (2): 230 1976.
- 63.- Klesius, P.H. y Fudenberg, H.H.: "Bovine transfer factor. In vivo transfer of cell-mediated immunity to cattle with alcohol precipitates".
Clin. Immunol. Immunopathol 8: 238 1977.
- 64.- Kohler, P.F., Trembath, J., Merril, D.A., Singleton, J.W. y Du Bois, R.S.: "Immunotherapy with antibody, lymphocytes and transfer factor in chronic hepatitis B".
Clin. Immunol Immunopathol. 2: 465 1974.
- 65.- Krohn, K., Votila, A., Väisänen, J., y Gröhn, P.: "Studies on the chemical composition and biological properties of transfer factor".
Z. Immunol-Forsch. 153: 395 1977.

- 66.- Lancet: Immunological treatment in multiple sclerosis".
The Lancet November 1. 1980.
- 67.- Landsteiner, K., y Chase, M.V.: "Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds".
Proc. Soc. Exp. Med. 49: 688 1942.
- 68.- Lawlor, G.J., Ammann, A.J., Wrigt, W.C., La Franch, S.H., Bilstrum, D., y Stiehm, E.R.: "The syndrome of cellular immunodeficiency with immunoglobulins".
J. Pediatr. 84: 681 1974.
- 69.- Lawrence, H.S.: "Transfer Factor"
Adv. Immunol. 11: 195 1969.
- 70.- Lawrence, H.S.: "The transfer in humans delayed skin sensitivity to streptococcal M. substance and to tuberculin with disrupted leukocytes".
J. Clin. Invest. 34: 219 1955.
- 71.- Lawrence, H.S.: "The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in men".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71: 516 1949.
- 72.- Lawrence, H.S.: "Some biological and immunological properties of transfer factor".
J. Immunol. 68: 159 1952.
- 73.- Liburd, E.M., y Pabst, H.F.: "Transfer of delayed sensitivity to rats with transfer factor".
Cell. Immunol. 5: 487 1972.
- 74.- Lichtenstein, L.M., Henney, C.S., Bourné, H.R., y Greenough, W.B.: "Effects of cholera toxin on in vitro models of immediate and delayed hypersensitivity. Further evidence for the role of cyclic adenosine 3'5'monophosphate".
J. Clin. Invest. 52: 691 1973.
- 75.- Lo. Buglio, A.F., y Neidhart, J.A.: "A review of transfer factor immunotherapy in cancer".
Cancer 34: 1563 1974.
- 76.- Maddison, S.E., Hicklin, M.D., Conway, B. y Kagan, I.G.: "In vivo transfer of delayed hypersensitivity to primates with h-transfer factor".
Science 178: 757 1972.
- 77.- Mogerma, S.N., Levin, A.S., Spitler, L.E., Stites., D.P., Fudenberg, H.H., Shinefield, H.H., y Shinefield, H.R.: "Transfer factor therapy in x-linked recessive severe combined dual system immune deficiency disorder".
Clin. Res. 21: 310 1973.

- 78.- Montgomery, J.R., South, M.A., Wilson, R., Ritchie, E., Heim, L.R., Criswell, S., y Trentin, J.J.: "Study of a gnotobiotic child with severe combined immunodeficiency". Clin. Res. 21: 118 1973.
- 79.- Mueller-Eckhardt, C., y Ritts, R.E.: "Inhibitory activity of medium-dialyzed transfer factor in lymphocyte blastogenesis". Blut Band 32, Seite 353 1976.
- 80.- Newell, R.T., Wilson, G.B., Bahm, V.J., Burdash, N.M., Fudenberg, H.H., y Klesius, P.H.: "In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extracts (B-DLE) on human cell mediated immunity". J. Clin. Hematol. Oncol 8 (4): 111 1978.
- 81.- Newell, R.T., Wilson, G.B., Burdash, N.M., y Fudenberg, H.H.: "In vitro stimulation of human T-cell rosette formation by bovine lymph node dialyzates". J. Clin. Lab. Immunol. 2(3): 261 1979.
- 82.- Ng, R.P.: "Disseminated varicella infection: Treatment with transfer factor in a patient with Hodgkin's disease". Scand. J. Infect. Dis 9: 139 1977.
- 83.- Niels, K.J.: "El Sistema Inmunitario". Libros de Investigación y Ciencia. Ed. Labor, S.A. Barcelona 1973.
- 84.- O'Dorisio, M.S., Neidhart, J.A., Daniel, F.B., Balcerzak, S.P., y Lo Buglio, A.F.: "Identification of hypoxanthine as the major component of a chromatographic fraction of transfer factor". Cellular Immunology 23 (2): 191 1976.
- 85.- Oettgen, H., Old, L., Farrow, J., Valentine, I., Lawrence, S.H., y Thomas, L.: "Effect of transfer factor in cancer patients". J. Cell. Invest. 50: 71a 1971.
- 86.- Parish, C.R., Chilcott, A.B., Mackenzie, I.F.: "Secretion of Ia antigens by a subpopulation of T-cell which are Ly-1+, Ly-2- y Ia ". J. Exp. Med. 144 (3): 847 1976.
- 87.- Peck, S.M., y Lefkovits, A.M.: "Bullous pemphigoid polymyositis and co-existing contact dermatitis". Arch. Derm. 94: 672 1966.
- 88.- Rifkind, D., Frey, J.A., Petersen, E.A., y Dinowitz, M.: "Delayed hypersensitivity to fungal antigen in mice. Molecular classes in immunogenic RNA extracts that transfer delayed hypersensitivity". J. Infect. Dis. 133 (5): 523 1976.

