



Simposio Internacional
sobre **Interferón**
y **Citoquinas**

International Symposium
on **Interferon**
and **Cytokines**

La Habana, Cuba.
Diciembre 2-5, 2001

Havana, Cuba.
December 2-5, 2001

El Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) es un extracto derivado de leucocitos inmunes que contiene moléculas de bajo peso molecular capaces de transferir inmunidad mediada por células (Factor de Transferencia). Esto significa que el EDL de individuos con una alta reactividad a un antígeno específico desarrollará una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada en receptores que nunca habían sido expuestos a ese antígeno. El EDL se utiliza para el tratamiento de muchas enfermedades. Las propiedades del EDL fueron descritas hace más de cuatro décadas y a pesar de que mucho se ha investigado todavía no existe un consenso sobre su estructura química ni su mecanismo de acción.

Dialyzable Leukocyte Extract (DLE) is a complex extract derived from immune leukocytes containing low-molecular weight entities capable of transferring cell-mediated immunity (Transfer Factor). That is, DLE obtained from individuals with strong reactivity to a specific antigen will develop a delayed hypersensitivity reaction in recipients that have never been exposed to this antigen. Clinical trials using DLE have been performed in several diseases. The immunologic properties of DLE was first described more than four decades ago. However after many research there is not yet a consensus criterion about the chemical nature and mechanisms of action.

**FACTOR
DE TRANSFERENCIA**

Ensayo de seguridad del Factor de Transferencia, obtenido a partir de células sin inducir, administrado por vía intramuscular en ratas Sprague-Dawley	15
Empleo de leucocitos de conejas para titular la actividad biológica del Factor de Transferencia mediante la técnica de IML	15
Factor de Transferencia y Levamisol y métodos alternativos en diagnóstico de déficit inmunidad celular	16
Determinación de la actividad biológica <i>in vivo</i> del Factor de Transferencia. Técnica alternativa	16
NF- κ B Down Regulation is a Common Target for the Inhibition of TNF Production and HIV Replication by the Dialyzable Leukocyte Extract (DLE)	17
Validación de la capacidad de aclaramiento de virus ADN en el proceso de producción de Hebertrans	17
Dialyzable Leukocyte Extract (DLE) modulates CCR5, CXCR4 and MIP-1 α in MT-4 cells	18
An Approach to the Characterization of Some Biological Activities of DLE	18
Our Experience with the Application of IMMODIN (commercial preparation of DLE)	19
Efecto de la pasteurización en las propiedades del Factor de Transferencia	19
Experiencias con el uso del edl en infecciones respiratorias recurrentes y/o crónicas	20
Uso del edl en pacientes con procesos inflamatorios oculares	20
Evaluación de la Estreptoquinasa Recombinante como antígeno en la determinación de la actividad biológica del Factor de Transferencia	21
The <i>In Vitro</i> Effect of DLE's on the mRNA Expression of Osteopontin in CD4+, CD8+ and CD14+ Subpopulations from Healthy Donors	21
El Factor de Transferencia como inmunomodulador en el asma bronquial extrínseca, estudio de 150 casos	22
Inmunoterapia con Factor de Transferencia en pacientes con Herpes Zoster	22
Uso del Factor de Transferencia como complemento terapéutico en infecciones bacterianas graves	23
Use of Transfer Factor as Immunomodulator in Glioma C6 in Rat	23
Specific Transfer Factor Protects Mice Against Lethal Toxoplasmosis	24

Ensayo de seguridad del Factor de Transferencia, obtenido a partir de células sin inducir, administrado por vía intramuscular en ratas Sprague-Dawley

Aldana Velazco L,¹ Prats Pérez P,¹ Merino N,² Valenzuela C,¹ Amaya R,¹
Suaréz Alba J, Porras D,¹ Vázquez A,¹ Carrera Collazo I,¹ Bacardí Fernández D,¹
Milá L,¹ Hernández L,¹ Cosme Díaz K,¹ Sánchez K¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. ²Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas

El Factor de Transferencia es un agente natural que puede aumentar la capacidad para combatir las enfermedades y mejorar la calidad de vida para muchas personas, de forma general ha sido usado exitosamente para tratar enfermedades virales, parasitarias, neurológicas, micóticas y autoinmunes. A diferencia de anteriores formulaciones, este producto presenta como ingrediente activo extracto dializable de leucocitos obtenido de leucocitos humanos.

El propósito de este ensayo fue determinar los signos tóxicos que se puedan producir tras la administración única del Factor de Transferencia obtenido de células sin inducir en ratas Sprague-Dawley.

Para esta evaluación se utilizó la formulación final, que se empleará en la terapéutica humana. Las dosis de ensayo fueron 50, 90 y 180 veces la dosis terapéutica.

