

# IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL EXTRACTO DIALIZABLE LEUCOCITARIO DE IMPACTO EN LA TERAPÉUTICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS E INFLAMATORIAS

Celia Fernández Ortega,<sup>1</sup> Manuel de J Araña,<sup>1</sup> Miriam Ojeda,<sup>1</sup> Marta Dubet,<sup>2</sup> Ignacio Ruibal,<sup>2</sup> Olga L Vilarubia,<sup>2</sup> Juan C Menéndez de San Pedro<sup>2</sup> y Lourdes Navea<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, apartado postal 6996, La Habana, Cuba.  
<sup>2</sup>Laboratorio Nacional de Referencia del SIDA, La Habana, Cuba.

## Introducción

En los últimos años, la inmunoestimulación no específica ha progresado desde el empleo de mezclas microbianas crudas y extractos hasta estrategias más sofisticadas que utilizan una larga colección de compuestos farmacológicamente activos. El factor de transferencia (FT) es una preparación con demostrados efectos sobre el sistema inmune. Es un material dializable de bajo peso molecular no inmunogénico, obtenido de leucocitos humanos de sangre periférica, que posee la capacidad de transferir inmunidad mediada por células (1). A pesar del empleo indistinto de los términos FT y EDL, el FT define realmente a los componentes del EDL que median respuestas T de naturaleza antígeno específica (2). Esta fracción contiene múltiples factores que parecen corresponder a la sumatoria de la experiencia inmune de un individuo particular.

El EDL ha sido ampliamente utilizado en la práctica clínica. Sin embargo, los mecanismos de acción farmacológica descritos respaldan sólo parcialmente algunas de las respuestas terapéuticas observadas, especialmente, cuando su uso está dirigido a entidades en las que desempeñan un papel patológico mecanismos que no son corregibles con la potenciación de la respuesta inmune afectada solamente. Este trabajo recoge la descripción de dos nuevas actividades biológicas del extracto dializable leucocitario (EDL): la inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) por leucocitos humanos activados y la inhibición de la replicación del VIH. Estos efectos del EDL tienen particular relevancia por su repercusión terapéutica y su valor analítico.

## Resultados y Discusión

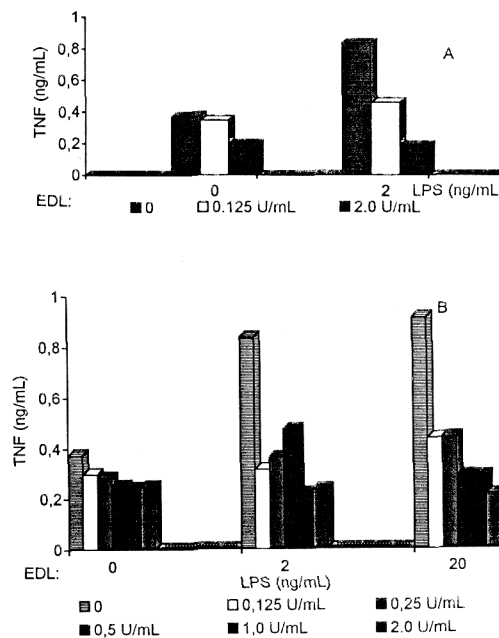
### Inhibición de la producción del TNF

La producción descontrolada o la superproducción de citocinas constituye un mecanismo patogénico fundamental en respuestas inflamatorias sistémicas desencadenadas por el LPS de bacterias Gram negativas. Eventos tempranos asociados con respuestas

perjudiciales a la endotoxina son atribuidos a una secreción descontrolada de TNF por monocitos y macrófagos activados, así como por otras células. Los monocitos humanos son extremadamente sensibles al LPS y niveles tan bajos como 10 pg/mL pueden inducir rápidamente la síntesis de citocinas inflamatorias como TNF $\alpha$  e interleuquina 1 $\beta$  (3).

Demostramos en nuestro estudio que el EDL no afecta la citotoxicidad mediada por TNF, pero sí reduce significativamente la secreción estimulada por LPS de la proteína biológicamente activa. El efecto inhibitorio del EDL se observó tanto en cultivos de células monocíticas aisladas, como en experimentos con sangre total (Figura 1).

El extracto de leucocitos fue capaz de disminuir los niveles de TNF secretados y cuantificados al transcurrir un período de 5,5 h después de iniciada la inducción con LPS en dosis elevadas. La inhibición provocada por el EDL en ausencia de proteínas



1. Lawrence HS. *Adv Immunol* 1969;11: 195-266.
2. Fudenberg MH, Fudenberg MH. (1989) 557-626. En: *Res. & Applic. Transfer Factor and DLE*. Baolai, H. Ed. Xue Yuan Press, Beijing, China.
3. Zhong WW, Burke PA, Mand AT, Walsh MJ, Hughes LA, Forse RA. Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *Arch Surg* 1993;128:158-164.

