

10
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"NIVELES DE INTERFERON E INMUNOGLOBULINAS
EN EL PLASMA DE PACIENTES TRATADOS CON UN
ARNt (HAM)"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

HIPOLITO NOE ALVARADO VASQUEZ



MEXICO, D. F.
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION.....	1
A) Acción del IFN en la inmunomodulación.....	5
B) Efecto del IFN en la producción de inmunoglobulinas.....	9
C) Inductores de Interferón.....	12
ANTECEDENTES.....	17
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODO.....	22
A) Grupos de estudio.....	22
B) Propagación viral.....	24
C) Titulación viral.....	25
D) Técnica de inhibición del efecto citopático.....	26
E) Técnica de ELISA. Método por inhibición.....	27
F) Método indirecto.....	28
G) Determinación del FNT- α mediante ELISA por inhibición.....	29
H) Determinación de inmunoglobulinas.....	30
I) Pruebas estadísticas.....	30
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES.....	49
APENDICE I.....	50
APENDICE II.....	52
MEDIOS Y SOLUCIONES.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	56

R E S U M E N

El interferón (IFN) desempeña numerosas funciones en los sistemas inmune y neuroendocrino. Desde su descripción en 1957, se han realizado numerosas investigaciones con la finalidad de conocer, los distintos procesos en los cuales interviene por la función tan importante que tiene en la clínica, en el control de algunas enfermedades.

En el presente trabajo se utilizó como inductor de la síntesis del IFN en humanos, un ácido ribonucleico de transferencia modificado (ARNT HAM), y para cuantificar sus niveles en el plasma se utilizaron la técnica de inhibición del efecto citopático (IECP), que es una prueba que mide el efecto protector del IFN ante una infección viral, y la prueba de análisis inmunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) en dos variantes: por inhibición y por método indirecto, las que se utilizaron para medir los niveles de IFN- γ . Adicionalmente, se realizó la medición del FNT- α con ayuda de una técnica de ELISA por inhibición. También se determinaron las concentraciones de IgA, IgM e IgG y se estudió su posible relación con los niveles de IFN presentes en el plasma de los sujetos. Encontramos que los niveles de IFN total, así como de IFN- γ , sufrían un incremento posterior a la aplicación del ARNT HAM. Antes de la aplicación del ARNT HAM los niveles determinados por IECP fueron de 10 a 320 U/ml, y después de éste se dió un incremento de 80 hasta 2560 U/ml; con la técnica de ELISA por inhibición las determinaciones realizadas fueron de 12.5 a 925 U/ml de IFN- γ antes de la aplicación del inductor y de 81.2 a 2,374 U/ml después de este. La ELISA indirecta nos dió valores de 0 a 14 U/ml antes del inductor y de 130 a 1,600 U/ml después de su aplicación. Los valores encontrados para el FNT- α van de 0 a 10.5 μ g/ml antes y de 7 a 10.5 μ g/ml después de la aplicación del ARNT HAM. Los niveles de inmunoglobulinas no mostraron ninguna diferencia significativa con respecto a los valores que se reportan en la literatura como normales.

Se puede concluir que las técnicas de IECP y ELISA utilizadas, permitieron una adecuada determinación de los niveles de IFN e IFN- γ presentes en el plasma de los sujetos estudiados, mostrando buena sensibilidad, así como economía y fácil realización. Además, que el ARNT HAM mostró un efecto claro en la inducción de la síntesis de IFN en los individuos a los que se aplicó induciendo además, al parecer el incremento de otras linfocinas como el FNT- α , sin alterar la producción de inmunoglobulinas, lo que permite proponer la posible inducción de la tolerancia inmunológica.

INTRODUCCION

El interferón (IFN) fue descrito inicialmente en 1957 por Issacs y Lindenman (1) como una sustancia proteica soluble liberada por células en cultivo infectadas por el virus de la influenza inactivado, que era capaz de proteger a un segundo cultivo celular de cualquier infección vírica. Por esta capacidad de interferir con la duplicación viral se le denominó interferón (IFN). Ahora se sabe que se trata de una familia de proteínas clasificadas dentro de las linfocinas, que son capaces de mostrar diversos efectos dentro de los sistemas inmune, neuroendócrino, así como en otros sistemas biológicos.

Los primeros reportes acerca de la existencia del IFN datan del año de 1935, en que se comunicó que los primates infectados por el virus atenuado de la fiebre amarilla, eran capaces de sobrevivir a una infección posterior de este mismo virus en su fase virulenta, este efecto de protección se le atribuye al IFN ya que conocemos que es la primera respuesta de defensa ante una agresión del tipo viral. A este fenómeno de protección se le denominó "interferencia de virus". Se conocen también datos que indican que los monos expuestos al virus del Valle del Rift poseían resistencia al virus de la fiebre amarilla. Durante los siguientes años, se describieron numerosos ejemplos de este tipo de protección tanto in vivo como in vitro.

A partir de su descripción, se han realizado numerosas investigaciones acerca de los diferentes tipos de IFN, las que han

mostrado que es una familia de glucoproteínas, que se clasifican en tres tipos principales, el IFN- α o de leucocitos, el IFN- β o de fibroblastos y el IFN- γ o de linfocitos. A los dos primeros se les conoce también como IFN de tipo I, mientras que al último se le conoce como IFN de tipo II. Esta clasificación se basa en sus características fisicoquímicas y antigénicas (2).

La forma de obtenerlos es diferente de acuerdo al tipo de IFN que se desea aislar. Así por ejemplo, el IFN- α se puede obtener por medio de la infección viral de un cultivo de leucocitos del que se han caracterizado actualmente 15 subtipos moleculares (3). El IFN- β se obtiene comúnmente por exposición de un cultivo de fibroblastos a un ARN de doble cadena en presencia de los inhibidores metabólicos ciclohexamida y actinomicina D (4), de este tipo de IFN es posible que existan 2 subtipos (5). El IFN- γ se puede obtener por estimulación de cultivos de linfocitos con mitógenos (6,7), antígenos u otros estímulos. No se han descrito hasta la fecha subtipos de este. Es importante mencionar que se describen inductores específicos para la producción de los diferentes tipos de IFN. Este panorama se ha ampliado y muestra que un tipo de inductor puede ayudar a obtener diferentes tipos de IFN (Tabla #1), por lo que no existe un inductor específico para estimular la producción de un tipo de IFN en particular.

Existen también otras diferencias en cuanto a las características fisicoquímicas como: masa molecular, sensibilidad a pH ácido y a la temperatura de 56 °C (Tabla #2).

Se conoce también la diferencia entre los distintos tipos de

Tabla 1. Fuentes principales del Interferón y sus inductores

<u>Tipo</u>	<u>Fuente principal</u>	<u>Inductor principal</u>
Alfa	Leucocitos	Virus, ARN de doble cadena
Beta	Fibroblastos	Virus o ARN de doble cadena.
Gamma	Linfocitos	Mitógeno, antígeno.

(Tomado de Torrence, 1981)

Tabla 2. Características fisicoquímicas del IFN

Tipo	Masa molecular	Labil a 56° C	Labil a pH=2
Alfa	18-20 kDa	No	No
Beta	23 kDa	No	No
Gamma	20-25 kDa	Si	Si

(Tomado de Stites, 1988)

IFN en cuanto a su composición química y su codificación genética: el IFN- α y el IFN- β constan de 166 aminoácidos cada uno. Sus genes se encuentran en el humano, en el brazo corto del cromosoma 9, no contienen intrones y no codifican asparaginas que sirven como sitios de glucosilación. Mientras que el IFN- γ consta de 146 aminoácidos, y su gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12, tiene 3 intrones y un elemento repetitivo de ADN (8).

Tanto el IFN- α como el IFN- β comparten un mismo tipo de receptor (9), cuyos genes se encuentran en el cromosoma 21 (10) y codifican una proteína que tiene una masa molecular de 110 a 130 kDa (11). En cambio, el IFN- γ ocupa un receptor distinto, cuyos genes están en el cromosoma 6 y codifican para una proteína de una masa molecular aproximada de 90 kDa (12).

En experimentos llevados a cabo con fibroblastos humanos e IFN- β (13), se ha logrado bloquear la unión del IFN- γ a su receptor, por lo que en ese trabajo el autor propone que al menos en este tipo de células el IFN- β y el IFN- γ sí comparten el receptor. Con relación a esto, se han obtenido otros resultados que indican que el IFN- γ al unirse a su receptor en la membrana celular, es capaz de inhibir la unión del IFN- α y del IFN- β al propio (14).

Se ha reportado que la unión del IFN- γ con su receptor se realiza en un tiempo promedio de 5 minutos a una temperatura de 37 °C con una concentración de 150 U/ml. Estas condiciones se han

reportado en polimorfonucleares, monocitos y otros tipos celulares; la internación se realiza rápidamente después de la unión (15).

Se desconocen en detalle, los mecanismos moleculares que se desencadenan al interaccionar los distintos tipos de IFN con sus receptores, sin embargo, en relación con algunos de los cambios bioquímicos que se han observado, se ha propuesto que se activan vías de transeñalización, como la del adenosín-3', 5' monofosfato cíclico (AMPC) (Fig. 1), o la de los fosfoinositósidos (Fig. 2). Al analizar los cambios bioquímicos en la célula, se observa que existen aumentos del guanosín-3', 5' monofosfato cíclico (GMPC), del AMPC, de la fosforilación de proteínas, de la enzima 2-5 adenilato sintetasa, de endonucleasas, proteincinasas, de la expresión de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad HLA-A y de la enzima 2-5 fosfodiesterasa. Por el contrario, se ha encontrado disminución en la enzima glucosiltransferasa, de la ornitina descarboxilasa, y un descenso en el transporte de timidina, así como disminución de los ácidos grasos insaturados de la membrana (16).

En el análisis realizado de las proteínas obtenidas de extractos de células estimuladas con IFN- α e IFN- γ se encontró que ambos inducen la síntesis de varios polipéptidos comunes, pero el IFN- γ induce además la producción de 12 polipéptidos adicionales, lo cual permite deducir que los dos tipos de IFN tienen mecanismos de acción tanto comunes como independientes (17),

VIA DEL AMP-CICLICO

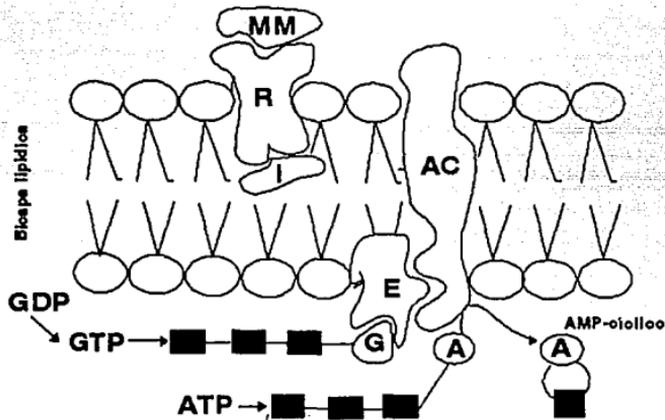


Fig.1-Esquema general de la vía del AMP-cíclico

Abreviaturas: MM- molécula mensajera , R-receptor, AC-adenilato ciclasa ,
I-molécula inhibidora, E-molécula estimuladora, G-nucleótido de guanina

VIA DE LOS FOSFOINOSITOSÍDOS

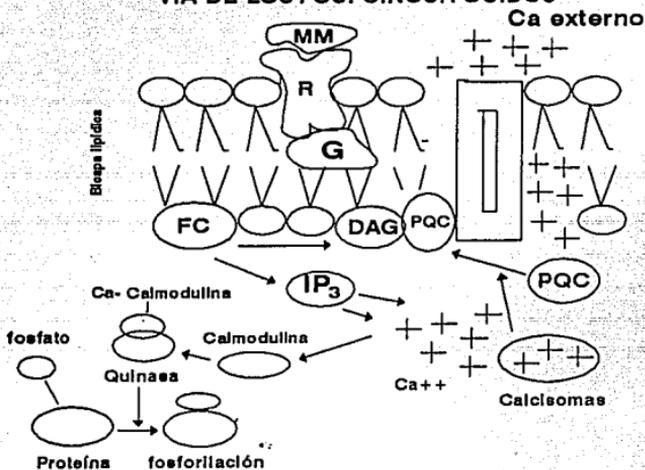


Fig.2-Esquema general de los fosfoinosítidos

Abreviaturas: MM-molécula mensajero, R-receptor, G-proteína G, FC-fosfolipasa C, DAG-diacilglicerol, PQC-proteínquinasa C, IP3-inositol trifosfato.

relacionando la gran semejanza que se encuentra en algunos efectos producidos por estos tipos de IFN.

Se ha reportado que el IFN puede inducir cambios en el ciclo celular, los cuales varían de acuerdo al tipo celular analizado (en células leucémicas, etc.) (18). Lo anterior se puede relacionar directamente con la actividad antiproliferativa y antitumoral de los IFNs. Entre los fenómenos bioquímicos que desencadena el IFN se encuentran los relacionados con su capacidad antiviral, que es una de sus principales funciones (Tabla #3).

El IFN se ha visto también relacionado con el sistema neuroendócrino. Se ha descrito que distintos tipos de hormonas son capaces de afectar su síntesis y de mostrar efectos semejantes a los producidos por el IFN. Entre ellas se citan a las hormonas adenocorticotrófica (ACTH), norepinefrina y vasopresina. Así mismo se ha reportado que el IFN- α puede semejar la acción de la ACTH (19). Se ha encontrado también que los opioides endógenos como la β -endorfina pueden afectar la función del IFN- α , y así mismo que el IFN- α puede unirse a receptores para este tipo de moléculas, y mostrar un efecto similar al que estos opioides inducen (20).