El ensayo se realizó en la zona de barreras del Bloque B de

Toxicología del Bioterio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Se empleó como material biológico 40 animales distribuidos en cantidades equitativas para cada sexo. Se realizó el sacrificio a los 14 días de la administración. Mediciones: Se realizaron observaciones clínicas diarias, determinaciones del peso corporal de forma semanal y análisis macroscópicos en hígado, bazo, ganglios mesentéricos y timo.

No se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los animales tratados con el grupo control, no se reportaron observaciones macroscópicas relacionadas con los animales tratados.

Teniendo en cuenta que no se determinaron signos tóxicos tras la administración única del Factor de Transferencia obtenido de células sin inducir en ratas Sprague-Dawley se propone pasar al próximo ensayo de primera ola, la tolerancia local.

Empleo de leucocitos de conejas para titular la actividad biológica del factor de transferencia mediante la técnica de IML

Barcelona S, Quintana M, Ferrero J, Brito O, Porrero F, Quintana A,
Fernández Ortega C, Ali A, Mulet J

Centro de Investigaciones Biológicas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
Calle 134 entre 23 y 25, Cubanacán, Playa, C. de La Habana, Cuba.

El Extracto Dializado de Leucocitos, también conocido como Factor de Transferencia transfiere una reacción de Hipersensibilidad Cutánea Tardía en forma antígeno dependiente y específica, además de otros efectos relacionados con la inmunidad mediada por células. Se emplea para tratar enfermedades causadas por virus, hongos, bacterias; el asma bronquial extrínseca; e inmunodeficiencias celulares.

La actividad biológica del EDL se demuestra *in vitro* mediante el ensayo de Inhibición de la Migración Leucocitaria (IML). El presente estudio demuestra que las conejas F1 Nueva Zelandia - Semi Gigante que carecen de experiencia inmunológica dirigida contra los antígenos que se utilizan en el ensayo de IML, pueden ser utilizadas como donantes habituales de los leucocitos que se emplean en esta técnica.

Bibliografía

1. Lawrence H. S., and Bokowsky W. Transfer Factor: recent developments in the pursuit of an idea. Cellular Immunology. 1981; 62: 301-8.
2. Lawrence H.S. Transfer Factor in cellular immunity. The Harvey Lectures. Academic Press, New York. 1974; Series 68. 1974. Pp. 239-350.
3. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba. Informe "Impacto de los productos del Polo Científico en el Sistema Nacional de Salud. 4 de diciembre 1998; Pág. 22-33.
4. Soberg M. & Bendixen G. Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. Acta Med. Scand. 1967; 181:247-253.

Factor de Transferencia y Levamisol y métodos alternativos en diagnóstico de déficit inmunidad celular

Chistian López LC, Santamaría Lafargue M,
Sosin Curbelo AM, Rabassa Pérez J

Hospital Infantil Docente Angel A. Aballí. La Habana, Cuba

En nuestro país ya es conocido el efecto del Factor de Transferencia y el Levamisol como inmunoestimulante en niños con infecciones recurrentes, portadores de inmunodeficiencias Primarias o Secundarias diagnosticadas por las pruebas habitualmente empleadas con este fin.

Pero no se conoce el efecto de estas drogas sobre el Timo y la prueba cutánea de Hipersensibilidad Retardada con Toxoide Tetánico (PCHR), por lo que a 200 niños de la consulta de Inmología entre 8 meses y 6 años de edad, de ambos sexos, a los cuales se les administró Grupo 1 (n:100) Factor de Transferencia

1 unidad semanal durante 8 semana vía subcutánea combinado con Levamisol en igual dosis y frecuencia que en el grupo 1.

A todos los niños se les realizó ecografía tímica y la PCHR.

Se les realizó a 68 niños del Grupo 1 y a 50 niños del Grupo 2 antes y después de culminado el tratamiento. Solo se logró aumento significativo de la masa tímica en el Grupo 2. Ocurrió un aumento ligero de la respuesta a la PCHR en ambos grupos.

Se logró en ambos grupos una disminución marcada de los ingresos hospitalarios, visitas a cuerpo de guardia y consulta externa y uso de antibióticos con un ahorro total de \$ 187 000:00 MN.

Determinación de la actividad biológica in vivo del Factor de Transferencia. Técnica alternativa

Cosme K, González M, Gorovaya L, Soria Y, Barcelona S, Quintana M, Sánchez K

Centro de ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba. E mail: karelia.cosme@cigb.edu.cu

El Factor de Transferencia es un agente natural que puede aumentar la capacidad para combatir las enfermedades y mejorar la calidad de vida para muchas personas, se encuentra en el calostro y otras fuentes, y es un medio natural para fortalecer el sistema inmunológico contra las enfermedades.