Figura 1. Efecto inhibitorio del EDL en la liberación de TNF inducida por LPS en sangre humana total. A) 500  $\mu$ l de sangre total se trataron simultáneamente con LPS (2 ng/mL) y dos concentraciones de EDL (0,125 y 2 U/mL) o B) se estimuló con LPS (2 y 20 ng/mL) 2 h después del tratamiento con diversas dosis de EDL (0,125-2 U/mL). Fueron también incluidos controles de inducción máxima (sólo LPS) y de inducción basal (ausencia de LPS). Los sobrenadantes se colectaron a las 4 h y se cuantificó en ellos TNF utilizando un ELISA específico. El resultado mostrado es representativo de 6 experimentos diferentes usando sangre de voluntarios sanos. Los niveles de producción de TNF en presencia de LPS y polimixín B (25  $\mu$ g/mL) fueron de 375 pg/mL y 398 pg/mL en A y B, respectivamente (control positivo de inhibición).

séricas no fue revertida por la presencia de concentraciones más elevadas de LPS. Por consiguiente, la secreción disminuida de TNF mediada por EDL no parece ser dependiente de moléculas competidoras con el LPS por sitios de reconocimiento específico sobre la superficie celular. Es ampliamente aceptado que la activación de leucocitos mediada por LPS ocurre principalmente como resultado de la interacción de un complejo formado por la endotoxina y la proteína LBP (o el LPS acomplejado a otras proteínas) con la molécula de superficie CD14, que se expresa en monocitos, macrófagos (4) y leucocitos polimorfonucleares (3, 5). Mientras que esta vía dependiente de CD14 es predominante a bajas concentraciones de LPS, en presencia de concentraciones elevadas de LPS y en ausencia de proteínas séricas accesorias, parece predominar una vía independiente de CD14 (6). En nuestros experimentos, realizados en ausencia de suero, es probable que la activación ocurra primariamente a través del segundo mecanismo, aunque no deben descartarse eventos menores de estimulación a través de la interacción directa entre CD14 y el LPS o, inclusive, la presencia de cantidades residuales de proteínas séricas accesorias absorbidas. De esta manera, nuestras observaciones relacionadas con una inhibición significativa en condiciones de ausencia de suero, no parece involucrar mecanismos mediados por LBP, septinas o la molécula CD14 soluble.

Es notable que el EDL adicionado al cultivo de monocitos 1 h después de iniciada la estimulación con LPS, inhibe la liberación de TNF a niveles similares a aquellos obtenidos bajo condiciones de incubación simultánea. Ésta resulta una importante clave para la aplicación terapéutica del EDL en procesos inflamatorios agudos y crónicos asociados a la liberación de citocinas proinflamatorias.

Nuestros resultados indican que el tratamiento con EDL afecta más bien mecanismos postraduccionales dependientes de LPS, pero no debe descartarse la posible influencia del extracto sobre la regulación de la transcripción génica. Otros investigadores han reportado la inhibición de la expresión de esta citoquina mediante el bloqueo de vías que involucran segundos mensajeros (7), las cuales no sólo conducen a una rápida acumulación de ARNm de TNF $\alpha$ , sino también a una acelerada producción de TNF $\alpha$  (8).

En nuestro trabajo evaluamos el efecto del EDL en ensayos con sangre total. El tratamiento simultáneo *in vitro* de los leucocitos humanos con EDL y LPS reduce potentemente la producción de TNF, evaluada 4 h después de iniciada la inducción con la endotoxina (Figura 1A). En efecto, la presencia de altas dosis de EDL bloquea la secreción de TNF inducida por la endotoxina y solamente se observa un ligero incremento sobre los niveles basales de la citocina en leucocitos tratados con pequeñas dosis del extracto. Esta potente respuesta inhibitoria,

obtenida en un sistema que mimetiza condiciones fisiológicas, enfatiza el potencial terapéutico de este producto en enfermedades inflamatorias asociadas al LPS. La reducción de la producción de TNF en presencia de pequeñas dosis de LPS, parece indicar que el tratamiento de las células con EDL afecta la secreción de citocinas estimulada por LPS dependiente de CD14, o que un evento común desencadenado por la interacción del LPS con la molécula CD14 u otro receptor de superficie celular, son los blancos de la acción inhibitoria del EDL. El ensayo en sangre total, incluidas las células polimorfonucleares que producen TNF en respuesta al LPS (9), demuestra que el EDL afecta la respuesta de diferentes tipos celulares.