Acción del IFN en la inmunomodulación

Ahora se hará una breve revisión de los aspectos dentro del sistema inmunológico en los cuales participa el IFN.

Tabla 3. Mecanismos antivirales del IFN

Mecanismo	Efecto	Virus
Activación de la 2-5 oligoadenilato sintetasa	Degradación de ARNm y ARNr	Encefalomiocarditis Reovirus, Estomatitis vesicular (VSV)
Activación de la proteínkinasa dependiente de ARN de doble cadena	Fosforilación del factor de iniciación 2 (IF-2)	Mengo, Reovirus VSV
Inhibición de la metilación del ARNm nuevo	Reduce la eficiencia para la iniciación de la transcripción	Reovirus, VSV

(Tomado de López, 1984)

Las células del sistema inmune como son los macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células citotóxicas naturales (CN), se encuentran entre las principales sintetizadoras de los diferentes tipos de IFN y que responden a su presencia. Sin embargo, existen otros tipos celulares capaces también de responder y en algunos casos de sintetizar IFN. Entre ellas podemos mencionar a las células endoteliales, células hematopoyéticas y fibroblastos, entre otras (21).

El campo en el cual se ha estudiado más ampliamente la actividad desempeñada por el IFN es la inmunomodulación. El papel más importante en este campo lo tiene el IFN- γ , que funciona a concentraciones extremadamente pequeñas (picomoles). El IFN interactúa con la compleja red de las linfocinas, mediante 3 mecanismos: 1) inducción de otras linfocinas, 2) transmodulación de receptores de superficie y 3) en sinergia con otras linfocinas como agonista o antagonista en varias funciones celulares (19).

Se ha encontrado que los tres tipos de IFN son capaces de inducir un estado antiviral en las células, sin embargo, muestran diferente potencia, ya que se ha reportado que en general es necesaria menor cantidad de IFN- γ que de los otros dos tipos (22). También se ha descrito que de acuerdo al tipo de virus, éste puede mostrar mayor o menor sensibilidad a uno u otro tipo de IFN (23). Todos los tipos se han descrito como citostáticos para diversos tipos celulares, tanto normales como tumorales (24). El IFN- γ se

ha descrito como mitogénico para varios tipos celulares. También es capaz de activar macrófagos (25) y a células T (26), así como de activar o inhibir a las células NK (27), mientras que los IFN- α y β no activan a macrófagos pero sí a las células NK. Con respecto a la activación de las células LAK, se sabe que el IFN- γ las estimula, mientras que los IFN- α y β las inhiben (19).

El IFN regula la expresión de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad tanto de la clase I (CMH-I) como de la clase II (CMH-II). Por ejemplo, los tres tipos de IFN estimulan la expresión del CMH-I. Por su parte, para el CMH-II el IFN- α y β pueden estimular y en otras inhibir su expresión, mientras que el IFN- γ siempre estimula positivamente la expresión de estos antígenos (28). Además se ha encontrado que el IFN- γ induce el aumento de receptores Fc en los macrófagos (29).

Se ha reportado que el IFN- γ puede estimular o inhibir la activación de los linfocitos B (30). Los tres tipos de IFN estimulan su proliferación (31), y sólo el IFN- α y el IFN- γ estimulan la diferenciación (32, 33), apreciándose un mayor efecto de este último mediador.

Los tres tipos de IFN pueden influir sobre la producción de anticuerpos tanto positiva como negativamente (34, 35), al ejercer según parece una acción directa sobre las células B. En este aspecto es muy importante mencionar que el efecto sobre la producción de anticuerpos depende directamente del momento de la

aplicación del IFN o bien de su inductor.

Se ha reportado que el IFN puede estimular o interaccionar con uno o varios tipos de linfocina como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-2 (IL-2), y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) entre otros, modulando su acción (36, 37), o produciendo un efecto sinérgico en diversos aspectos. Con respecto a este último fenómeno se ha encontrado que al aplicar de manera combinada distintos tipos de IFN se incrementa su capacidad antiviral, así como su capacidad antitumoral (38).

Se han descrito otras funciones del IFN, como la supresión de la actividad hematopoyética (39), y el incremento de procesos autoinmunes. Se ha asociado la deficiencia en la cantidad de IFN- γ con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide o enfermedades del tejido conectivo (40). El IFN puede activar o inhibir oncogenes (41, 42), activar a las células endoteliales y mejorar desórdenes mieloproliferativos al aplicarse clínicamente, como por ejemplo, se ha visto que la deficiencia en IFN- α va relacionada con algunas enfermedades como las leucemias.

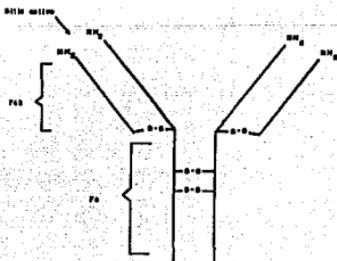
Al IFN se le relaciona también con las vías supresoras que participan en la hipersensibilidad de tipo tardío, en las reacciones de injerto contra huésped y del huésped contra el injerto (43). Se le ha relacionado también con el desarrollo de la tolerancia materna hacia el feto (44), también se ha visto que la

aplicación de los inductores de IFN ayuda a prolongar la permanencia de los aloinjertos en ratón (45), participando al parecer en el fenómeno conocido como tolerancia inmunológica (46). Esta se considera como una forma de insensibilidad específica, con una ausencia de respuesta inmune hacia el estímulo antigénico, debido a la inmadurez o incompetencia del sistema inmune, si bien se desconoce la manera como el IFN induce este efecto.

Efecto del Interferón en la Producción de Inmunoglobulinas

Uno de los aspectos ya mencionados en los cuales el IFN es capaz de mostrar efectos es en la producción de inmunoglobulinas, al actuar directamente sobre los linfocitos B. Como se sabe existen 5 grupos principales de inmunoglobulinas en el plasma: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD; en donde los tipos IgG e IgA constan de subtipos. Estos tipos de inmunoglobulinas cumplen distintas funciones durante una respuesta inmune de anticuerpos (47, 48), se pueden observar algunas de sus características en el cuadro 4.

La estructura básica de una inmunoglobulina se puede observar en la siguiente figura.



	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
Cadena pesada	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ϵ
Cadena ligera	K, λ								
Masa molecular (kDa)	148	148	169	148	970	160	160	172	188
Coefficiente de sedimentación	7S	7S	7S	7S	19S	7S	7S	7S	8S
Concentración en suero (mg/ml)	3-10	1-7	0.2-2	0.1-1.3	0.6-2	0.7-2.3	0.1-0.6	0.005-0.2	0.00005
Activación de Complemento									
Vía clásica	++	+	++	-	+++	-	-	-	-
Vía alterna	±	+	±	±	±	ND	+++	-	-
Transferencia por placenta	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla #4.-Propiedades químicas y biológicas de las inmunoglobulinas

(Tomado de Hicks y Diaz,1988)

Se han realizado numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, en animales como en humanos, los cuales han mostrado que los distintos tipos de interferón son capaces de modificar la producción de anticuerpos. La modificación va a depender del momento de la aplicación del IFN, o de su inductor con respecto al estímulo antigénico, y de la dosis aplicada.

En este punto encontramos un aspecto importante y es uno de los objetivos de este trabajo: ver la posible influencia que puede presentar el IFN endógeno inducido con la molécula en estudio, sobre la producción de anticuerpos en el individuo.

Se ha reportado que la aplicación del IFN después del estímulo antigénico suprime la producción de anticuerpos; sin embargo, también se ha encontrado que la inyección del IFN previa al estímulo antigénico aumenta la producción de anticuerpos.

En relación a la dosis se ha visto que las dosis altas inhiben *in vivo* la respuesta de células formadoras de placas (CFP) medidas por la técnica de Jerne, mientras que las dosis bajas aumentan la formación de placas.

En un experimento realizado en ratones, en donde se midió el número de CFP se encontró que la aplicación del IFN, al mismo tiempo que el estímulo antigénico producía un aumento en la respuesta temprana de anticuerpos (49).

En otro experimento, también en ratones, se encontró que la

aplicación de IFN- γ antes del estímulo antigénico suprime efectivamente la respuesta de CFP (50). Se ha descrito también que la aplicación del IFN provoca una reducción en el número de clonas de las CFP (51).

Al aplicar IFN- α o IFN- β en el ratón, dos días antes de la sensibilización con eritrocitos de carnero, se ha visto, al evaluar las CFP, una supresión de la respuesta. Si se utilizan inductores (del tipo poly(I):poly(C)) entonces ocurre un aumento de la respuesta (52).

In vitro se ha encontrado que al añadir el IFN- α o β , o sus inductores a cultivos de células de bazo de ratón, antes, al mismo tiempo o después que el estímulo antigénico, se obtiene una supresión de la respuesta a la formación de CFP (53).

Se ha realizado la purificación de linfocitos B, linfocitos T y macrófagos, con la finalidad de realizar distintos cultivos en donde se mezclan de manera diferente estos tipos celulares y en ellos se ha visto, que la aplicación en estos cultivos de distintas preparaciones de IFN, eran capaces de inhibir la formación de placas, por lo que se ha propuesto también la importancia de los linfocitos T supresores o T auxiliares en la supresión de la respuesta de anticuerpos contra antígenos T-dependientes (54).

Además, se ha descrito que el IFN es capaz de seleccionar el tipo de inmunoglobulina a secretar, en particular el IFN- γ , ya que estimula in vitro la producción de IgG₂ por células B en reposo estimuladas con lipopolisacáridos y se ha visto como un potente

inhibidor de la expresión de los isotipos IgG_{2b}, IgG₁ e IgE (55).

In vivo el IFN- γ tiene un importante papel en la estimulación de síntesis de IgG_{2a} y en la supresión de IgG₁ e IgE. Es capaz de promover la síntesis y emisión de componentes secretorios, los cuales son importantes para las inmunoglobulinas tipo IgA e IgM, además que mejora la fagocitosis de complejos antígeno-anticuerpo por macrófagos (56).

-Inductores de Interferón

Un inductor de IFN es una molécula que al entrar en contacto con los distintos tipos celulares que se han mencionado, estimula la producción de esta linfocina en ellas. Se conocen diversos tipos de inductores, entre los que se encuentran: antígenos tumorales, virus, protozoarios, bacterias, productos microbianos, ácidos nucleicos extraños para la célula, así como compuestos sintéticos como policaciones, policarboxilatos y polinucleótidos, siendo el más utilizado el poly(I):poly(C).

Uno de los primeros trabajos acerca del uso de inductores de IFN data de 1953, donde se utilizó un ARN de levadura el cual se aplicó a ratones y fue efectivo para inhibir la infección por virus MM. Posteriormente entre los años de 1960 a 1970 se dió un gran despliegue en la investigación acerca de los inductores del IFN.

Por ejemplo, en 1964 se obtuvo un virus de naturaleza polianiónica en un extracto del micelio del hongo Penicillium

stoloniferum el cual fue capaz de inhibir la multiplicación viral en cultivo de tejidos. Las características polianiónicas de este virus motivó la investigación hacia compuestos sintéticos semejantes como poliacrilatos e inductores plásticos (piranos). Entre los años de 1965 a 1967 Braun y Narano (57), lograron incrementar la producción de anticuerpos en ratón usando complejos de polirribonucleótidos como el poly(A):poly(U) como adyuvantes.

Se han utilizado como inductores de IFN, ARN de origen viral así como diversos virus atenuados: por ejemplo el ARN de reovirus, colifagos, bacteriófago MS2, así como el virus de la encefalomiocarditis, el del sarampión o el de vaccinia (58). Además se han utilizado diversos inductores de origen microbiano, entre los cuales se han mencionado bacterias gram negativas o endotoxinas preparadas de su pared celular, además de otros microorganismos como rickettsias y protozoarios, y productos de origen fúngico (59). Los primeros trabajos que se tienen a este respecto datan del año de 1970 en los que se utilizaron bacterias como Brucella, Escherichia, Salmonella, Vibrio, etc., y protozoarios como Plasmodium y Toxoplasma, además de hongos tales como Candida, Streptomyces y Alternaria.

En el año de 1969 se encontró que un ARN homólogo modificado por tratamiento con ácido nitroso era capaz de inducir la producción de pequeñas cantidades de IFN (60). Además, durante esta época se trabajó con ARN de doble cadena tanto natural como

sintético, que como se mencionó anteriormente era capaz de promover la síntesis de IFN. Las investigaciones posteriores se realizaron con diversos compuestos sintéticos, como el poly(I):poly(C) que es un producto derivado del ácido policitídilico y del ácido polinosínico, el cual semeja un ARN de doble cadena y reproduce la que parece ser la principal característica para inducir la síntesis de IFN y que es la presencia de una estructura secundaria con un gran número de cargas negativas (61). Otros compuestos sintéticos utilizados actualmente son los piranos, compuestos plásticos (ácido maleico y éter divinílico) que cumplen con este requisito.

Estos dos tipos de inductores mencionados se aplican actualmente. Los resultados obtenidos acerca de su capacidad como inductores de IFN son muy variados, entre ellos existen resultados que se pueden considerar como excelentes, como ejemplo se tiene un experimento realizado en ratones en donde la aplicación de poly(I):poly(C) provocaba la regresión de tumores transplantados (62).