Los factores de transferencia (FT) de origen murino, bovino o humano son pequeñas moléculas de aproximadamente 3500 a 6000 Da, lábiles al calor y muy estables a bajas temperaturas, la actividad biológica se mantiene aún después de muchos años a temperatura entre - 20 °C y -70 °C.

El objetivo del presente trabajo, fue la determinación de la actividad biológica del FT *in vivo*, mediante la técnica de Hipersensibilidad Cutánea Retardada (DTH), se emplearon ratones de la línea BALB/c, fueron evaluadas diferentes proteínas para ser empleadas como antígenos y se estableció la frecuencia de observación / medición de la inflamación a las 48 horas como tiempo óptimo. Todo lo cual permitió la evaluación de 10 lotes de producto, obteniéndose repetibilidad de ensayo y consistencia, lo que garantiza contar con una técnica alternativa al LIF, para la determinación de la actividad biológica del Factor de Transferencia.

NF- κ B Down Regulation is a Common Target for the Inhibition of TNF Production and HIV Replication by the Dialyzable Leukocyte Extract (DLE)

Fernández-Ortega C, Ojeda M, Rodríguez L, Araña M

Departamento de Biología Celular y Molecular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP: 6162. La Habana 10 600, Cuba. Fax: 537 214764, E-mail: celia.fernandez@cigb.edu.cu

A set of experiments focused to the characterization of DLE effects have been conducted by our research team. The results have shown an important decrease in LPS-induced TNF α production by human peripheral blood after cell treatment with DLE. An *in vitro* system using the human T cell line MT-4 allow us to demonstrate a dose-dependent inhibitory effect on HIV replication in DLE pre-treated cells. The identification of endogenous factors modulated by DLE has revealed a suppression of TNF α and TGF β 1 gene expression. On the other hand, the transcription factors NF- κ B and Sp1 are both decreased with DLE treatment of these cultures.

NF- κ B is involved in the transduction of immunological responses, cellular differentiation, and cell growth. A role for NF- κ B in immunity and the inflammatory process has been established

but also it has other functions, including roles in liver development and disease processes. NF- κ B is itself a critical transcriptional activator for cytokines including TNF α and IL-1. NF- κ B may promote replication of HIV. The viral regulatory sequences in the LTR include a TATA box, Sp-1 sites, and NF- κ B sites.

The inhibition of HIV replication observed with DLE extended treatment could be mediated by the inhibition of transcription factors NF- κ B and Sp-1.

In addition, this effect could be mediated or fortified by the inhibition of TNF α and TGF β 1, cytokines capable to increased HIV replication through NF- κ B activation. The finding that DLE also inhibit NF- κ B after short time treatment could explain the reduction of TNF induction mediated by LPS observed in the presence of DLE.

Validación de la capacidad de aclaramiento de virus ADN en el proceso de producción de HEBERTRANS

Noa E,¹ Tuñón MA,² Ruibal I,¹ Dubed M,¹ Castañeda F,²
Alvarez G,¹ Sánchez E,² Navea L,¹ Sánchez K²

Laboratorio de Investigaciones del SIDA, AP 23031, Marianao 14, Ciudad de la Habana, Cuba;
E-mail: cicdc@infomed.sld.cu Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

El HEBERTRANS (Factor de Transferencia) se ha aplicado en Cuba durante más de 10 años con éxito en el tratamiento de enfermedades virales, inmunológicas y oncogénicas y también en el tratamiento de pacientes VIH/SIDA.

Para garantizar una adecuada seguridad a este producto biológico cubano es necesario:

1. Cuidadosa selección de los donantes y análisis de la materia prima para detectar marcadores virales;
2. Evaluación del producto en momentos críticos del proceso de producción para detectar marcadores virales;
3. Validación de la capacidad del proceso de producción para inactivar o remover los posibles contaminantes virales presentes en las materias primas.

En este trabajo se valida la capacidad del proceso de producción de HEBERTRANS para inactivar virus ADN, empleando como modelos el virus herpes porcino tipo 1 (virus envuelto, de tamaño mediano y moderada resistencia a los agentes físicos-químicos) y el parvo virus canino (virus no envuelto, de pequeño tamaño y de muy alta resistencia a los agentes físicos-químicos).

El factor de reducción total para el modelo ADN envueltos (virus herpes porcino) fue de 12.41 log y para el modelo ADN no envueltos (parvo virus canino) fue de 13.68 log. Estos valores de aclaramiento viral le confieren al proceso de producción de HEBERTRANS un adecuado margen de seguridad para eliminar los posibles virus ADN contaminantes.