Se ha demostrado que la producción de TNF inducida por LPS tiene un papel importante en el síndrome séptico. Dadas las observaciones realizadas en este estudio relacionadas con la capacidad del EDL de suprimir la secreción de TNF inducida por LPS y de reducir substancialmente la producción de TNF por células previamente activadas (Figura 1B), se sustenta la evaluación terapéutica de EDL en síndromes de respuesta inflamatoria generalizada. En pacientes con sepsis, se han reportado concentraciones reducidas de proteína C reactiva luego del tratamiento con EDL (10). Esta respuesta *in vivo* puede ser dependiente del control de la secreción de TNF. Los resultados de este estudio también tienen particular relevancia para el tratamiento de otras enfermedades en las cuales la secreción de TNF, y de otras citocinas y mediadores inducidos por TNF, desempeñan un papel patogénico, como son el asma bronquial, la artritis reumatoide, el SIDA y la esquistosomiasis. Vale destacar que estas entidades también cursan con defectos en la respuesta inmune que pueden ser corregibles bajo los efectos inmunomoduladores del EDL.

#### Inhibición de la replicación del VIH

Desde el descubrimiento del VIH como agente causal del SIDA, han sido descritos diferentes compuestos con actividad anti-retroviral *in vitro* y alguno de ellos son comúnmente utilizados en el tratamiento de la infección por VIH. Estas terapias anti-retrovirales ofrecen diferentes beneficios clínicos, como la disminución de la velocidad de aparición de infecciones oportunistas y prolonga la sobrevida, pero estos agentes son incapaces de detener la progresión de la infección viral. La mejoría inmunológica lograda es incompleta, y por otra parte, algunos de los actuales agentes terapéuticos son tóxicos para las células del sistema inmune (11). Recientemente, la inmunoterapia ha prestado especial atención a la búsqueda de estrategias dirigidas contra el VIH. La terapia de combinación que involucra el uso de agentes anti-retrovirales y compuestos inmunoterapéuticos parece ser prometedora.

4. Lynn WA, Liu Y, Golenbock DT. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1993;61:4452-4461.

5. Lynn WA, Raetz CRH, Qureshi N, Golenbock DT. LPS induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils: evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol* 1991; 147:3072-3079.

6. Strieter RM, Kunkel SL, Bone G. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 1993;21:447-463.

7. Kovacs EJ, Radzich D, Young MA, Varese L. Differential inhibition of IL-1 and TNF $\alpha$  mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J Immunol* 1988;141:3101-3105.

8. Gong JH, Ranz M, Sprenger M, Nain M, Gamsa D. Enhancement of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression by low doses of prostaglandin E $_2$  and cyclic GMP. *Immunobiol* 1990;182:44-55.

9. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM. Neutrophil CD14: Biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993;150: 5556-5565.

10. Lokaj J, Pekárek J, Kuklínek P. Dialysable leukocyte adriact in the therapy of sepsis. Leukocyte dialysates and transfer factor. Slovak Academy of Science. Bratislava 1987;516-525.

11. Yarchoon R, Mitsuya H, Broder S. Challenges in the therapy of HIV infection. *Immunol Today* 1993;14:303-308.

12. Klesius P, McMeeking A, Borkovsky W, Bonk S, Holzman RS, Lawrence HS. Immunotherapy of cryptosporidium parvum with bovine Transfer Factor. In: Baolai H, Ruzhang W, Zhaoen Z, eds. Research and applications of Transfer Factor and DLE. Beijing: Xue Yuan Press, 1989;227-238.

13. Butera ST, Roberts BD, Folks TM. Regulation of HIV-1 expression by cytokine networks in a CD4+ model of chronic infection. *J Immunol* 1993;150: 625-34.

14. Poll G, Faud AS. The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res Human Retro* 1992;8:191-96.

15. Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto H. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-1-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 1985;229:563-66.

16. Ho M, Baba M, Sato A, Hirabayashi K, Tanabe F, Shigeta S, DeClercq E. Tumor necrosis factor enhances replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158:307-12.

En este estudio, se demostró la capacidad del EDL de reducir la producción viral en dependencia de la dosis en un modelo *in vitro* de infección por VIH. Este efecto se observó al tratar el cultivo celular con EDL durante 7 días antes del enfrentamiento con el virus (Figura 2). No se modificó la producción del VIH transcurrido un período de tratamiento breve (3 h) con el extracto.

A partir de una cromatografía de exclusión molecular, se logró obtener una fracción aislada (Fb) con actividad inhibitoria de la producción del VIH (Figura 3). Ésta es una fracción heterogénea en cuanto a su composición y se realizan estudios adicionales que permitan definir los componentes moleculares que median este efecto. El efecto inhibitorio de la fracción Fb también fue evidenciado transcurridos 7 días de pre-tratamiento de las células MT-4.

Probablemente, se requieren efectos acumulativos o prolongados para reducir la sensibilidad de las células a la infección por VIH o para lograr una afectación parcial de la expresión viral. Deben explorarse posibles mecanismos relacionados con la actividad moduladora del EDL sobre la expresión de diferentes citocinas. Otros estudios refieren la participación de redes de citocinas en el control de la expresión del VIH (12-14).