Se ha utilizado también el poly(I):poly(C) en el tratamiento de afecciones muy diversas como: infecciones por protozoarios, infecciones provocadas por los virus del herpes, sarampión y varicela, entre otros. Además, como se mencionó anteriormente se utiliza en el tratamiento del cáncer. Se ha descrito que este tipo de compuesto activa el sistema reticuloendotelial. Sin embargo, su aplicación con fines terapéuticos en el hombre ha dado resultados muy contradictorios. Por ejemplo, existen algunos reportes en donde

se demuestra que este inductor estimula gran síntesis de IFN y ayuda al tratamiento de problemas oncológicos (63). En cambio hay trabajos donde se reporta una pobre inducción de la producción de IFN (64). Se han publicado distintos trabajos de investigación que reportan que las cantidades necesarias de este inductor para obtener una buena estimulación de la síntesis de IFN son extremadamente altas para el individuo al cual se aplica, en general se ha visto que existe una baja toxicidad, así como una baja producción de IFN (65). Se sabe, que algunos individuos son incapaces de responder, es decir, no muestran ninguna respuesta cuando se les aplica este tipo de inductor, esto se ha visto principalmente en individuos con problemas de cáncer de piel.

Este tipo de inductor se ha investigado extensamente, desde su descubrimiento en la década de 1960, y actualmente se sigue trabajando acerca de su uso, para tratar los más diversos padecimientos. Se ha utilizado, en combinación con otros compuestos como policarboxilatos, IFN- α , etc. (66), todo esto con la finalidad de potenciar la síntesis del IFN.

La utilización de los diversos tipos de inductores mencionados presenta problemas debido a los efectos secundarios que provocan por diversos motivos tales como una mala purificación de los mismos; como ocurre con los extractos bacterianos. También se ha encontrado que algunos inductores sintéticos (piranos) tienen una larga permanencia en el organismo y alcanzan niveles tóxicos para el individuo y provocan problemas como trombocitopenias (61).

Otro problema que se presenta es la sensibilidad del inductor

a la acción de las nucleasas celulares, esto se ha encontrado al utilizar ARN virales y homólogos, así como polinucleótidos.

Por todo lo anterior se concluye que la investigación sobre la aplicación de inductores, así como el encontrar el inductor ideal tiene aún un panorama bastante amplio, sobre todo mientras se siga desconociendo el mecanismo por el cual se da la producción de IFN.

A N T E C E D E N T E S

En el Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye A.C., (IICHS), ubicado en Avenida San Bernabé No. 416-100d, Col. San Jerónimo Lídice en Mexico, D.F. se aplican desde hace más de 30 años tratamientos terapéuticos a base de coenzimas, enzimas y ácidos nucleicos, además de una técnica de terapia celular, cuya finalidad es mejorar la calidad de vida de individuos ancianos, así como la de pacientes afectados por padecimientos de diversa índole (virales, degenerativos, hormonales, etc).

Cuando es necesaria la realización de implantes, trasplantes de células, tejidos u órganos, se tiene el problema del rechazo inmunológico. Para evitarlo, se recurre al uso de corticoesteroides o de otros inmunosupresores, como los rayos X, globulina antilinfocito o agentes citotóxicos como la ciclofosfamida, azatioprina y el metrotexato. Sin embargo, estas drogas afectan profundamente el sistema inmunológico y provocan diversos efectos secundarios. Como una alternativa se pensó en la aplicación de un compuesto capaz de incrementar la síntesis del IFN natural, el cual como ya se ha visto cumple un papel muy importante dentro del sistema inmunológico, y además es capaz de promover el fenómeno de tolerancia inmunológica, el que es un aspecto sumamente importante que no se ha investigado a profundidad, y con el fin de poder evitar, al utilizarlo, los efectos secundarios producidos por

los inmunosupresores. Por ello se pensó en aplicar un ácido ribonucleico de transferencia modificado (ARNT HAM) (las siglas HAM, son las iniciales del Prof. Heberto Alcázar Montenegro, quien estabilizó la molécula), ya que por sus características y en relación con los datos antes mencionados podría inducir la producción de IFN, e intentar posteriormente explotar la acción del IFN como posible promotor del fenómeno de tolerancia inmunológica durante la aplicación de la terapia celular.

A continuación se mencionan algunos de los resultados experimentales que se han obtenido en el IICHS con la aplicación del ARNT HAM, algunos de los cuales están en proceso de publicación:

1 - Se ha aplicado en pollos afectados con la enfermedad de Newcastle, en los que se obtuvo una disminución de la mortalidad, lo cual tal vez se deba a que se indujo la síntesis de IFN el cual despliega un efecto antiviral.

2 - En aves afectadas de leucosis aviaria de tipo Mareck se observó un efecto antiviral con la aplicación del ARNT HAM, ya que dió como resultado la desaparición de los signos neurológicos característicos de esta enfermedad.

3 - En el cólera porcino al aplicarse el ARNT HAM se logró la curación de los animales, observando nuevamente un posible

efecto antiviral.

4 - Se ha aplicado también con la finalidad de estudiar su posible efecto como inductor del fenómeno de tolerancia inmunológica, lo cual se logró al evitar el rechazo de implantes heterólogos subcutáneos practicados en bovinos, porcinos y equinos, (67).

5 - En humanos el ARNT HAM se ha utilizado para el tratamiento de problemas autoinmunes como: la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, etc., disminuyendo los síntomas de la enfermedad (68).

6 - Se ha aplicado también en el tratamiento de pacientes con problemas virales como: herpes zoster, hepatitis, etc., con resultados favorables, al observarse la disminución o bien la desaparición del padecimiento viral, lo que indicaría una posible producción de IFN, ya que se observa uno de los efectos del IFN, como lo es el antiviral. (68).

7.- Se ha utilizado en humanos con la finalidad de evitar el rechazo a la terapia celular (implante heterólogo y heterotópico de médula ósea e hipófisis) que se aplica, obteniéndose resultados favorables al evitarlo, con lo que podemos proponer un posible papel como inductor de la tolerancia inmunológica. (69, 70, 71).

Esta serie de datos experimentales y clínicos permiten proponer que la molécula aplicada (ARNT HAM) interacciona, gracias a sus características, con el sistema inmune y que induce la producción de IFN, de manera que se manifiestan algunos de los efectos de éste como son el antiviral, inmunomodulador y de inductor de la tolerancia inmunológica.

Sin embargo, lo anterior sólo permite proponer la presencia del IFN en forma indirecta, de aquí el interés por encontrar una forma directa y cuantitativa que nos permita demostrar la producción del IFN con la aplicación del ARNT HAM. En este trabajo se aplicó el inductor, tanto a sujetos normales como en aquellos que mostraban algún padecimiento crónico. Como dato adicional se decidió valorar los niveles de los tres tipos principales de inmunoglobulinas las cuales también se encuentran relacionadas con el proceso de rechazo.

H I P O T E S I S

Si la aplicación experimental de cualquier ácido nucleico exógeno de doble cadena tanto homólogo como heterólogo es capaz de inducir la síntesis del IFN tanto *in vitro* como *in vivo*, proponemos que la aplicación de un ARNT HAM modificado de origen vegetal incremente los niveles plasmáticos de esta linfocina en humanos, y lo cual modifique a su vez los niveles en el plasma de las inmunoglobulinas de tipo IgG, IgM e IgA.

O B J E T I V O S

1) Establecer las condiciones óptimas para la determinación de los niveles de IFN en plasma humano mediante las técnicas de inhibición del efecto citopático (IECP) y la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

2) Determinar los niveles plasmáticos de IFN total e IFN- γ en sujetos normales y en sujetos afectados de procesos degenerativos que reciben ARNT HAM como inductor de IFN.

3) Estudiar si existen diferencias en los niveles de IFN total e IFN- γ plasmático antes, y durante el periodo de aplicación del ARNT HAM.

4) Establecer la correlación entre los niveles de anticuerpos presentes en el plasma de los sujetos con respecto a los niveles del IFN total que presentan, antes y durante el periodo de aplicación del ARNT HAM.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O

Grupo de estudio.

Se estudiaron 3 grupos: el grupo I (control) integrado por 15 sujetos clínicamente sanos, grupo II integrado por 15 sujetos algunos de los cuales mostraban diversos tipos de afecciones y otros acudían por profilaxis a recibir el tratamiento (Tabla #5), y el grupo III integrado por 8 sujetos con características similares a las del grupo II (Tabla #6). Los grupos II y III recibieron ARNT HAM así como terapia celular. Del grupo III se determinó únicamente el IFN- γ .

A los sujetos del Grupo I se les tomó únicamente una muestra de sangre periférica (5 ml) de la que se obtuvo el plasma, con el objeto de determinar si existía IFN circulante sin la aplicación del ARNT HAM. El intervalo de edades va de los 20 a los 35 años con una media de 28 años. Este grupo se formó con sujetos de este intervalo de edad porque fue difícil encontrar donadores voluntarios con edades similares a los grupos experimentales.

En los sujetos del grupo II, el intervalo de edad va de los 32 a los 72 años con una media de 52.6 años. A este grupo se le tomaron muestras de plasma, antes y durante el período de la aplicación del inductor. Y se analizaron con las técnicas de IECP y la técnica de ELISA por inhibición.

Tabla 5. Sujetos del Grupo II

Sujeto #	Sexo	Motivo de consulta	Edad (años)
1	F	Profilaxis	71
2	M	Úlcera duodenal	61
3	F	Profilaxis	46
4	F	Osteoartrosis	66
6	F	Artritis reumatoide	32
6	F	Lupus eritematoso sistémico	47
7	F	Osteoporosis	63
8	M	Osteoartrosis	69
9	F	Artralgias	66

Sujeto #	Sexo	Motivo de consulta	Edad (años)
10	F	Histiocitoma controlado	46
11	F	Profilaxis	69
12	F	Artritis reumatoide	37
13	F	Profilaxis	38
14	F	Profilaxis	68
15	F	Profilaxis	72

F = femenino M = masculino

Tabla 6. Sujetos del Grupo III

Sujeto #	Sexo	Motivo consulta	Edad (años)
a	F	Osteoartritis	53
b	M	Profilaxia	40
c	F	Osteoartritis	51
d	F	Profilaxia	41
e	F	Osteoartritis	53
f	F	Neurosis y - gastritis	40
g	F	Profilaxia	62
h	F	Neurosis	53
i	M	Control	40
j	F	Control	41

Con la finalidad de probar otra variante de la ELISA y reducir en lo posible la degradación que pudiera sufrir el IFN-r existente en las muestras de plasma del grupo II se optó por formar el grupo III de sujetos, los que se analizaron por la técnica de ELISA indirecta. En este grupo el intervalo de edad fluctúa de los 40 a los 62 años con un promedio de 49.1 años.

Para obtener las muestras de plasma de los distintos sujetos se tomaron 5 ml de sangre periférica en 0.1 ml de heparina en condiciones estériles. Cada una de las muestras se centrifugó entre 1,200 a 1,300 rpm durante 10 minutos. Se separó el plasma, el cual se recolectó en pequeñas alicuotas y se congeló a -70 °C hasta su procesamiento.

En los grupos de estudio II y III se tomaron muestras a diferentes tiempos: la primera antes de la aplicación del ARNT HAM, la segunda de una hora treinta minutos a dos horas después de la aplicación del ARNT HAM (200 mg en cada aplicación), tiempo que transcurre entre la aplicación del ARNT HAM y la aplicación de la terapia celular. En 8 sujetos se tomó una muestra de plasma 5 días después de la primera toma, para determinar los niveles de IFN total (IFN total se le denomina al IFN que se encuentra en el plasma, sin hacer ninguna distinción entre los 3 tipos de IFN que se conocen) y de IFN-r.

Para el grupo II se tomaron muestras adicionales a los 5, 14, 21 y 28 días para realizar la medición de los niveles de

anticuerpos circulantes.

La determinación de los niveles de IFN total en el plasma se realizó mediante la técnica de inhibición del efecto citopático (IECP) de amplio uso en virología para medir los niveles de IFN (72).

Se empleó la técnica de ELISA por inhibición para determinar de manera particular los niveles de IFN- γ , el cual se considera como el inmunomodulador más importante de los tres tipos de IFN. Adicionalmente se realizó también una ELISA indirecta.

-Propagación viral.

Una de las primeras fases a realizar fue la propagación viral. Una monocapa confluyente de células Vero (apéndice 1), en botella de cultivo de 50 ml (NUNC), se infecta con virus de la estomatitis vesicular (VSV) (apéndice 1), 500 μ l de un concentrado viral diluido en 500 μ l de medio de cultivo (RPMI, Sigma, Co.) con suero de ternera fetal de complementado (SFT, Sigma, Co.) al 10 % (RPMI-10). El inóculo se incubó por 45 minutos a 37 °C, al terminar este tiempo se adiciona 1 ml más de RPMI-10. Después de comprobar el efecto citopático (lisado y desprendimiento celular) con la ayuda de un microscopio óptico invertido (Olympus, modelo T-041), a las 24 hr aproximadamente, se recolecta el medio de cultivo, lavando con este mismo medio numerosas veces para desprender el total de células del cultivo. El virus intracelular se libera por medio de 2 ciclos de congelación-descongelación.

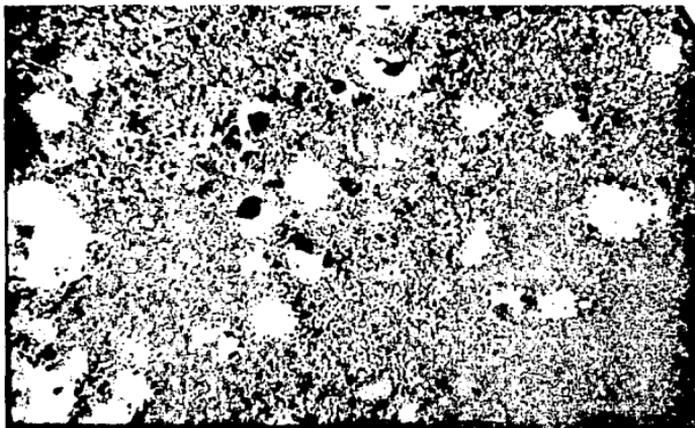
La suspensión obtenida se centrifuga (centrifuga Beckman, modelo FJ-6) por 10 minutos a 1800 rpm a una temperatura de 10 °C. Se recupera el sobrenadante y se determina el título viral por ensayo de placas. El virus se fracciona en pequeñas alícuotas de 1 ml y se conserva a -70 °C (REVCO).