Dialyzable Leukocyte Extract (DLE) modulates CCR5, CXCR4 and MIP-1 α in MT-4 cells

Ojeda M, Chávez L, Rodríguez L, Casillas D, Ramos Y, Fernández-Ortega C

Departamento de Biología Celular y Molecular. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, AP: 6162, La Habana 10 600, Cuba. Fax: 537 214764, E-mail: celia.fernandez@cigb.edu.cu

DLE is produced using pooled leukocytes from healthy donors that were previously induced to produce IFN. This preparation is able to transfer immunity and provide clinical effectiveness in a broad spectrum of diseases.

The preparation shows an important decrease in LPS-induced TNF α production and a significant dose-dependent inhibitory effect on HIV *in vitro* replication. Others results shown DLE modulation of important endogenous factors involved in HIV immunopathogenesis like TNF α , TGF β 1 and the transcription factors NF-kB and Sp1.

In this work we studied the effect of DLE on chemokines and chemokines receptors in MT-4 cells treated. MIP-1 α is the most potent CCR5 agonist and HIV inhibiting chemokine. A signifi-

cant dose-dependent increase of MIP-1 α were observed after 7 days of DLE treatment to MT-4 cells. The chemokines receptors CCR5 and CXCR4 have been identified as the principal co-receptors for T cell line tropic and macrophage tropic HIV-1 isolates respectively.

A stimulatory effect was observed in CCR5 mRNA expression after 7 days of treatment in presence of the highest concentrations of DLE, in this case, the induction of CCR5 could be regulated by the high levels of MIP1 α produced. In the same way, a stimulation of CXCR4 mRNA expression was detected after 3 and 7 days of treatment. It is necessary to study the DLE effect on the specific soluble ligand of CXCR4 in order to find a possible regulatory mechanism of the CXCR4 expression in presence of DLE.

An Approach to the Characterization of Some Biological Activities of DLE

Pekárek J, Cech K, Barnet K

SEVAPHARMA, Praha 10-10103, Czech Republic.

As far as it concerns the scientific results of the DLE and transfer factor problems a large range of results was obtained. First of all, the preparation itself was verified by means of many *in vitro* and *in vivo* laboratory techniques.

The activity of various biologically active substances was checked with different methods: the migration inhibitory test (MIT), the GVHR, E rosette test etc.

Further the effect of DLE and of its individual fractions on the metabolism of Ca²⁺ in macrophages and thymocytes was tested. The effect of DLE and its fractions on the proliferation and differentiation of the stem cells, as well as the prevention of the damages caused by X ray irradiation or some cytostatics administra-

tion was also followed up.

A fraction possessing suppressoric activity was isolated from the DLE and applied in the therapy of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and some autoaggressive diseases. Some specific transfer factors were prepared from human leukocytes as well as from various organs of hyperimmunized animals.

The results of all these experiments and laboratory techniques have shown that the DLE contains a rich mixture of various biologically active substances of which many proved to be effective and can be used in the therapy of some human and/or animal diseases especially in cases where the current therapy is poorly effective or even ineffective.

Our Experience with the Application of IMMODYN (commercial preparation of DLE)

Pekárek J, Cech K, Mrázová A, Rovensky J

SEVAPHARMA, Praha 10-10103, Czech Republic

The research of transfer factor and DLE started in our Institute in 1967. This research ended in 1985 with the registration of a commercial preparation based on the DLE. From that time more than 350.000 doses of this preparation have been administered in clinical practice.

The basis for the registration of our commercial preparation was a controlled clinical study including more than 1000 persons. The main criterion for the DLE administration was the proved defect of the cell-mediated immunity reactions.

Our commercial preparation IMMODYN proved to be effective especially in various relapsing and chronic infections in the therapy of primary and secondary immunodeficiencies etc. Immodin was administered prophylactically in patients under therapeutical regime with immunosuppressive character in immu-

nodeficient patients prior to severe surgical operations or accidents to prevent septic complications, DLE was also used to improve some immunological interventions such as the hyposensibilization therapy of allergic patients, the vaccination of immunodeficient patients and/or old persons etc.

During the clinical application of preparation it has been shown that it proved to be effective also in the therapy of some tumors, in various autoaffressive diseases and some diseases of etiology unknown as yet. It should be stressed that during the administration of this commercial preparation no undesirable side effects have been observed.

The preparation was very well tolerated with the exception of a short lasting (cca 10 minutes) local pain at the site of the subcutaneous administration.