- 89.- Saito, K., Tamaki, N., Foster, L.A., Brennessel, B., y
Gottlieb, A.A.: "Inhibition of DNA synthesis in lymphocytes
by dialyzable components of human leukocyte extracts".
Cellular Immunology 31: 311 1977.
- 90.- Salaman, M.R.: "Studies on the transfer of delayed hyper-
sensitivity. Effects of dialyzable leukocyte extracts from
people of know tuberculin sensitivity on the migration of
normal guinea pig macrophages in the presence of antigen".
Immunology 26: 1069 1974.
- 91.- Sandler, J.A., Clyman, R.I., Manganiello, V.C., y Vaughan,
M.: "The effect of Serotonin (t-hydroxy tryptamine) and
derivatives on Guanosine 3'5' monophosphate in human monocytes".
J. Clin. Invest. 55: 431 1975.
- 92.- Sandler, J.A., Smith, T.K., Manganiello, V.C., y Kirkpatrick,
C.H.: "Stimulation of monocyte cGMP by leukocyte dialyzates.
An antigen-independent property of dialyzable transfer factor".
The Journal of Clinical Investigation 56: 1271 1975.
- 93.- Sargent, I.L. y Salaman, M.R.: "Effects of human transfer
factor on the migration of guinea-pig macrophages: is there
an antigen specific activity? ".
Immunology 41: 227 1980.
- 94.- Shiku, H., Takahashi, T., Oettgen, H.F., y Old, L.J.: "Cell
surface antigen of human malignant melanoma. II.- Serological
typing with immune adherence assays and definition of two
new surface antigens".
J. Exp. Med. 144: 873 1976.
- 95.- Schulkind, M.L., Adler, W.H., Altemeier, W.A., y Ayoub, E.M.:
"Transfer Factor in the treatment of a case of chronic mucocu-
taneous candidiasis".
Cell. Immunol. 3: 606 1972.
- 96.- Schulkind, M.L., y Ayoub, E.M.: "Transfer Factor and Its
Clinical Application".
Year Book Medical Publishers, Inc. Gainesville, Florida 1980.
- 97.- Schut, B., Dooren, L.J., Vittenbogaart, C.H., Schellekens, P.,
y Eijsvooegel, V.P.: "Cellular immunity in patients with the
Wiskott-Aldrich syndrome before and after administration of
transfer factor: a follow-up study".
Immunology 36: 1 1979.
- 98.- Sharma, M.K., Anaraki, F., y Ala, F.: "Specificity of transfer
factor in vitro lymphoblast transformation of peripheral lympho-
cytes to leishmania major antigen".
Clin. Immunol. Immunopathol. 12: 183 1978.

- 99.- Shulman, S., Hutto, J.H., Ayoub, E.M., Howlett, S.A., Scott, B., y Mc. Guigan, J.E.: "Clinical trials of transfer factor".
Cell. Immunol 43: 352 1979.
- 100.- Simon, M.R., Salberg, D.J., Silva, J., Ganji, S., Desai, S., Muller, B.F., y Palutke, M.: "Atypical Mycobacterium infection treated with dialyzable leukocyte extracts: Evidence for antigenic specificity".
Clinical Immunology and Immunopathology 20: 123 1981.
- 101.- Sirianni, M.C., Fiorilli, M., Paná, A., Pezzella, M., y Aiuti, F.: "In vitro transfer of specific reactivity to Citomegalovirus and Candida to cord blood leukocytes with dialyzable leukocyte extracts".
Clinical Immunology and Immunopathology 14: 300 1979.
- 102.- Slavin, R.G., y Garvin, J.E.: "Delayed hypersensitivity in man: transfer by lymphocyte preparations of peripheral blood".
Science 52: 145 1964.
- 103.- Spier, Z.: "Prevention and treatment of varicella during steroid therapy".
Lancet 1: 635 1975.
- 104.- Spitler, L.E., Levin, A.S., Blois, M.S., Epstein, W., Fudenberg, H.H., Hellstrom, I., y Hellstrom, K.E.: "Lymphocyte responses to tumor-specific antigens in patients with malignant melanoma and results of transfer factor therapy".
J. Clin. Invest. 51: 92a 1972.
- 105.- Spitler, L.E., Levin, A.S., Biois, M.S., Epstein, W., Fudenberg, H.H., Pirofshy, B., August, C.S., Stiehm, E.R., Hitzing, W.H., y Gatti, R.A.: "The Wiskott-Aldrich syndrome: results of transfer factor therapy".
J. Clin. Invest. 51: 3216 1972.
- 106.- Spitler, L.E., Levin, A.S., y Fudenberg, H.H.: "Transfer Factor".
Clin. Immunobiol. 2: 153 1974.
- 107.- Spitler, L.E., Wray, B.B., Mogerman, S., Miller, J.J. O' Reilly, R.J., y Lagios, M.: "Nephropathy in the Wiskott-Aldrich Syndrome".
Pediatrics 66 (3): 391 1980.
- 108.- Steel, R.W., Eichverg, J.W., Heberling, R.L., Eller, J.J., Kalter, S.S., y Kniker, W.T.: "In vivo transfer of cellular immunity to primates with transfer factor prepared from human or primate leukocytes".
Cellular Immunology 22: 110 1976.