-Titulación viral.

El VSV se tituló por medio de un ensayo de microtitulación en placas (73) (fotografía 1), en el cual se realizan diluciones seriadas del virus a partir de 1:2 hasta 1:560. De cada dilución se adicionan 50 μ l a cada pozo de una caja de cultivo de 96 pozos (NUNC), donde se sembraron 24 horas antes, 30 000 células Vero. Cada dilución se hace por triplicado, y tres pozos a los cuales sólo se adiciona medio se usan como testigos. Las monocapas se incuban durante 45 minutos, se retira el virus no absorbido por medio de lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril (pH=7.2) y se agregan 200 μ l de medio de cultivo con metilcelulosa (Sigma, Co.) al 2%.

Al comprobarse la aparición del efecto citopático se retira el medio con metilcelulosa por succión. Se tiñen las células con cristal violeta (Merck, Co.) al 0.5% (peso/volumen) en metanol (Merck, Co.) al 70% durante 15 minutos, se decanta el colorante y se lava cuidadosamente con agua corriente para eliminar el exceso.

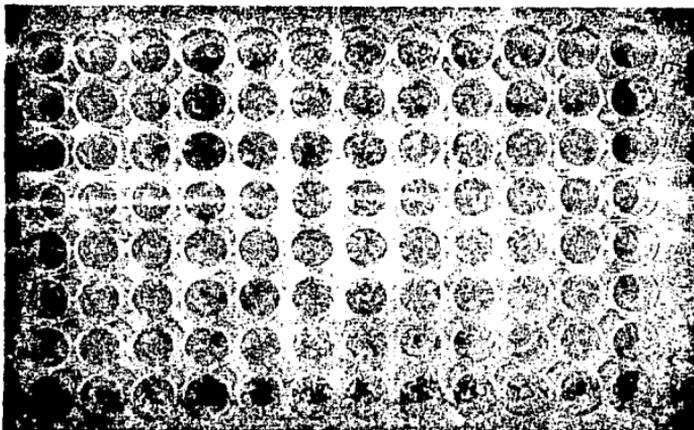
Se realiza el conteo de las placas (fotografía 2) y se calcula el título viral con la siguiente fórmula:



Fotografía 1.- Placas virales (aumento 10X)



Fotografía 2.- Placas virales (aumento 20X)



Fotografía 3.- Placa de titulación de los plasmas, las diluciones van de izquierda a derecha, las 2 líneas verticales finales son los controles celulares. La última línea horizontal es la curva de titulación del IFN.

ufp/ml= PV x 20 x factor de dilución

donde ufp significa unidades formadoras de placas, PV son las placas virales contadas en las monocapas que mostraban el efecto citopático y 20 es el factor de relación entre los 50 μ l de dilución viral aplicada para encontrar el valor correspondiente para el volumen de un mililitro.

-Técnica de Inhibición del Efecto Citopático

El procedimiento se realiza en placas de 96 pozos de microcultivo celular (NUNC). La muestra a titular se diluye en medio RPMI-10, y se coloca en el primer pozo de una línea de la placa de titulación un volumen de 0.2 ml. Los pozos siguientes ya contienen 0.1 ml de RPMI-10, cada dilución de la muestra se hace por triplicado, transfiriendo 0.1 ml. de un pozo al siguiente de manera sucesiva hasta el final de la línea.

En cada placa seis de los pozos se llenan con 0.1 ml de RPMI-10 que sirven como control, y otros seis con 0.1 ml. de RPMI-10 que funcionan como control viral.

Cada pozo se siembra con 3×10^4 células, provenientes de la línea celular HEP-2 (apéndice 1), en un volumen de 0.1 ml de RPMI-10, y se incuban a 37 °C por 24 horas. Al término de este tiempo se retan con 500 unidades formadoras de placas (UFP) en 50 μ l de medio por pozo. Este mismo inóculo se adiciona a los testigos virales.

El volumen final de cada pozo es 0.25 ml. La placa se incubaba hasta que los testigos virales muestren de 90 a 100% del efecto citopático. Se retira el medio de cada uno de los pozos y se tiñe con colorante cristal violeta como en la titulación viral.

El título del IFN se lee como el recíproco de la dilución que dió el 50% de protección del efecto citopático en la monocapa celular, es decir 50% de reducción en el número de placas virales (fotografía 3). Un estándar de laboratorio de IFN comercial (Sigma, Co), se incluye en cada placa para ayudar a determinar el título absoluto de la muestra. La determinación del 50% de protección se puede determinar con y sin la ayuda del microscopio óptico invertido.

-Técnica de ELISA

Con la finalidad de hacer más específicos los resultados obtenidos se usó la técnica de ELISA en dos variantes: el método por inhibición y el método indirecto, ambas para la determinación del IFN- γ . Adicionalmente se utilizó una ELISA por inhibición para determinar los niveles del Factor de Necrosis Tumoral- α (FNT- α) (74).

-Método por inhibición

Como primer paso se realizó la conjugación con peroxidasa de rábano de 100 000 unidades totales (UT) de IFN- γ comercial (Sigma, Co.), según la técnica de Avrameas (apéndice 2).

La placa de ELISA (Maxisorb, NUNC, Co.), se sensibilizó con un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ (ICN, Biomedicals) a una concentración de 8 unidades neutralizantes (UN) en amortiguador de carbonatos (pH= 9.6), por pozo durante 24 horas a 4 °C.

Se lavó posteriormente 5 veces con PBS con Tween 20 (T) (Sigma, Co.), al 0.1 % y 5 veces con PBS-T 0.05%, se bloquea la placa con 100 μ l de albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma, Co.) al 1% en PBS en cada pozo durante 24 horas a 4 °C. Se repite el procedimiento de lavado. Mientras tanto se mezclan perfectamente 100 UT del IFN- γ marcado con 100 μ l de una dilución de 1:100 en PBS-T 0.1% del plasma, y se mantienen en agitación durante 1 hora, al terminar lo anterior se colocan 50 μ l por pozo durante 1 hora a 37 °C.

Se repite el procedimiento de lavado, al terminar se revela con 4 mg de ortofenilendiamina (OFD) (Sigma, Co.) más 5 μ l de H₂O₂ al 30%, más 10 ml de amortiguador de citratos (pH= 5), y se colocan 100 μ l por pozo.

La reacción se detiene con 25 μ l de H₂SO₄ 2.5 N por pozo y se lee a 490 nm en un lector de ELISA (Dynatech, Co.).

- Método Indirecto.

Se utilizaron placas para ELISA de poliestireno (Maxisorb, NUNC) de 96 pozos, que fueron sensibilizadas con cada uno de los plasmas en una dilución 1:100 en PBS-T 0.05% durante 24 horas a

4 °C. Posteriormente se retiraron las diluciones y se bloqueó la placa con ASB al 1% en PBS durante toda la noche a 4 °C. Se lava la placa con PBS-T al 0.05% 6 veces como mínimo.

Al terminar se incubó la placa con el anticuerpo monoclonal específico para IFN- γ humano a una concentración de 8 UN por pozo durante 2 horas a 37 °C. Se lavó la placa y se colocó un anticuerpo conjugado con biotina (Sigma, Co.), que reconoce al primer anticuerpo, a una dilución 1:500 y se incubó, durante 2 horas a 37 °C. Se lavó nuevamente y se incubó ahora con el complejo streptoavidin-peroxidasa (Amersham, Co), a una dilución 1:500 a las mismas condiciones anteriores para finalmente lavar y revelar de la misma manera que en la técnica anterior.

Tanto para el método por inhibición como para el indirecto se manejó una curva estándar, distintas concentraciones de IFN- γ comercial (Sigma, Co). Cada una de las muestras se ensayó por triplicado y se calculó el resultado mediante extrapolación en la curva.

- Determinación del FNT- α mediante ELISA por inhibición

Se marcan con peroxidasa como primer paso 2 μ g ó 54 000 unidades totales (UT) de FNT- α (Sigma, Co.), de acuerdo a la técnica de Avrameas.

La placa de ELISA (Maxisorb, NUNC) se sensibiliza con una dilución 1:250 del anticuerpo monoclonal anti-FNT- α (Sigma, Co.), en amortiguador de carbonatos (pH= 9.6), 50 μ l por pozo durante 24

horas a 4 °C. Se lava 5 veces con PBS-T 0.1% y 5 veces con PBS-T 0.5%. Se bloquea con 100 µl de ASB-PBS al 1% también por 24 hrs a la misma temperatura y al término se repite el procedimiento de lavado. Se mezclan 100 µl con una concentración de 0.02 µg ó 540 UT del FNT- α marcado con 100 µl de una dilución 1:100 de los plasmas en PBS-T 0.1%, se mantienen en agitación durante 1 hora a 37 °C, y se colocan 50 µl por pozo también durante 1 hora a 30 °C.

Se lava y se procede a revelar como en las técnicas de ELISA que ya se mencionaron.

- Determinación de Inmunoglobulinas

Se determinaron los tipos IgG, IgA e IgM en el laboratorio clínico del Hospital Regional XXV del IMSS en el aparato Technicon H-10.

- Pruebas Estadísticas

Se realizó el análisis nominal de varianza (ANOVA) en una computadora Mackintosh classic en el programa Statview.

RESULTADOS

Los niveles basales del IFN total detectado por la técnica de IECP, en los sujetos del grupo I, variaron de 32 U/ml a 160 U/ml, con una media de 63 U/ml (tabla #7). En cambio los valores de IFN total en el grupo II fluctuaron entre 10 y 320 U/ml antes de la aplicación del inductor (tabla #8). La distribución de los valores de IFN reveló que 3 sujetos mostraron títulos iniciales de IFN de 10 U/ml, 5 pacientes tuvieron 20 unidades, 2 casos presentaron 40 unidades, uno 80 unidades, otro más 160 unidades y en los últimos 3 pacientes se encontraron 320 unidades.

Los valores de IFN obtenidos en nuestro estudio en los grupos I, II y III antes de la aplicación del inductor, se pueden considerar dentro de los límites normales previamente reportados por otros autores (75). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, al comparar los títulos de IFN entre el grupo control y los grupos experimentales antes de la aplicación del inductor.

Al estudiar el nivel del IFN total 2 horas después de la aplicación del ARNT HAM (segunda muestra), se obtuvo una elevación de la actividad biológica, determinado esto por la prueba de IECP. La respuesta más baja se encontró en 2 casos, cuyos valores aumentaron a 80 U/ml. En ocho sujetos se tuvo un incremento de 160 a 320 U/ml y en cinco sujetos se observó el mayor incremento en los niveles de IFN, cuyos valores fueron de 640 a 2,560 U/ml. Como se observa, el 94% de los pacientes mostró un aumento en los niveles

Tabla 7. Determinación de IFN por la técnica de IECP (Grupo I)

Sujeto #	Valor (U/ml)	
1	64	
2	32	
3	64	
4	64	
5	32	
6	32	
7	64	
8	128	
9	32	$\bar{X} = 63$ U/ml
10	32	
11	40	
12	80	
13	160	
14	80	
15	40	

**Tabla 8. Determinación de IFN
por la técnica de IECP (Grupo II)**

Sujeto #	Muestra 1* antes	Muestra 2* después
1	40	160
2	20	320
3	20	160
4	320	320
5	40	160
6	10	80
7	20	320
8	320	1280
9	10	160
10	20	640
11	320	1280
12	20	320
13	10	80
14	160	640
15	80	2560

• Valor en U/ml

$x = 94$ U/ml $x = 565$ U/ml

$p = 0.016$

basales de IFN total lo que es estadísticamente significativo ($p=0.01$).

El seguimiento de 8 sujetos nos permitió obtener una tercera muestra a los 5 días de aplicado el inductor (tabla #9). En este grupo se observó que en 7 de los 8 casos los niveles de IFN sufrieron un descenso, con respecto a la muestra tomada a las 2 horas de la aplicación del ARNT HAM. Se apreció que 2 sujetos tuvieron un descenso de más del 50 % del nivel inicial, sin embargo, en 6 pacientes los títulos de IFN se mantuvieron estables o por encima de los niveles basales (muestra 1) en cada individuo ($p=0.005$).

En el estudio realizado a un sujeto testigo (gráfica #1), a quien en cada aplicación, se le administraron 200 mg del ARNT HAM, se pudo observar una respuesta positiva en la inducción de IFN total determinado por medio de la IECF. El valor inicial de IFN fue de 40 U/ml, el cual se elevó hasta 320 U/ml con la primera aplicación del inductor. Con la segunda aplicación del ARNT HAM se obtuvo un incremento hasta de 2,560 U/ml, que fue seguido de un descenso posterior (48 horas después) hasta un nivel de 320 U/ml. Después del tercer y último estímulo, se observó un nuevo incremento de 1280 unidades, y un descenso posterior hasta 640 unidades en la última muestra.