Efecto de la pasteurización en las propiedades del Factor de Transferencia

Quintana Cantillo A,¹ Sánchez Alvarez K,¹ Vega Simón M,² Alvarez Y,¹
Barrios Camacho DR,¹ Sánchez Zayas E,¹ Rodríguez Alfonso A³

¹Departamento de producción de Leuferón y Factor de Transferencia. ²Dirección de Control de Calidad. ³Departamento Química Física. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

Las preparaciones de Factor de Transferencia, se obtuvieron a partir de leucocitos purificados de donantes sanos e inducidos para producir Interferón con virus Sendai. El dializado fue pasteurizado y conservado en alícuotas a - 20 °C.

Se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos, determinación del espectro de absorción, cromatografía en gel HW-40S y actividad biológica mediante el ensayo de inhibición de la migración leucocitaria. La estabilidad del producto pasteurizado fue también ensayada.

Los perfiles de absorción de todos los extractos dializables de leucocitos, fueron similares coincidiendo con el típico espectro de absorción del Factor de Transferencia, tanto para el caso los lotes pasteurizados, como los no pasteurizados.

La determinación de la concentración de proteínas y carbohidratos se comportó en el rango establecido y no existe en ningún caso diferencias entre los lotes pasteurizados y sin pasteurizar. Esto también fue corroborado al obtener los perfiles cromatográficos en HPLC de las muestra.

Como complemento además se evaluó la estabilidad de estas preparaciones pasteurizadas al cabo de 15 meses de fabricadas y no se aprecian diferencias en cuanto a los parámetros de calidad evaluados al inicio y al final.

Los resultados obtenidos indican que los parámetros químicos y físicos de las preparaciones de Factor de Transferencia no parecen ser afectados por el proceso de pasteurización del producto. Esta misma tendencia es observada en los ensayos de determinación de la actividad biológica.

Experiencias con el uso del EDL en infecciones respiratorias recurrentes y/o crónicas

Santos Lagresa MN

Servicio de Inmunología. Hospital Oftalmológico Ramón Pando Ferrer. Ciudad de La Habana. Cuba. La Habana, Cuba.

Es conocida la alta incidencia de las infecciones respiratorias recurrentes y/o crónicas en edades pediátricas dada la inmadurez del Sistema Inmune, el carácter pertinaz de los microorganismos además de las condiciones climatológicas y la base genética atópica en muchos de nuestros pacientes; por lo que muchos investigadores recomiendan el uso de inmunomoduladores con el fin de poder ayudar a controlar estos cuadros.

En el presente estudio se reportan los resultados de un Estudio Observacional controlado en 60 pacientes de ambos sexos entre 2 y 14 años con Infecciones Respiratorias (más de 10 catarros y/o 2

neumonía, otitis de más de 15 días sin respuesta a los tratamientos habituales). Se excluyeron del estudio procesos autoinmunes, pacientes con inmunosupresores y tumores. La dosis utilizada de FT fue de 1 unidad diaria durante el proceso agudo pasando posteriormente a 1 unidad semanal por 8 semanas.

La respuesta encontrada fue clasificada como Satisfactoria en 49(81.6%) de los pacientes lo que fue estadísticamente significativo $p < 0.001$. Se concluye que el EDL constituye una terapéutica eficaz como inmuno modulator en pacientes con Infecciones Respiratorias señaladas.

Uso del EDL en pacientes con procesos inflamatorios oculares

Santos Lagresa MN

Servicio de Inmunología. Hospital Oftalmológico Ramón Pando Ferrer. Ciudad de La Habana. Cuba.

En el Aparato Ocular se producen procesos inflamatorios donde participan los cuatro tipos de Respuestas de Hipersensibilidad por otra parte debido al uso indiscriminado de esteroides por parte de los oftalmólogos con el fin de poder controlar la respuesta inflamatoria se crean estados de inmunosupresión que en muchas oportunidades comprometen de forma importante no solo la visión sino también la propia vida del enfermo.

El estado de inmunodepresión creado y/o el existente previo a la medicación hace que el manejo de las inflamaciones oculares de etiología infecciosa constituya un gran reto para el médico más en los tiempos actuales donde existe un incremento de la resistencia de los microorganismos por lo que la introducción de nuevas alternativas terapéuticas en el campo de la oftalmología constituye un reto por lo que el uso de inmunomoduladores y en especial el uso del EDL es una opción esperanzadora.