- 109.- Strannegard, I., Hansons, L.A., Leindholm, L., y Mobacken, H.: "Transfer Factor in severe atopic disease".
Lancet 11: 702: 1975.
- 110.- Strauss, R.G., y Hake, D.A.: "Combined immunodeficiency with response to transfer factor".
J. Pediatr. 85: 680 1974.
- 111.- Strom, T.B., Carpenter, C.B., Garavoy, M.R., Austen, K.F., Merrill, J.P., y Kaliner, M.: "The modulating influence of cyclic neclotides upon lymphocyte-mediated cytotoxicity".
J. Exp. Med. 138: 381 1973.
- 112.- Thomas, I.T., Soothill, J.E., Hawkins, G.T., y Marshall, W.C.: "Transfer Factor treatment in congenital Cytomegalovirus infection".
Lancet 2: 1056 1977.
- 113.- Thulin, H., Ellegaard, J., Thestrup-Pedersen, K., y Zachariae, H.: "Long-term transfer factor treatment in severe atopic dermatitis".
Acta Allergol 32: 236 1977.
- 114.- Tomar, R.H., Knight, R., y Stern, M.J.: "Transfer Factor: Hypoxanthine is a major component of a fraction with in vivo activity".
J. Allergy Clin Immunol 58: 190 1976.
- 115.- Tirk, J.L., y Bryceson, A.D.: "Cell mediated immunity in cutaneous leishmaniasis".
Adv. Immunol. 13: 209 1971.
- 116.- Utermohlen, V., y Sabriskie, J.: "Suppressed cellular immunity to measles antigen in multiple sclerosis".
Lancet 11: 1147 1973.
- 117.- Valdimarsson, H.: "Immunosuppression, transfer factor and multiple sclerosis".
Lancet 1: 851 1978.
- 118.- Valdimarsson, H., Hambleton, G., Henry, K., y Mc. Connell, I.: "Restoration of T-lymphocyte deficiency with dialyzable leukocyte extracts".
Clin. Exp. Immunol. 16: 141 1974.
- 119.- Valdimarsson, H. y McGuire, R.L.: "Crude transfer factor preparations stimulate trypsinized human lymphocytes to form rosettes with sheep-red-cells".
Clin. Exp. Immunol. 29 (2): 261 1977.
- 120.- Votila, A.: "Studies on the chemical nature of dialyzable transfer factor. Comparison of human leukocyte dialyzable and dialyzates derived from human serum and mammalian lymphoid and non lymphoid organs".
Immunobiology 156: 353 1980.

- 121.- Walker, A.M., Garcia, R., Pate, P., Mato, L.J., y David, J.R.: "Transfer Factor in the immune deficiency of protein-caloric malnutrition: a controlled study of 32 cases".
Cell. Immunol. 15: 372 1975.
- 122.- Welch, T.M., Triglia, R., Spitler, L.E., y Fudenberg, H.H.: "Preliminary studies of human transfer factor activity in guinea pigs".
Clinical Immunology and Immunopathology 5: 407 1976.
- 123.- Wilson, G.B., Metcalf, J.F., y Fudenberg, H.H.: "Treatment of Mycobacterium fortuitum pulmonary infection with transfer factor (TF): New methodology for evaluating TF potency and predicting clinical response".
Clinical Immunology and Immunopathology 23: 478 1982.
- 124.- Wilson, G.B., Newell, R.T., y Burdash, N.M.: "Bovine dialyzable lymph node extracts have antigen-dependent and antigen independent effect on human".
Cellular Immunology 47: 1 1979.
- 125.- Wilson, G.B., Smith, C.L., y Fudenberg, H.H.: "Effects of dialyzable leukocyte extracts (DLEs) with transfer factor activity on leukocyte migration in vitro. III.- Characterization of antigen-independent migration inhibition factor in DLEs as a neutrophil immobilizing factor".
J. Allergy Clin. Immunol 64 (1): 56 1979.
- 126.- Wilson, G.B., Welch, T.N., Knapp, D.R., Horsmanheimo, A., y Fudenberg, H.H.: "Characterization of Tx, an active subfraction of human dialyzable transfer factor. I.- Identification of the major component in TFg, a precursor of Tx, as hipoxanthine".
Clinical Immunology and Immunopathology 8: 551 1977.
- 127.- Yakir, Y., Chacham, Y., Kook, A. y Trainin, N.: "In vivo effects of purified fractions of thimic humoral factor on the restoration of immunocompetence in neonatally thymectomized mice".
Isr. J. Med. Sci. 15 (2): 196 1979.