En el grupo II, conformado por 15 pacientes con diferentes procesos inflamatorios crónicos, se encontró que los niveles basales de IFN- γ antes de la aplicación del inductor variaron de

**Tabla 9. Determinación de IFN
por la técnica de IECF (sujetos grupo II)**

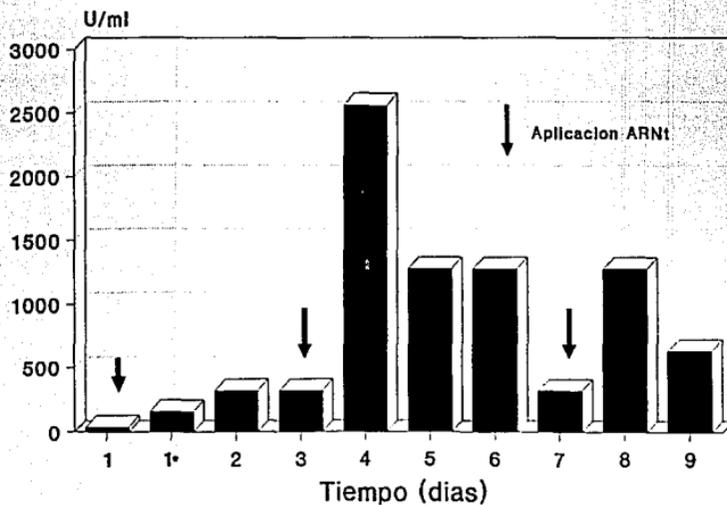
Sujeto #	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
4	320	320	80
5	40	160	320
7	20	320	80
8	320	1280	320
9	10	160	40
10	20	640	320
12	20	320	80
14	160	640	40

p = 0.005

* Valor de cada muestra en U/ml

En esta tabla se observan los valores obtenidos en 8 sujetos, en donde la muestra 1 es antes del ARNt HAM, la muestra 2 es a las 2 horas de su aplicación y la tercera muestra que corresponde a el registro a los 5 días de la aplicación del inductor.

Gráfica 1. Determinación de IFN por la técnica de IECP



** Registro a las 2 horas de la aplicación del inductor

12.5 a 925 U/ml. Estos valores iniciales determinados mediante la técnica de ELISA por inhibición se consideran altos, ya que se conoce que esta linfocina se encuentra en cantidades tan pequeñas como nanogramos (76), en condiciones normales (tabla #10). Estos hallazgos pueden explicarse en parte, debido a que la concentración basal elevada de IFN- γ puede asociarse con el tipo de padecimiento que muestran los distintos sujetos estudiados (tabla #5) (39, 40).

Después de la aplicación del inductor, los valores de IFN- γ se encontraron en un intervalo que fue de 81.2 unidades a 2,374 unidades. Once de quince sujetos (73%) mostraron un incremento en los niveles de esta linfocina, después de la administración del ARNT HAM. En uno de los casos no se encontró ningún cambio en la producción de IFN y en 3 los niveles iniciales descendieron, los padecimientos que muestran estos 4 últimos sujetos son artritis reumatoide, osteoporosis y un histiocitoma controlado. El análisis estadístico demostró que las diferencias encontradas, antes y después de la aplicación del ARNT HAM, fueron significativas ($p=0.05$).

En la tabla # 11 se muestran los niveles de IFN- γ obtenidos mediante la técnica indirecta de ELISA correspondiente a los sujetos del grupo III, constituido por 8 sujetos que presentaron diversos problemas de salud (tabla 6) y 2 testigos. Se encontró que 6 sujetos mostraron niveles de 2.1 a 5 U/ml de IFN- γ , antes de la aplicación del inductor, mientras que en uno no apreciamos ningún

Tabla 10. Determinación de IFN-gamma por la técnica de ELISA por inhibición (Grupo II)

Sujeto #	Muestra 1	Muestra 2	
1	12.5	2374.0	
2	81.2	462.5	
3	337.5	400.0	
4	206.2	462.5	
5	500.0	500.0	
6	187.5	625.0	
7	87.2	81.2	
8	109.3	143.8	
9	109.3	400.0	
10	300.0	250.0	
11	750.0	875.0	
12	925.0	212.5	
13	187.5	500.0	
14	80.0	400.0	
15	87.0	437.5	

significancia
estadística
p=0.05

Valor en U/ml

Tabla 11. Determinación de IFN-gamma
por la técnica de ELISA indirecta
(Grupo III)

Sujeto #	Muestra 1 (U/ml)	Muestra 2 (U/ml)
a	2.5	500
b	0	130
c	2.1	390
d	3.9	580
e	0	0
f	5.0	1600
g	14.0	1500
h	1.0	1000
i	0	
j	0	

p = 0.0007

cambio y en el sujeto restante el registro fue de 14 U/ml. En contraste, en los 8 sujetos aumentaron los niveles de IFN- γ , después de la aplicación del inductor.

Después de la administración del ARNT HAM, 7 pacientes mostraron un incremento en los niveles de IFN- γ (87.5%), apreciando que el valor mínimo encontrado fue de 130 U/ml y el máximo de 1600 U/ml. En un sujeto no se encontró ningún incremento. Aunque la muestra es pequeña, el análisis estadístico determinó una diferencia significativa ($p= 0.0007$) para los sujetos en los que se incrementó el nivel de IFN. Los resultados obtenidos en los dos testigos no mostraron ningún cambio.

Al igual que el estudio del IFN total, se determinaron los niveles de IFN- γ mediante ELISA por inhibición al sujeto testigo al que se le aplicó el ARNT HAM. Con este estudio, se observó una respuesta relacionada directamente con la aplicación del inductor. El nivel basal inicial fue de 6.8 U/ml incrementándose hasta 875 U/ml después de la primera aplicación del ARNT HAM; esto fue seguido por un descenso hasta 109 U/ml. Con la segunda aplicación del inductor, se observó un nuevo incremento hasta 875 U/ml con un descenso posterior a 110 unidades. Finalmente, con la tercera aplicación del inductor se encontró un nuevo incremento de los niveles de IFN- γ a 875 U/ml, obteniéndose en la muestra final un registro de 171 U/ml.

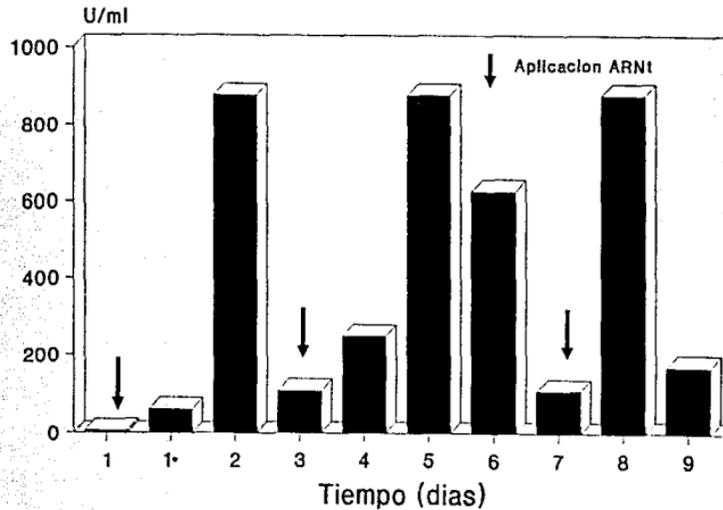
Al comparar los datos obtenidos mediante la técnica de IECP y a través del ELISA por inhibición para el sujeto testigo, se

observó una buena correlación entre ambas técnicas. Las diferencias en los valores encontrados, se pueden atribuir a las características propias de cada prueba, como son la sensibilidad y especificidad; ya que mientras en la ELISA medimos la cantidad de IFN- γ , en la IECP detectamos la actividad biológica de los tres tipos de IFN que pudieran estar presentes en la muestra biológica (gráficas 1 y 2).

Se realizó el análisis estadístico (ANOVA) entre los resultados obtenidos antes y después de la aplicación del inductor, con las dos técnicas, para el grupo II, existiendo diferencias significativas entre ellas ($p= 0.0001$).

Como prueba adicional se llevó a cabo la determinación del Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT- α), ya que se conoce que esta linfocina se encuentra muy relacionada con el IFN, en especial con el IFN- γ (77). Estas determinaciones se realizaron por una ELISA por inhibición, tanto en el sujeto testigo como en los 15 sujetos que forman el grupo II. El comportamiento que siguió en estos sujetos fue similar al observado para el IFN- γ (tabla #12). Así se observa, que los valores basales se encuentran entre 0 y 10.5 ug/ml. En la segunda muestra después de la aplicación del ARNT HAM, los niveles se encontraron en un intervalo que va de 2.25 a 10.5 ug/ml. Sólo 7 de los 15 sujetos mostraron incremento en los niveles iniciales (46%) y 8 no tuvieron ningún cambio. El análisis estadístico mostró que las diferencias encontradas, entre los valores obtenidos antes y después de la aplicación del inductor, son estadísticamente significativas ($p= 0.0191$).

Gráfica 2. Determinación de IFN-gamma por la técnica de ELISA por inhibición



** Registro a las 2 horas de la aplicación del inductor

Tabla 12. Determinación de FNT-alfa
por la técnica de ELISA por inhibición
(grupo II)

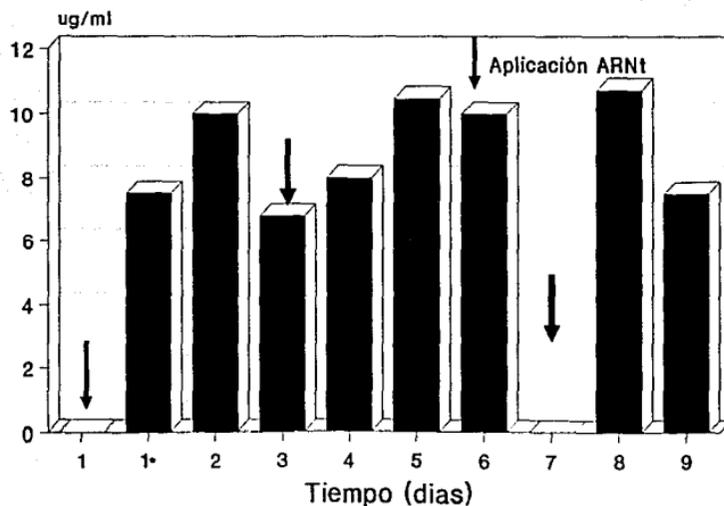
Sujeto #	Muestra 1 antes	Muestra 2 después	Muestra 3 5 días
1	0	7.0	ND
2	10.0	10.0	10.0
3	1.25	2.25	6.75
4	10.5	10.5	ND
5	10.0	10.0	ND
6	1.25	10.5	ND
7	0	10.5	ND
8	9.50	9.50	ND
9	6.75	6.75	ND
10	8.75	8.75	ND
11	10.0	10.0	ND
12	2.50	7.25	ND
13	0	7.50	10.0
14	0	7.00	ND
15	2.50	2.50	

(ug/ml) ND=no determinado Significancia estadística p= 0.0191

Los niveles del FNT- α en el sujeto testigo, mostraron un incremento en sus valores, los que estuvieron muy relacionados con la aplicación del inductor (gráfica # 3). Se encontró un valor basal antes de la aplicación del ARNt HAM de 0 $\mu\text{g/ml}$, el cual se incrementó hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ con la primera aplicación del inductor. Posteriormente, ocurrió una disminución hasta 6.75 $\mu\text{g/ml}$, y con la segunda aplicación del inductor, se logró producir un nuevo incremento hasta 10.5 $\mu\text{g/ml}$. Después de una tercera aplicación del ARNt HAM, se observó un nuevo incremento de 10.75 $\mu\text{g/ml}$, y este valor sufre un descenso hasta 7.5 $\mu\text{g/ml}$ en la muestra final.

La determinación de los niveles de anticuerpos se realizó en los 15 sujetos del grupo II, a quienes se midieron los niveles de IgG, IgA e IgM (tabla # 13). Se tienen 8 sujetos a los que se tomaron 3 muestras, 4 sujetos a quienes se tomó 4 muestras y 3 sujetos con 6 muestras. Con excepción de los sujetos 13 y 14 quienes mostraron niveles basales elevados de anticuerpos IgG, lo que se atribuyó a un proceso infeccioso que mostraron ambos casos, no se encontraron alteraciones en los niveles iniciales o en los posteriores a la aplicación del ARNt HAM. Al realizar el análisis estadístico de los datos encontrados, no existieron diferencias significativas en los niveles de inmunoglobulinas en los distintos tiempos de muestreo, al comparar con los niveles reportados en la literatura como normales en el humano.