Se presentan los resultados del uso de EDL en 248 pacientes con diferentes patologías oculares de etiología Infecciosa y Atópicas (Queratoconjuntivitis Atópica, Queratitis Herpéticas Bacterianas y Mixtas, Herpes Zoster, Ulceras corneales, Ulcera de Mooren e Infecciones de Cavidad Orbitaria y del Tracto Uveal y Retina) que fueron sometidos a estudios controlados

con EDL a las dosis de 1 a 2 unidades diarias durante la fase aguda pasando posteriormente a 1 unidad dos veces por semana por 8 semanas, en edades comprendidas entre 2 y 78 años y ambos sexos. Fueron excluidos pacientes con Procesos Autoinmunes Tumores otras patologías oftalmológicas y los que en el momento de ser incluidos en el estudio se encontraban con tratamiento esteroideo u otro inmunosupresor por vía sistémica y otras entidades inflamatorias del segmento posterior de etiología no precisada en la actualidad donde la manipulación del sistema inmune pueda producir efectos adversos al paciente.

Los resultados obtenidos con el uso del EDL atendiendo a las diferentes variables evaluadas de acuerdo a la entidad nosológica en cuestión fueron consideradas como Satisfactoria cuando se compararon con los tratamientos establecidos, encontrándose significación estadística en todos los casos en que pudo evaluarse el nivel de significación, pues en el caso de Ulcera de Mooren solamente pudimos estudiar los resultados del tratamiento en 4 pacientes. No se reportaron efectos adversos en ninguno de los casos tratados ni presencia de virus de Hepatitis B, C ó VIH/SIDA en los casos tratados.

Evaluación de la Estreptoquinasa Recombinante como antígeno en la determinación de la actividad biológica del Factor de Transferencia

Tamayo G, Cosme K, González M, Goravaya L, Porrero F, Soria Y, Piñero L, Quintana A, Leyva L, Barcelona S, Pérez RE, Jerez J, Sánchez K, Chaveco M, Hernández L, Pérez N, Urrutia E

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. PO Box 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.
Teléfono: 271-6022, 271-6464, Fax: 271-8675, 271-8070, E mail: grisel.tamayo@cigb.edu.cu

La Estreptoquinasa recombinante es una proteína monomérica, extracelular y catabólica, capaz de convertir el plasminógeno humano y de varias especies de mamíferos (monos, gatos, perros, conejos) a plasmina proteasa sérica del plasma que produce la fibrinólisis y que normalmente se encuentra en la sangre en forma de plasminógeno, su precursor, además no presenta en su estructura carbohidratos, fósforos, lípidos, cisteína y cistina, puede contener especialmente grandes cantidades de radicales de ácido aspártico y glutámico, su peso molecular varía de 40 a 50 Kd.

Por las características de esta proteína se estudió la posibilidad de que esta molécula fuera usada como antígeno en la determinación de la actividad biológica del Factor de Transferencia (HEBERTRANS) mediante la técnica de Hipersensibilidad Cutánea Tardía (DTH) para lograr la estandarización de la dosis a emplear se hicieron varias diluciones las cuales fueron analizadas mediante la respuesta inflamatoria obtenida en la zona intraplantala o interdigital en ratones de la línea BALB/c. Se logró el empleo de la Estreptoquinasa como antígeno en la técnica de DTH a razón de 200 mg en 25 mL.

The In Vitro Effect of DLE's on the mRNA Expression of Osteopontin in CD4+, CD8+ and CD14+ Subpopulations from Healthy Donors

Pérez-Tapia M,¹ Santos Argumedo L,² Estrada-García I,¹ Estrada Parra S¹

¹Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, Ciudad de México 11340, México.
²CINVESTAV, Ciudad de México, Mexico.

Dialyzable leukocyte extracts (DLE's) are the dialyzable fraction with molecular weight ≤ 12 KDa originated from the lysis of leukocytes. These extract can transfer cell mediated immunity from an immune donor into a nonimmune donor in an antigen specific manner. The transferability depends upon the presence of small protein molecules called transfer factors (TF).

Osteopontin (OPN) is a multifunctional cytokine protein with adhesion properties, produced by macrophages and T lymphocytes.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyse the presence of OPN mRNA in DLE stimulated cells. Three protocols were set up: PBMNC were incubated and analysed; CD4+, CD8+ and CD14+ cells were purified and then stimulated; the same subpopulations were purified and analysed after previously being treated with DLE. Cells were incubated for six hours with three different DLE batches and concentrations

(concentrated, dil 1:10 and dil 1:100); controls were set up with concanavalin A and no stimulus.

Spontaneous expression of OPN mRNA was observed in total PBMNC activated with DLE and in the different subpopulations purified from previously stimulated PBMNC, regardless they received ConA or no treatment, however concentrate DLE inhibited OPN mRNA.

On the other hand, the behaviour of purified cells which were then stimulated with DLE was rather different, since both CD4+ and CD8+ cells did not showed OPN mRNA under any incubation condition. A completely different behaviour was observed with the CD14+ population, where dilutions of 1:10 or 1:100 had an stimulatory effect on the expression of OPN mRNA, similar to that observed with ConA. Briefly, DLE's showed to induce different effects on OPN mRNA expression depending on the cell type and the DLE concentration.