En este estudio, se utilizó como modelo experimental la línea celular MT-4, células linfoblastoides CD4<sup>+</sup> infectadas con HTLV-1 altamente sensibles al VIH (15). Se ha reportado la producción endógena de TNF $\alpha$  por células linfoblastoides y una reducción de la sensibilidad de estas células a la infección por VIH al ser tratadas con anticuerpos específicos anti-TNF $\alpha$  (16, 17). La capacidad que tiene el EDL de reducir la producción de TNF en monocitos activados con LPS, probablemente ejerce su efecto a nivel postranscripcional. A pesar de las diferencias entre ambos modelos experimentales, el EDL podría mediar efectos inhibitorios similares sobre la liberación de TNF por la línea celular MT-4, que afectan indirectamente la expresión del VIH. Por otra parte, deben evaluarse otros efectos moduladores de este extracto sobre distintas citocinas reguladoras de la expresión del VIH, además de sobre eventos a nivel membranario que median la infección viral.

Estos resultados, obtenidos en sistemas *in vitro* utilizando una línea celular, indudablemente contri-

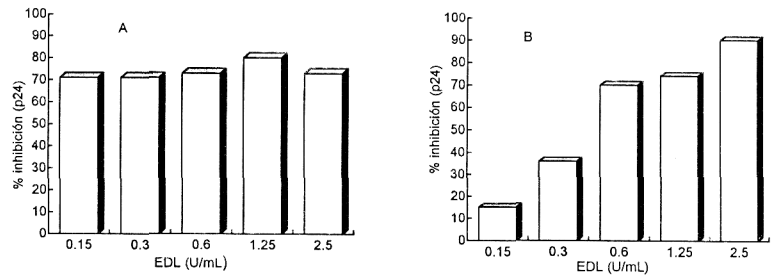


Figura 2. Efecto del EDL sobre la infección por VIH de células MT-4. Las células ( $2.5 \times 10^5$  cel/mL) fueron pre-tratadas durante 7 días usando diferentes concentraciones de EDL, y entonces retadas con VIH-Bru a una dosis viral de 0.05 (A) o 0.1 (B) m.o.i. Medio fresco con EDL fue adicionado después de la infección y sustituido nuevamente a los 3 días de cultivo. Los sobrenadantes se colectaron a los 7 días del reto viral y se determinó en ellos antígeno p24 por ELISA (DAVIH).

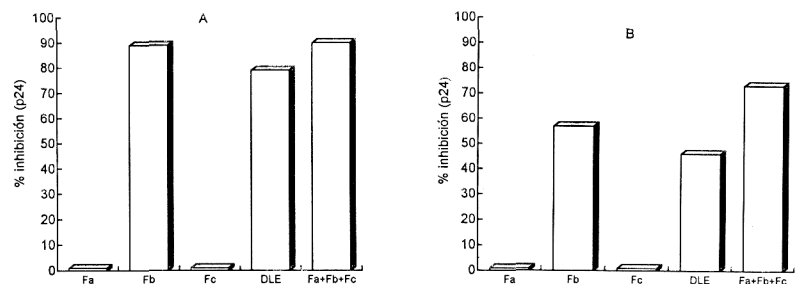


Figura 3. Efecto de fracciones del EDL sobre la infección por VIH de células MT-4. Las células ( $2.5 \times 10^5$  cel/mL) fueron pre-tratadas durante 7 días usando diferentes concentraciones de cada fracción (Fa, Fb, Fc). Para el reto se usaron dosis virales del aislamiento VIH-Bru de 0,5 (A) o 1 (B) m.o.i. Los cultivos se mantuvieron y procesaron como se explicó en la Figura 2.

buyen a dilucidar los mecanismos involucrados en las interacciones célula-virus y permiten establecer un enfoque racional del uso terapéutico del EDL en la infección por VIH. Se ha demostrado una mejoría de la respuesta inmune en pacientes tratados con EDL (18). Esos resultados clínicos, conjuntamente con los del presente estudio, indican la regulación por el EDL de la replicación viral en un sistema *in vitro* y reafirman la importancia de continuar los estudios de caracterización del EDL y de instaurar su empleo de modo definitivo en la búsqueda de una terapéutica efectiva del SIDA.

17. Kobayashi N, Hamamoto Y, Yamamoto N. Production of tumor necrosis factors by T cell lines infected with HTLV-1 may cause their high susceptibility to human immunodeficiency virus infection. *Med Microbiol Immunol Berl* 1990;179:115-22.

18. Rivero J, Limonta M, González A, Ramírez V, Aguilera A, López Saura P. Tratamiento con factor de transferencia en portadores del virus de la inmunodeficiencia humana. *Biotecnología Aplicada* 1993;10: 2-3.