Gráfica 3. Determinación de FNT-alfa por la técnica de ELISA por inhibición



•• Registro a las 2 horas de la aplicación del inductor

Determinación de Inmunoglobulinas (Grupo II)

IgG (mg/dl)

No. de muestra	Paciente 1	2	3	4	5	6	7	8
1	1213	1157	1600	1467	1128	1128	903	1467
2	1128	1157	1608	1439	1185	1128	931	1693
3	1185	1241	1608	1467	1100	1439	931	1495
4	1100			1495	1128	1269		
5				1411				
6				1382				
	Paciente 9	10	11	12	13	14	15	
1	1126	1269	1326	1467	2172	2475	1411	
2	1157	1269	1326	1467	2172	4444	1467	
3	1128	1184	1350	1128	1717	3838	1298	
4				1693	1717	2172		
5				1586		2222		

Tabla #13a

Determinación de Inmunoglobulinas (Grupo II)

IgA (mg/dl)

No. de muestra	Paciente 1	2	3	4	5	6	7	8
1	344	129	420	430	215	368	289	164
2	313	129	424	405	209	362	289	193
3	313	129	448	418	209	160	282	178
4	307			405	196	454		
5				350				
6				356				
	Paciente 9	10	11	12	13	14	15	
1	294	258	215	147	278	455	337	
2	295	264	215	147	283	394	356	
3	289	278	209	387	283	414	319	
4				178	167	455		
5				160		404		

Tabla # 13b

Determinación de Inmunoglobulinas (Grupo II)

IgM (mg/dl)

No. de muestra	Paciente 1	2	3	4	5	6	7	8
1	120	110	110	160	197	43	43	117
2	113	107	113	153	183	43	43	120
3	127	120	113	157	177	113	43	117
4	120			157	177	60		
5				130				
6				123				
	Paciente 9	10	11	12	13	14	15	
1	117	127	43	120	250	303	167	
2	120	133	40	110	253	222	170	
3	117	117	43	47	253	293	153	
4				147	262	354		
5				127		353		

Tabla # 13c

D I S C U S I O N

El IFN es una de las linfocinas cuyo estudio ha recibido gran atención por su participación en la inmunomodulación, así como por sus efectos en otros sistemas biológicos, como el neuroendócrino. Igual que otras moléculas de este grupo de mediadores solubles, el IFN y especialmente el IFN- γ es producido en pequeñas cantidades principalmente por los linfocitos activados. Los reportes sobre la concentración plasmática oscilan de <10 U/ml hasta 300 U/ml para el IFN total, en tanto que las concentraciones del IFN- γ se han reportado en nanogramos (76). Por otra parte, su determinación puede ser extremadamente difícil, ya que la variación en su concentración en las diferentes condiciones patológicas y la presencia de inhibidores naturales, pueden dificultar su detección. Por ello, se requiere que el estudio del IFN se realice mediante técnicas que muestren gran sensibilidad y especificidad.

En este trabajo se utilizó la técnica de IECP para la determinación del IFN total. Esta prueba permite detectar la actividad biológica del IFN mediante el estudio "in vitro" de su efecto antiviral empleando células susceptibles (HEp-2) a la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). La acción inhibitoria del efecto citopático por el IFN con este método, permite contar con una prueba cuantitativa al relacionar el grado de inhibición con una concentración conocida de IFN con lo que se logra detectar niveles tan bajos de IFN como 2 U/ml (78), al aplicar este tipo de estudio en diferentes muestras biológicas, como sería el sobrenadante de cultivos celulares, o en distintos

fluidos corporales procedentes del humano como plasma, suero, líquido amniótico, etc.

Con este método logramos determinar niveles de IFN total que van de 32 a 160 U/ml en el grupo I, y en el grupo II concentraciones que van de 10 a 320 U/ml antes de la aplicación del inductor y de 80 a 2,560 U/ml después de su administración.

La segunda técnica que utilizamos fue la de ELISA, la cual puede detectar hasta nanogramos y aún picogramos (74, 79) mediante ciertas modificaciones de la prueba, en la que se utilizan cofactores para las enzimas, sustratos fluorescentes, más de un anticuerpo monoclonal, etc. Este tipo de análisis se basa en la propiedad de las enzimas de poder ser marcadas con antígenos o anticuerpos en forma covalente, sin que el conjugado resultante pierda sus características de reactividad inmunológica o enzimática. En este trabajo se utilizaron dos variantes de la técnica de ELISA, observándose en ambas un cambio notable en el nivel de IFN- γ circulante después de la aplicación del ARNT HAM. Una de ellas fue un sistema de inhibición en la que se empleó un anticuerpo monoclonal para sensibilizar los pozos de la placa de ELISA e IFN- γ marcado con peroxidasa. Su realización permitió determinar concentraciones de IFN- γ en el plasma de los sujetos en intervalos que van de 12.5 a 925 U/ml antes de la aplicación del inductor, hasta más de 2,000 U/ml después de la estimulación con el ARNT HAM. En tres sujetos, sin embargo, encontramos que se da un descenso en los niveles basales después de la aplicación del

inductor, mientras que en uno de ellos no se observo ningún movimiento, esto lo podemos relacionar con un incremento en la captación por las células del IFN- γ circulante, mientras que en el sujeto que no responde podría ser debido a que no muestra sensibilidad al inductor utilizado.

La ELISA indirecta fue de más fácil realización, ya que la placa se sensibilizó directamente con el plasma y la concentración de IFN- γ se determinó con el anticuerpo monoclonal y un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa. Los límites de determinación de esta prueba fueron de 1 a 14 U/ml antes de la aplicación del inductor y de 130 a 1,600 U/ml después del empleo del inductor.

Con respecto al uso de inductores, tenemos que los primeros intentos por utilizar inductores de la producción de IFN se remontan al año de 1950, cuando surgieron diversos tipos de moléculas capaces de producir este efecto en estudios realizados *in vitro* y posteriormente *in vivo*. Algunas moléculas como el ARN viral, extractos bacterianos, etc, fueron útiles para favorecer la activación *in vitro* de linfocitos, macrófagos, fibroblastos, etc, y así incrementar la síntesis de IFN. En contraste, al realizar la aplicación *in vivo* en humanos, se encontraron diversos problemas, ya que algunos de estos inductores producían algunos efectos secundarios en el paciente, como toxicidad y trombocitopenia. Por otro lado, las moléculas utilizadas podían ser neutralizadas por el sistema inmunológico antes de disparar la producción del IFN. Entre los agentes que se han estudiado como inhibidores de esta linfocina

destacan los macrófagos, los cuales pueden fagocitar y degradar al inductor de IFN, así como las nucleasas celulares, que son inhibidoras naturales y las proteasas de los fluidos biológicos (80) que pueden suprimir la actividad biológica del inductor.

El ARNT HAM, que se empleó en el presente trabajo, es un producto de origen vegetal que se encuentra bloqueado en la zona activa (de transporte del aminoácido) y en la zona del anticodón, su estructura secundaria así como su masa molecular reúnen los requisitos fundamentales para poder promover la producción del IFN (81). Los resultados de este trabajo muestran que los niveles de IFN total e IFN- γ se elevaron en los sujetos como respuesta a la aplicación del inductor ARNT HAM de una manera estadísticamente significativa. La mayoría de los sujetos no solo mostraron un incremento de la actividad biológica del IFN, detectado mediante la prueba de IECP, sino que estos niveles permanecieron elevados en algunos de ellos incluso 5 días después de su aplicación. Paralelamente, la determinación de IFN- γ por ELISA nos mostró una elevación de esta linfocina en la mayoría de los sujetos.

Algunas de las ventajas que pueden obtenerse con el empleo del ARNT HAM, sobre los otros tipos de inductores de IFN actualmente en uso, son: A) que el estímulo se puede mantener por más tiempo ya que como se observa en los resultados, se logran niveles por arriba de los registrados antes de la aplicación del inductor hasta los 5 días, en comparación con los policarboxilatos y los polinucleótidos en los que se pierde el efecto a las 24 horas de su aplicación, lo que puede ser debido a diferentes

factores, como su estabilidad o a una mayor resistencia a la acción de las nucleasas.

B) Con respecto a las concentraciones utilizadas del ARNT HAM para lograr la inducción, encontramos que la aplicación es de aproximadamente 3.3 mg/Kg de peso de ARNT HAM (200 mg por aplicación), que es mucho menor respecto a la dosis de 8 a 16 mg/kg de los policarboxilatos y es más cercana a la de los polinucleótidos que va de 1 a 10 mg/Kg de peso, en donde el límite máximo es de 27 mg/kg, lo que da una producción de IFN de 2,000 a 10,000 U/ml. Sin embargo, en el caso de los policarboxilatos para obtener un incremento significativo en la síntesis de IFN se necesitan concentraciones de 100 a 1000 mg/kg lo cual limita su utilización en humanos por su toxicidad (66). Se puede considerar, por lo tanto, que las concentraciones utilizadas de ARNT HAM en este trabajo, se encuentran dentro de los límites de aplicación de los inductores en general, con la ventaja de que la mayoría de los sujetos responden a su aplicación.

C) Se observó que el ARNT HAM logró una inducción significativa de IFN total en todos los sujetos en contraste con los polinucleótidos, cuyo principal problema es la falta de uniformidad en la producción de IFN en los distintos sujetos a los que se aplica.

D) Otro dato relevante es que no se ha observado hasta ahora, que su aplicación muestre efectos tóxicos hacia el sujeto aún con su empleo repetido (69, 70, 71). Incluso, al evaluar la cinética de producción de IFN en un sujeto control, observamos que el aumento

en los niveles de IFN se mantiene por más tiempo con relación a lo reportado para otros tipos de inductores, ya que aunque su aplicación se realizó a las 72 horas y a las 96 horas, estos niveles no descendieron por abajo de los niveles encontrados antes de la administración del inductor. Esto sugiere que las características del ARNt HAM, hacen que esta molécula pueda ser una buena alternativa para estimular la producción de IFN.

E) Otro aspecto importante, es que en cada aplicación el sujeto responde con un nuevo incremento en los niveles de IFN total e IFN- γ sin perder la capacidad de respuesta ante un nuevo estímulo con el ARNt HAM, lo que contrasta con la pérdida de la producción de IFN que se reporta con el uso repetido de los polinucleótidos sintéticos. También es interesante que el incremento específico del IFN- γ con la aplicación del ARNt HAM, contrasta con el gran número de trabajos previos, que reportan que inductores como los polinucleótidos incrementan principalmente al IFN- α e IFN- β , requiriéndose de otro tipo de moléculas adicionales para lograr la producción del IFN- γ (83, 84).

F) Otra característica importante del ARNt HAM como inductor de IFN es que el incremento en la producción de esta linfocina ocurre en un tiempo menor con respecto al requerido por otros tipos de inductores. En el presente trabajo, detectamos un cambio en los niveles de IFN a partir de las primeras 2 horas posteriores a su aplicación, lo que comparado con las 8 ó 24 horas necesarias cuando se aplican los polinucleótidos, constituye una diferencia significativa (83).

En la investigación clínica debemos considerar que cada sujeto es único tanto en sus condiciones basales de producción de linfocinas, como en su respuesta al tratamiento con inductores que se aplique. En el caso de los sujetos ancianos estos no necesariamente pierden la capacidad de producir algunas linfocinas, como la IL-1, pero sí disminuye la capacidad de respuesta celular a los distintos tipos de estímulos de este tipo. Además, en algunos sujetos con enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, el IFN- γ puede tener un papel en la producción de daño tisular, ya que a este tipo de linfocina se le ha relacionado con los procesos inflamatorios localizados (85, 86), y se le ha implicado además en diversos procesos degenerativos y autoinmunes, así como en la respuesta contra afecciones tumorales (87, 88). Lo anterior podría explicar en parte, el porqué algunos sujetos con enfermedades crónicas degenerativas y/o edad avanzada muestran niveles elevados de esta linfocina antes de la aplicación del inductor, y lo cual puede constituir el motivo de otra investigación.

Los niveles elevados de IFN- γ que se encontraron en este estudio no implican necesariamente una mejor reacción de las células ante esta molécula, ya que se ha propuesto la posible existencia de dos tipos de receptores para los IFNs, que difieren en cuanto a su grado de afinidad y cuyo efecto biológico en la célula blanco puede depender de la concentración de esta linfocina (89). Así, se ha demostrado, una regulación negativa de los receptores al usar niveles elevados de IFN- γ en experimentos in

vitro, lo que puede impedir su internalización y la liberación en el medio. Esto nos puede ayudar también parcialmente a explicar los niveles altos de IFN- γ determinados por ELISA.

En nuestro estudio incluimos a pacientes muy diversos, como aquellos que presentaban enfermedades autoinmunes (LES) o recibían el tratamiento por profilaxis, a pesar de ello observamos que la mayoría respondieron a la aplicación del ARNt HAM independientemente del tipo de afección que presentaban.

El efecto de inducción observado con el ARNt HAM fue, muy claro, al determinar IFN total y mostró diferencias significativas también en la producción de IFN- γ , al apreciarse que la mayoría de los sujetos estudiados antes y después de la aplicación de este inductor de IFN, mostraron un incremento sustancial en comparación con la cifra basal.

La evaluación realizada por la IECP y ELISA nos permitió apreciar que la producción de IFN- γ fue similar a la producción de IFN total, al mostrar que a las 2 horas de la aplicación del inductor, ocurría un incremento de más del 100 % en algunos casos. La oportunidad de determinar el IFN natural mediante la IECP, que mide la actividad antiviral de los tres tipos de IFN, y del IFN- γ por la técnica específica de ELISA, nos puede abrir una nueva perspectiva de estudio, en cuanto a la producción de los IFN- α , - β y - γ favorecida por el ARNt HAM.

Como ya mencionamos pueden existir diferencias individuales en la producción de IFN, lo cual puede depender de su sensibilidad al inductor, sin embargo, también debe tomarse en cuenta que las

diferencias encontradas en la IECP y ELISA realizadas pueden depender de la diferente capacidad antiviral de los IFNs. De hecho, se ha reportado que los ácidos ribonucleicos, semejantes al ARNT HAM, permiten inducir la producción del IFN- α el cual puede mostrar un mayor efecto antiviral contra el VSV al compararlo con el IFN- γ (90), si bien otros trabajos indican lo contrario (84). Por lo tanto, en nuestra prueba de IECP el IFN- α podría producir un mayor efecto de protección en las células HEP-2 que el IFN- γ , y así explicar la falta de una mejor correlación entre los niveles de IFN total y los valores de IFN- γ .

Por otra parte, al igual que en la actividad del IFN, las personas de edad avanzada pueden presentar un decremento de la población de linfocitos T circulantes, así como de síntesis de IL-2 e IL-1, en cambio la población CD8 se eleva con respecto a la población CD4. Se conoce por lo tanto que se da un descenso en poblaciones importantes para la producción del IFN, por lo cual se esperaría una disminución en la producción de esta linfocina, lo cual no ocurrió, aún después de la aplicación del inductor. Independientemente, claro está, de los niveles elevados que son producto del padecimiento que muestre el sujeto.