El Factor de Transferencia como inmunomodulador en el asma bronquial extrínseca, estudio de 150 casos

Cabezas Quiroga R,¹ Hernández Perera A,¹ Selman M,² Fernández Ortega C²

¹Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ). ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Se estudiaron 150 pacientes Asmáticos (asma extrínseca), con edades comprendidas entre 5 y 50 años, que presentaban crisis frecuentes de broncoespasmo y trastornos inmunitarios tales como elevación de la IgE y depresión de la inmunidad, medida por Rosetas e intradermoreacción. A 130 de ellos (seleccionados aleatoriamente) se les aplicó Factor de Transferencia (FT) en dosis de una unidad diaria por vía intramuscular (IM) durante 7 días y una unidad semanal durante 7 semanas. A los 20 restantes (grupo testigo y a doble ciego) se les aplicó en lugar del FT, un mililitro (mL) de Solución Salina al 0.9% bajo el mismo esquema. Ambos grupos recibieron como única droga, un broncodilatador, aminofilina en jarabe (5 mL al día de una concentración base de 0.0125 mg/mL).

Los pacientes se siguieron clínicamente una vez al mes y al año, se realizó una nueva evaluación completa (clínica e inmunológica), encontrándose una diferencia importante entre el grupo tratado con FT y el grupo testigo.

En este último, todos los pacientes siguieron el curso natural de la enfermedad; mientras que en el grupo que recibió el FT, 80 de 130 no tuvieron crisis de broncoespasmo, 31 tuvieron menos de 3 crisis por mes de tipo ligeras y 19 no presentaron cambios significativos aunque sus crisis fueron de más fácil control.

La IgE disminuyó a sus valores normales en 99 pacientes de los tratados con FT y 31 no normalizaron sus cifras aunque hubo tendencia a la reducción.

Las *Rosetas Activas* se incrementaron en 107 pacientes y en 13 no hubo modificaciones importante. También hubo incremento en las *Rosetas espontáneas*. En las pruebas intradérmicas se obtuvo respuesta positiva en 105 de los pacientes estudiados y en 25 no hubo respuesta.

Es de importancia señalar que la mayoría de los pacientes que tuvieron mejorías clínica, también presentaron normalización en sus parámetros inmunológicos.

Inmunoterapia con Factor de Transferencia en pacientes con Herpes Zoster

Cabezas Quiroga R,¹ Hernández Perera A,¹ Selman M,² Fernández Ortega C²

¹Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ). ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

El Herpes Zoster es una enfermedad causada por el virus Varicela Zoster. Esta enfermedad se caracteriza por un dolor localizado a lo largo de la distribución del nervio y una erupción vesicular en la piel sobre la zona única o adyacente del dermatoma (Hoeprech 1977).

Por lo común esto ocurre en pacientes adultos con estados anérgicos o en aquellos que han ingerido medicamentos inmunosupresores, también lo podemos encontrar en pacientes con enfermedades neoplásicas o con SIDA.

Nuestro grupo estudió el efecto del Factor de Transferencia (FT) en 90 pacientes con Herpes Zoster y se comparó con 10 pacientes tratados con la terapia convencional, los 100 pacientes fueron estudiados de una manera integral, y en ninguno de ellos

se encontraron procesos malignos u otras causas que deprimieran la respuesta inmune celular mediante el test de Rosetas Activas y Espontáneas, previo al tratamiento y 45 días posteriores habiendo diferencia ostensible, en aquellos a los que se les aplicó el FT.

Los 90 pacientes que fueron tratados con FT tuvieron un tiempo promedio de regresión de las lesiones de 8,9 días y del dolor de 7,3 días, en cuanto a los casos tratados por el método convencional fue de 22,5 días para la regresión de las lesiones y 26 días para el dolor.

Los pacientes tratados con FT tuvieron una remisión atípica de las lesiones herpéticas ya que de la etapa de mácula pasaron a la de cicatrización en un período de tiempo muy corto (4-6 semanas) no dejando neuritis postherpética o cualquier otra complicación.

Uso del Factor de Transferencia como complemento terapéutico en infecciones bacterianas graves

Cabezas Quiroga R,¹ Hernández Perera A,¹ Tarano Quintana G,¹
Selman M,² Fernández Ortega C²

¹Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ). ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

La sepsis grave, aún con terapia antibiótica agresiva, sigue siendo un problema complejo de salud debido a la alta mortalidad y al tiempo prolongado en las unidades de terapia y hospitalización.