Los tres tipos de IFN pierden actividad rápidamente con la temperatura y por la acción de las proteasas del plasma; en particular el IFN- γ es más lábil a la degradación por estos factores. Esto puede haber afectado su capacidad antiviral contra el VSV en la IECP. En la técnica de ELISA, es posible que la utilización de anticuerpos monoclonales contra el IFN- γ puedan

reconocer una porción de la molécula no necesariamente implicada con su capacidad antiviral, y que por lo tanto su detección difiera de su actividad biológica.

Aunque el principal objetivo de este estudio fue determinar la concentración del IFN presente en el plasma, se obtuvieron otros datos de interés. Uno de ellos fue la correlación del IFN con el FNT- α (36, 37); otro fue la evaluación de los niveles de inmunoglobulinas. Se observó, por una parte, que después de la aplicación del ARNt HAM ocurría de manera similar un incremento del IFN y del FNT- α . El FNT- α tiene múltiples efectos biológicos, especialmente en el sistema inmune y puede actuar como un agente antitumoral o como un factor mitogénico activando el crecimiento de distintos tipos celulares (91), pero además, puede incrementar los niveles de los distintos tipos de IFN (92), por lo que el ARNt HAM al activar la producción del IFN podría consecuentemente provocar la elevación del FNT- α .

Con respecto a los linfocitos B, se sabe que en presencia de IFN, se preserva la capacidad de reconocimiento del antígeno por estos, pero se pierde su capacidad de producción de anticuerpos (94). En general, en los sujetos estudiados en el presente trabajo en cuanto a la respuesta humoral, no encontramos ninguna modificación en los niveles de inmunoglobulinas séricas, de los tres tipos medidos IgG, IgA e IgM. Con respecto al sexo de los sujetos de estudio, no se encontró que existan diferencias significativas al comparar entre el sexo y los niveles de IFN, si bien es cierto, que la mayoría de

los sujetos corresponden al sexo femenino, tanto en el grupo experimental II como en el grupo control I, los niveles de IFN se mantienen bastante homogéneos.

Se debe considerar, sin embargo, que la falta de cambio puede deberse a que en una respuesta primaria ante un estímulo antigénico, la producción de anticuerpos tarda de 6 a 7 días y la respuesta secundaria aparece de 3 a 5 días después, por lo que se pueden considerar que los datos obtenidos a partir de los 5 días podrían haber mostrado diferencias significativas en la producción de anticuerpos (93), y en particular las muestras tomadas a los 14, 21 y 28 días después de la aplicación del ARNT HAM. Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas, por lo que al conocer que se da la producción de IFN y conociendo el efecto que este puede ejercer sobre la producción y características de los anticuerpos, se puede proponer un posible papel del IFN producido como supresor de la respuesta de anticuerpos *de novo* hacia la terapia celular.

Como ya se mencionó, un aspecto importante de esta investigación es relacionar la posible presencia del IFN y su papel como promotor del fenómeno de tolerancia inmunológica, observado en los trabajos ya mencionados (67, 68, 69, 70 y 71) y relacionándolo principalmente en este caso con su efecto sobre la producción de anticuerpos. De acuerdo, con los resultados obtenidos y observar incrementos en los niveles de IFN total, IFN- γ , FNT- α y al no encontrar diferencias significativas en los niveles de

inmunoglobulinas, se puede proponer una posible participación de estos factores en el desarrollo de la tolerancia inmunológica.

Queda por definir si el empleo del ARNT HAM, y la consecuente modificación en los niveles de IFN pueden tener otros niveles de acción en la regulación inmune, ya que el IFN puede incrementar los niveles de AMPC, y su efecto como segundo mensajero puede actuar a nivel de los basófilos impidiendo la liberación de histamina, las respuestas inmunes mediadas por células están reprimidas con el aumento en la concentración de AMPC, incrementa además el número de linfocitos T supresores (95), también puede modificar los niveles de prostaglandinas y así bloquear la producción de IL-2, mediante el aumento en AMPC e inhibiendo la vía de los fosfoinosítidos.

Estos aspectos mencionados pueden ser algunos de los que formen parte del fenómeno de la tolerancia inmunológica observada indirectamente en los diferentes sujetos que han recibido el tratamiento.

C O N C L U S I O N E S

1 - El ARnt HAM es un inductor de la síntesis de IFN, que además de promover la producción de IFN, con su utilización se incrementan los niveles plasmáticos de otras linfoquinas como el FNT- α .

2 - El ARnt HAM no ha mostrado hasta la fecha efectos secundarios a la concentración empleada.

3 - La producción de inmunoglobulinas no se modificó usando nuestro esquema de aplicación del ARnt HAM, con el que se obtuvo un incremento significativo en los niveles de IFN.

4 - El aumento en los niveles de IFN, FNT- α y la constancia en la concentración de inmunoglobulinas en el plasma parecen indicar la manifestación de la tolerancia inmunológica con la aplicación del ARnt HAM.

5 - La inducción in vivo del IFN puede tener un papel importante en la regulación inmune, cuyo estudio deberá profundizarse particularmente, en los individuos a los que se aplica conjuntamente la terapia celular.

6 - Las técnicas de IECP y ELISA son muy útiles para la determinación de los distintos niveles de IFN total e IFN-r en plasma.

APENDICE 1

Las líneas celulares empleadas en el presente trabajo fueron donadas por el Dr. Erasmo Martínez Cordero, Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Línea celular VERO (96). Es una línea heteroploide derivada de riñón de mono verde normal africano Cercopithecus aethiops. El cual se usa en estudios de duplicación de virus y ensayos de placas.

Línea celular HEP-2 (96). Esta línea fue obtenida en 1952, de tumores producidos en ratas irradiadas y tratadas con cortisona, a las cuales se les inyectó tejido de carcinoma epidermoide proveniente de la laringe de un hombre de 56 años.

Línea celular L-929 (96). Se obtuvo en marzo de 1948, es una de las primeras líneas celulares establecidas en cultivos continuos, derivada de la cepa L que se obtiene de tejido normal subcutáneo areolar y adiposo de un ratón macho de 100 días. La clona L-929 es derivada del subcultivo 95 de la cepa original.

Virus de la estomatitis vesicular (VSV) (97). Del género Vesiculovirus; familia o subfamilia Rhabdoviridae.

Este virus fue proporcionado por Carlos Castellanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El virus es propagado principalmente en la línea celular VERO, sin embargo, también se puede propagar en las células L-929, y se conserva en congelación a - 70 °C.

Esta familia incluye virus que infectan a células animales y vegetales. Los que se encuentran en animales presentan forma de bala, redondeados en los extremos, los viriones varían en dimensiones, de 130-380 x 50-95 nm. Son inestables a pH abajo de 4, a la temperatura de 56 °C y a la presencia del éter. La nucleocápside contiene ARN de cadena sencilla, en una hélice de proteína y una ARN-polimerasa, tiene una envoltura rica en lípidos con gran cantidad de glicoproteínas. Su efecto citopático es de destrucción celular, generalmente rápido, en donde la policariocitosis ha sido descrita.

APENDICE 2

Técnica de Avrameas. Conjugación de proteínas con peroxidasa 1968.

Material:

- 1- IgG de conejo, o el anticuerpo que se desea conjugar.
- 2- Peroxidasa de rábano.
- 3- Solución acuosa de glutaraldehído al 25%.
- 4- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH=6.8
- 5- PBS.

Método:

- 1- Mezclar 10 mg de peroxidasa en 0.2 ml de glutaraldehído 1.25 % en PBS pH= 7.2 a temperatura ambiente, con agitación suave durante toda la noche. Diluir la mezcla a 1 ml con PBS pH= 7.2
- 2- Dializar contra buffer de carbonatos 0.1 M pH= 9.2, 2 cambios de 1 litro cada 4 horas.
- 3- Se retira la bolsa de diálisis del buffer de carbonatos y 100 000 UT de IFN- γ se colocan en 250 ul de buffer carbonatos 0.1 M pH=9.2 a temperatura ambiente con agitación suave toda la noche.
- 4- Bloquear los grupos reactivos libres con 0.1 ml de lisina 0.2 M. Dializar contra PBS toda la noche, centrifugar y eliminar el precipitado. Concentrar.

MEDIOS Y SOLUCIONES

+ Medio de cultivo

850 ml de H₂O desionizada.

26 ml de bicarbonato de sodio (7.5%)

10 ml de antibiótico (SIGMA, Co.)

10 ml de aminoácidos no esenciales (GIBCO, Co).

10.3 gr de medio de cultivo RPMI (SIGMA, Co.).

Al terminar la mezcla de los ingredientes se filtra con ayuda de un equipo de filtración millipore estéril con membrana de 0.22 μ m y se adicionan 100 ml de suero fetal bovino para tener el RPMI-10.

+ PBS (solución amortiguadora de fosfato-salina)

Se utilizan 2 soluciones:

Solución a- 0.2 m

NaH₂PO₄·H₂O ----- 27.6 g/lt P.M 138 g/mol.

Solución B- 0.2 M

Na₂HPO₄ (anhidro) ---- 28.4 g/lt P.M 142 g/mol

Se mezclan 165 ml de la solución A + 335 ml de la solución B + 74 gr de NaCl, y se afora a 1 lt, con esto tenemos: PBS 0.1 M (10 x)

Para tener PBS 0.01 M se realiza una dilución de 1:10 y se ajusta al pH a 7.2

+ Medio de cultivo con metilcelulosa al 2%

A 90 ml de RPMI se le adicionan 2 gr de metilcelulosa (SIGMA,Co.) se filtra con membrana 0.22 μm y posteriormente se agregan 10 ml de suero fetal bovino.

+ Solución colorante de cristal violeta (Merck,Co).

Se prepara agregando 0.05 gr del colorante a 10 ml de metanol al 70% con agua destilada.

+ Solución tripsina

Tripsina (SIGMA,Co.) 0.5 gr

EDTA tetrasódico (Baker).....0.2 gr

Se adicionan a 1 litro de solución salina o de PBS y se filtra con membrana 0.22 μm , de esta solución se agregan 300 μl a cada botella de cultivo de 50 ml durante 3-5 min, y se adicionan 4 ml de RPMI-10, se recolectan todas las células despegadas y se centrifuga para lavar el exceso de tripsina, se resuspende el botón celular obtenido en 1 ml de medio y se realiza el conteo celular con una cámara de Neubauer.

+ Solución amortiguadora de carbonatos (pH= 9.6; 0.05 M)

Na_2CO_3 1.59 gr

NaHCO_3 ... 2.93 gr

Se afora a 1 lt con H₂O destilada, ajustando el pH antes de terminar de aforar.

+ ASB-PBS al 1%

A 100 ml de PBS pH= 7.2 se agrega un gramo de ASB (SIGMA,Co.), se mezcla suavemente hasta que se disuelva completamente y se congela a -20 °C.

+ PBS-T al 0.1 % y al 0.5 %

Tween 20 (SIGMA,Co.) 0.1 ml

0.5 ml

Se toma la cantidad de Tween 20 de acuerdo a la concentración que se desea y se adiciona a 100 ml de PBS, se mezcla perfectamente.

+ Amortiguador de citratos (pH=5)

Acido cítrico 0.1 M 24.3 ml

Na₂HPO₄ 0.2 M 25.7

Agua destilada .. 50 ml.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Issacs, A., Lindenmann, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond (Biol). 259: 67
- 2.- Stewart II, WE. 1980. Interferon nomenclature. Eur J Immunol. 10: 660-662
- 3.- Balkwill, FR. 1989. Interferons. In: Cytokines in cancer therapy. Oxford: Oxford University Press. 1-22
- 4.- Van Damme, J., De Ley, M., Cleays, H., Billiau, VC., de Some, P. 1981. Interferon induced in human leukocytes by concanavalin A: Isolation and characterization of α - and β -type components. Eur J Immunol. 11: 937-942
- 5.- Trent, JM., Olson, S., Lawn, RM. 1982. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA. 79: 7809-7813
- 6.- Yip, YK., BS, Barrowclough., Urban, C., Vilcek, J. 1982 Purification of two subspecies of human gamma (immune) interferon. Proc Natl Acad Sci USA. 79: 1820-1824
- 7.- De Ley, M., Van Damme, J., Claeys, H., Weening, H., Heine, JW., Billiau, A., Vermylen, C., De Somer, P. 1980. Interferon induced in human leukocytes by mitogens: production, partial purification and characterization. Eur J Immunol. 10: 877
- 8.- Balkwill, FR. 1989. Interferons. Lancet. 1060-1063
- 9.- Branca, AA., Baglioni, C. 1981. Evidence that types I and II interferons have different receptors. Nature. 294: 768-770

10- Chancy, C., Vignal, M., Coulin, P., Cong, N., Boue, J., Boue A. 1975. Chromosomal localization of human genes governing the interferon-induced antiviral state. Proc Natl Acad Sci USA.