Es bien conocido que el Factor de Transferencia (FT) al estimular y regular la respuesta inmunológica tiene efectos terapéuticos importantes en las infecciones, por todo lo anterior decidimos utilizar el FT junto con la antibióticoterapia en 35 pacientes con sepsis severa en nuestro hospital.

Al hacer un balance de este tratamiento con los testigos se encontró que la mortalidad disminuyó notablemente a un 17%

en comparación con la media anterior que era de un 70-75%. También el período de la mejoría clínica inicial fue impresionante ya que la mayoría de los pacientes empezaron a recuperarse después de 3 y 5 días de recibir el FT, llegando a la recuperación total entre 15 y 21 días. Se utilizaron 2 esquemas terapéuticos con FT; el período inicial fue igual para ambos grupos administrándose 1 unidad de FT cada 12 horas durante 7 días; después a un grupo se le continuo la terapia con FT durante 15 días y al otro grupo durante 21 días. El segundo esquema reportó mejores resultados.

Use of Transfer Factor as Immunomodulator in Glioma C6 in Rat

Rodríguez-Ropón A,¹ Reyes Ramírez S,² Pineda Olvera B,¹
Pedraza Medina B, Estrada-Parr S,¹ Sotelo Jiménez J

¹Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, Ciudad de México 11340, México.

²Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

The glioblastoma multiform (GBM) represent the most common tumor in the nervous system. The conventional therapy it does not successful controlling tumor growth, furthermore it causes several side effects.

The transfer factor (TF) is defined as a dialyzable antigen-specific material, that can be extracted from lymphoid cells. TF has been considered as an immunotherapeutic agent specially in certain infectious diseases, immunodeficiency and neoplasm.

The aim of this study was to evaluate the effect of specific TF in the treatment of glioma C6 in a model of human GBM.

One sow was immunized with glioma C6 antigen, heparinized blood was taken in order to produce TF. Eighty three Wistar rats were transplanted with glioma C6, when the tumor reached a size of 2 cm, the animals were distributed at random into 5 groups: control, conventional therapy (carmustine), oral TF, subcutane-

ous TF and intratumoral TF (iTF). Tumor growth was monitored weekly over 4 weeks. T lymphocytes subpopulations were determinated in peripheral blood using flow microfluorometry. At the end of the experiment intratumoral oedema was measured and also apoptosis was detected by propidium iodine subG zero peak. The experiment was repeated with another sow.

The rats treated with carmustine and iTF, showed a significant difference in tumor volume ($p < 0.001$ and $p < 0.04$) respectively. There was also a significant difference in edema in the group which received iTF ($p < 0.007$). Apoptosis was abundant in tumors treated with iTF when compared with the control group ($p < 0.02$).

The results obtained support the idea that TF is a suitable candidate to be used in treatment of GBM. Additionally studies must be accomplished in the future.

Specific Transfer Factor Protects Mice Against Lethal Toxoplasmosis

Rodríguez A,^{1 2} Vila I,³ Moya A,⁴ Hernández J,⁴ Solarana L,⁴
Cadiz A,⁴ Limonta M,⁵ Rodríguez JO,² Fachado A,^{2 6}

¹Dpto. Inmunología. ICBP "Victoria de Girón". Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana.

²Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana. ICBP "Victoria de Girón". Departamento de Inmunología. Habana. Cuba.

³Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM). Dpto. Cultivo de Tejidos. Habana. Cuba.

⁴Instituto de Investigación-Producción de Sueros y Vacunas Carlos J. Finlay. Habana. Cuba.

⁵Instituto de Hemantología. Habana. Cuba. ⁶Laboratorio de Autoinmunidad e Inmunoregulación. Departamento de Inmunología. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Brazil.

Toxoplasmosis is an infection caused by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. From the medical point of view is an important health problem, especially in immunocompromised individuals and pregnant women by the abortion risk and other clinical consequences.

Chemotherapy is not adequate for this group of patients. By the other hand, transfer factors are small molecular weight protein immunomodulators that transfer the ability of express cell-mediated immunity from immune donor to nonimmune recipient. The aim of this study was determine the effectiveness of specific transfer factor to *Toxoplasma gondii* antigens.

The experiment described in this report are the obtaining of a specific transfer factor preparation to total antigens of *Toxoplasma gondii* in OF1 mice, measurement of the delayed type hypersensitivity in a dose response manner. Doses of 10^6 , 10^7 and 10^8 spleen cell equivalent were assayed. Mice administered with all doses of transfer factor showed a significant dose response effect and a survival record between 80 and 90 % to lethal challenges with the virulent RH strain of the parasite. Despite, control group had 90 % of mortality. Consequently, these findings suggest that the use of transfer factor may enhance the cellular immunity against the parasite infection and therefore to have a possible use in immunotherapy.