72: 3129-3133

11- Langer, AJ., Pestka, S. 1988. Interferon receptors. Immunol Today. 9: 393-400

12- Garotta, G., Ozmen, L., Fountoulakis, M., Dembic, Zlatko., Adolphus P.G.M. van Loon., Stuber, D. 1990. Human interferon- γ receptor. J Biol Chem. 265: 6908-6915

13- Anderson, P., Ticko, B., Maxfield, F., Vilcek, J. 1982. Specific binding of 125 I-Human interferon- γ to high affinity receptors on human fibroblasts. J Biol Chem. 257: 11303

14.- Hannigan, GE., Fish, EN., Williams, BRG. 1984. Modulation of human interferon alpha receptor expression by human interferon gamma. J Biol Chem. 259: 8084-8086

15.- Finbloom, SD. 1990. The interferon- γ receptor on human monocytes, monocyte-like cell lines and polymorphonuclear leukocytes. Biol Soc Trans. 18: 222-224

16.- López, S.P. 1984. Mecanismo de acción antiviral del interferón. Interferón y Biotecnología. 1: 1-15

17.- Weil, J., Epstein, CJ., Epstein, LB., Sedmak, JJ., Sabram, JL., Grossberg, SE. 1983. A unique set of polypeptides is induced by gamma interferon in addition to those in common with alpha and beta interferon. Nature. 301: 437-439

18.- Clemens, JM., McNurlan, AM. 1985. Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. Biochem J. 226: 345-360

19.- Balkwill, FR., Burke, F. 1989. The cytokine network. Immunol Today. 10: 299-304

20.- Smith, ME., Blalock, JE. 1981. Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: Association with leukocyte interferon. Proc Natl Acad Sci USA. 78: 7530-7534

21.- Blalock, JE., Smith, ME. 1981. Human leukocyte interferon (HuIFN- α): potent endorphin like opioid activity. Biochem Biophys Res Commun. 101: 472-478

22.- Trinchieri, G., Perussia, B. 1985. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. Immunol Today. 6: 131:136

23.- Rubin, BY., Gupta, LS. 1980. Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents. Proc Natl Acad Sci USA. 77: 5928-5932

24.- Bloom, SB. 1980. Interferon and the immune system. Nature. 284: 593-595

25.- Schreiber, RD., Celada, A. 1985. Molecular characterization of gamma interferon as a macrophage activating factor. Lymphokines. 11: 87-118

26.- Siegel, PJ. 1988. Effects of interferon- γ on the activation of human T lymphocytes. Cell Immunol. 111: 461-472

27.- Sierra, G.G.V. 1985. Relación de los interferones con algunos aspectos esenciales de la respuesta inmune. Interferon y Biotecnología. 2: 163-192

28.- Rosa, F., Fellous, M. 1984. The effect of gamma-interferon on MHC antigens. Immunol Today. 5: 261-262

29.- Guyre, MP., Morganelli, MP., Miller, R. 1983. Recombinant immune interferon increases immunoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. J Clin Invest. 72: 393-397

30.- Reynolds, SD., Boom, HW., Abbas, KA., 1987. Inhibition of B lymphocyte activation by interferon- γ . J Immunol. 139: 767-773

31.- Morikawa, K., Kubagawa, H., Suzuki, T., Cooper, DM. 1987. Recombinant interferon- α , - β and - γ enhance the proliferative response of human B cells. J Immunol. 139: 761-766.

32.-De Mayer, E., De Mayer-Guignard, J. 1988. Interferons and other regulatory cytokines. John Willey and Sons. Boston. 238-242

33.- Natagawa, T., Hirano, T., Nakagawa, N. 1985. Effect of recombinant IL-2 and γ -IFN on proliferation and differentiation of human B cells. J Immunol. 134: 959-966

34.- Brodeur, BR., Merigan, TC. 1974. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. J Immunol. 113: 1319-1325

35.- Dijkmans, R., Billiau, A. 1988. Interferon γ : a master key in the immune system. C. O. Immunology. 1: 269-274

36.- Reem, GH. 1984. Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. Science. 225: 429-431

37.- Tsujimoto, M., Feinman, R., Vilcek, J. 1986. Differential effects of type I IFN and IFN- γ on the binding of tumor necrosis factor to receptors in two human cell lines. J Immunol. 137: 2272-2276

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

38.- Baron, S., Tying, KS., Fleischmann, RW. 1991. The interferons: mechanisms of action and clinical applications. JAMA 266: 1375-1383

39.- Zoumbos, CN., Gascon, P., Djeu, YJ., Young, SN. 1985. Interferon is a mediator of hematopoietic suppression in aplastic anemia in vitro and possibly in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 82: 188-192

40.- Cannon, EW., Emkey, RD., Denes, A., et. al. 1990. Prospective two-year followup of recombinant interferon gamma in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 17: 304-310

41.- Feldman, M., Eisenbach, L. 1989. ¿Por qué es metastásica la célula tumoral? Inv. Cien. 148: 24-32

42.- Clemens, M. 1985. Interferons and oncogenes. Nature. 313: 531-532

43.- Braun, W., Levy, BH. 1972. Interferon preparations as modifiers of immune responses. Proc Exp Biol Med. 141: 769-773

44.- Lebon, P., Girard, S., Thépot, F., Chany, C. 1982. The presence of alpha-interferon in human amniotic fluid. J Gen Virol. 59: 393-396

45.- Mobraaten, LE., de Maeyer, E., De Maeyer-Guignard, J. 1973. Prolongation of allograft survival in mice by inducers of interferon. Transplantation. 16: 415-420

46.- Bellanti, J. A. 1986. Inmunología. Interamericana, México 209-218.

47.- Hicks, GJJ., Diaz, ZJC. 1988. Bioquímica e Inmunología II. Facultad de Medicina. UNAM. México 569 p.p.

48.- Stites, PD., Stobo, DJ., Wells, VJ. 1988. Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno. México. 756 p.p.

49.- Johnson, MH., Baron, S. 1976. The nature of the suppressive effect of interferon and interferon inducers on the in vitro immune response. *Cell Immunol.* 25: 106-115.

50.- Gisler, RH., Lindahl, P., Gressner, I. 1974. Effects of interferon on antibody synthesis in vitro. *J Immunol.* 113: 438-444.

51.- Brodeur, BR., Merigan, TC. 1974. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. *J Immunol.* 113: 1319-1325.

52.- Johnson, HM., Blalock, JE. 1980. Interferon immunosuppression mediation by suppressor factor. *Infect Immunol.* 29: 301-305.

53.- Snapper, CM., Paul, WE. 1987. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.* 236: 944-947.

54.- Sollid, LM., Kvale, D., Brandtzaeg, P., Markussen, G., Thorsby, M. 1987. Interferon γ enhances expression of secretory component, the epithelial receptor or polymeric immunoglobulins. *J Immunol.* 138: 4303-4306.

55.- Skurkovich, SV., Klinova, EG., Alexandrovska, MI., Levina, MI., Arkhipova, N. V., Bulicheva, IT. 1973. Stimulation of transplantation immunity and plasma cell reaction by interferon in mice. *Immunology* 25: 317-322.

56.- Sonnenfeld, G. 1980. Modulation of immunity by interferon. *Lymph Rep.* 1: 113-131.

57.- Hovanessian, GA., Galabru, J., Riviere, Y., Montagnier, L. 1988. Efficiency of poly(A).poly (U) as an adjuvant. Immunol Today. 9: 161-162.

58.- Torrence, FP., De Clercq, E. 1981. Interferon inducers: general survey and classification. En: Methods in Enzymology. Acad. Press. 78: 291-299.

59.- Vladimir, L., Borecky, L., Sikl, D., Masler, L., Bauer, S. 1970. Stimulation of interferon production by Mannans. Proc Soc Exp Biol Med. 134: 874-879.

60.- Billiau, A., Schonke, E. 1970. Induction of the interferon mechanism by natural RNA. Life Sci. 9: 69-78.

61.- Merigan, TC. 1970. Interferon stimulated by double stranded RNA. Nature. 228: 219-222.

62.- Levy, HB., Law, WLL., Rabson, SA. 1969. Inhibition of tumor growth by polyinosinic-polycytidylic acid. Proc Natl Acad Sci USA. 62: 357-361.

63.- Youn, JK., Kim, BS., Min, JS., Lee, KS., et. al. 1990. Adjuvant treatment of operable stomach cancer with polyadenylic-polyuridylic acid in addition to chemotherapeutic agents: a preliminary report. Int J Immunopharmacol. 12: 289-295.

64.- Field, AK., Young, WCh., Krakoff, MI., Tytell, AA., Lampson, PG. 1971. Induction of interferon in human subjects by Poly I:C. Proc Soc Exp Biol Med. 136: 1180-1186.

65.- Dubuy, GH., Jhonson, ML., Buckler, EC., Baron, S. 1970. Relationship between dose size and dose interval of polyinosinic-polycytidylic acid and interferon hyporesponsiveness in mice. Proc Soc Exp Biol Med. 135: 340-344.

66.- De Clercq, E. 1981. Interferon induction by polynucleotides, modified polynucleotides, and polycarboxylates. Methods in Enzymology. Acad. Press. 78: 227-236.

67.- Alcázar Montenegro, H. 1986. Maximización de la productividad. Criador. 3(VI): 36-41

68.- Alcázar Montenegro, H. 1988. Historia de una Investigación Biológica. Elarteh. México. 128

69.- Alcázar, MH., Alcázar, LS. 1988. Implante de hipófisis en pacientes hipofisectomizados. Inv Med Int. 15(3): 135-139

70.- Alcázar, MH., Alcázar, LS. 1988. Necrosis isquémica de cabezas femorales tratada con implantes heterólogo y heterotópico de hipófisis y médula ósea de porcino lactante. Comp Inv Lat Am. 8(2): 39-42

71.- Alcázar, MH., Alcázar, LS. 1989. Incógnitas que plantea el implante heterólogo y heterotópico de hipófisis porcina en humanos. Inv Med Int. 16(1): 32-35

72.- Rubinstein, S., Familletti, CP., Pestka, S. 1981. Convenient assay for interferons. J Virol. 37: 755-758.

73.- Goorha, MR. 1981. Preparation and assay of vesicular stomatitis virus. Methods in Enzymology. Acad. Press. 78: 309-312.

74.- Voller, A. 1976. Manual Clinical Immunology. Rose N. and Friedman. USA. 506.

75.- Forti, LR., Schuffman, SA., Davies, AH., Mitchell, MW. 1986. Objective antiviral assay of the interferons by computer assisted data collection and analysis. Methods in Enzymology. Acad. Press. 119: 533-540.

76.- Bocci, V. 1985. The physiological interferon response. *Immunol Today*. 6: 7-9.

77.- Jasmin, C. Tratamiento biológico de los cánceres. *Mundo Científico*. 7 (72): 818-828.

78.- Lebon, P., Daffos, F., Checoury, A., Grangeot-keros, L., Forestier, F., Toublanc, JE. 1985. Presence of an acid-labile alpha-interferon in sera from fetuses and children with congenital rubella. *J Clin Microbiol*. 21: 775-778.

79.- Voller, A., Bidwell, ED., Bartlett. A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe. Borough House. 125 pp.

80.- Merigan, CT., De Clercq, E., Bausek, HG. 1970. Nonviral interferon inducers. En *interferon: Proceedings of a symposium sponsored by the New York Heart Association*. Little, Brown and Company. Boston. 57-75.

81.- Torrence, FP. 1981. Preparation of a synthetic polynucleotide interferon inducer. *Methods in Enzymology*. Acad Press. 78: 326-331.

82.- Levy, BH. 1981. Induction of interferon in vivo and in vitro by polynucleotides and derivatives, and preparation of derivatives. *Methods in Enzymology*. Acad Press. 78: 242-251.

83.- Reis, R., Lubniecki, SA., Olson, A R. 1984. Enhanced production of human γ -interferon in nylon column fractionated cell cultures. *J Immunol*. 133: 758-763.

84.- Wietzerbin, J., Falcoff, R. 1986. Caracterización del interferón gamma humano radiomarcado por biosíntesis. *Interferón y Biotecnología*. 3: 21-29.

85.- Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., Carton, H. 1988. Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN- γ . J Immunol. 140: 1506-1510.

86.- Skoglund, C., Scheynius, A., Holmdahl, R., Van der Meide, PH. 1988. Enhancement of DTH reaction and inhibition of the expression of class II transplantation antigens by in vivo treatment with antibodies against γ -interferon. Clin Exp Immunol. 71: 428-432.

87.- Balkwill, RF., Smyth, JF. 1988. Reevaluación de los interferones en el tratamiento del cáncer. Lancet (ed. esp.) 12: 199-201.

88.- Brown, RR., Ozaki, Y., Oatta, SP., Borden, EC., Sondel, PM., Malone, DG. 1991. Implications of interferon-induced tryptophan catabolism in cancer, autoimmune diseases and AIDS. Adv Exp Med Bio. 294: 425-435.

89.- Orchansky, P., Rubinstein, M., Fischer, GD. 1986. The interferon gamma receptor in human monocytes is different from the one in nonhematopoietic cells. J Immunol. 136: 169-173.

90.- De Mayer, E. 1984. The interferon system and the immune system. In Interferon and the Immune System. Ed J Vilcek, E. De Mayer Amsterdam: Elsevier, 1-6

91.- Weigent, AD., Stanton, JG., Johnson, MH. 1983. Recombinant gamma interferon enhances natural killer cell activity similar to natural gamma interferon. Biochem Biophys Res Commun. 111: 525-529.

92.- Brinckerhoff, EC., Guyre, MP. 1985. Increased proliferation of human synovial fibroblasts treated with recombinant immune interferon. J Immunol. 134: 3142-3146.

93.- Roitt, I. 1991. Essential Immunology. 7 Edición. Blackwell Scientific Publications. Boston. 350

94.- Weigle, OW. 1989. Effects of aging on the immune system. Hosp Pract. 15: 112-119.

95.- Kammer, MG. 1988. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase. A pathway and regulation of the immune response. Immunol Today. 9: 222-229.

96.- Rowson, KEK., Rees, TAL., Mahy, BWJ. 1981. A Dictionary of Virology. Blackwell Scientific Publications. Boston. 230

97.- Fraenkel-Conrat, H. 1985. The viruses. Catalogue, characterization and Classification. Plenum Press. Inc. Florida. 154.