



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.

TESIS DOCTORAL
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE ALICANTE

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

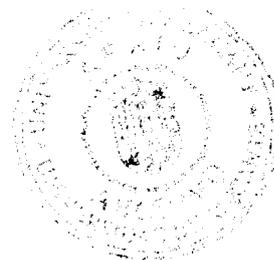
**EFFECTOS IN VITRO DE ANAPSOS (POLYPODIUM
LEUCOTOMOS) SOBRE FENOTIPO CELULAR Y
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS**

Presentada por: José Miguel Sempere Ortells
Médico Inmunólogo.

Dirigida por: Prof. Dr. D. Adolfo Campos Ferrer
Departamento de Medicina y Psiquiatría
Universidad de Alicante.

V^oB^o del Departamento de la Tesis:

Fdo.: Adolfo Campos Ferrer





DEDICATORIA

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A Amparo y a Roberto, por su paciencia, comprensión y constante estímulo
y apoyo.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. D. Adolfo Campos Ferrer, por su permanente estímulo durante la dirección de esta tesis y su ayuda en la realización de la misma.

A Dña. Clara Rodrigo Mollá, por su inestimable colaboración durante la elaboración de este trabajo.

A D. Eliseo Quintanilla Almagro, por haberme dado la oportunidad y proporcionado los medios necesarios para investigar con el producto Anapsos.

Al Dr. D. José María Zabay Becerril, por haber intervenido de un modo decisivo en mi formación como inmunólogo.

Al Prof. Dr. D. Juan José Bayona de Perogordo, por su magisterio interdisciplinar.

A aquellos compañeros de A.S.A.C, que desinteresadamente donaron su sangre para poder realizar el presente trabajo, y a D. Miguel Angel Carrión por su asesoramiento informático.



TABLA DE ABREVIATURAS

α -MSH:	alfa-melato hormona
aa:	aminoácidos
AcMo:	anticuerpos monoclonales
ACTH:	hormona adrenocorticotropa
ADCC:	citotoxicidad dependiente de anticuerpo
AMPc:	adenosín monofosfato ciclíco
ANP:	anapsos
APC:	célula presentadora de antígeno
C3:	factor 3 del sistema del Complemento
C5a:	factor 5 del sistema del Complemento
CD:	antígenos de diferenciación (cluster differentiation)
CID:	coagulación intravascular diseminada
Con A:	concanavalina A
CRF:	factor de liberación de ACTH
CSF:	factor estimulante de colonias
CSIF:	factor inhibidor de la síntesis de citocinas
DTH:	hipersensibilidad retardada
EBV:	virus de Epstein-Barr
e.s.m:	error estandar de la media
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
G-CSF:	factor estimulante de colonias granulocíticas
GM-CSF:	factor estimulante de colonias mielomonocíticas
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrógeno
ICAM:	molécula de adhesión intercelular
Ig:	inmunoglobulinas



IgS: inmunoglobulinas de superficie

IL: interleucinas

IL-1R: receptor para la interleucina-1

IL-1Ra: antagonista del receptor de la IL-1

IL-2R: receptor para la interleucina-2

INF: interferón

Kd: kilodaltons

LAK: células asesinas activadas por linfocinas

LB: linfocito B

LCR: líquido cefalorraquídeo

LGL: linfocitos grandes granulares

LH: hormona lutea

LPS: lipopolisacárido bacteriano

LT: linfocito T

LTB4: leucotrieno B4

LTc: linfocito T citotóxico

LTH: linfocito T cooperador (helper)

LTs: linfocito T supresor

M-CSF: factor estimulante de colonias monocíticas

MHC/HLA: complejo mayor de histocompatibilidad

MIF: factor de inhibición de los macrófagos

NGF: factor de crecimiento nervioso

NK: células asesinas naturales (natural killer)

NO: óxido nítrico

PAF: factor de activación plaquetaria

PBMNc: células mononucleares de sangre periférica

PDGF: productos de degradación del fibrinógeno



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

PE: ficoeritrina

PGE2: prostaglandina E2

PHA: fitohemaglutinina

PKC: proteín cinasa C

Pm: peso molecular

PMA: ésteres de forbol

PMN: leucocitos polimorfonucleares

PWM: pokeweed mitogen

RI: respuesta inmune

SI: sistema inmune

SMF: sistema mononuclear fagocítico

SMM: sistema monocito/macrófago

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

STH: somatotropina (hormona del crecimiento)

Tac: cadena alfa del receptor de la IL-2

TC: tercer color

TCR: receptor del linfocito T

TGF- β : factor de transformación del crecimiento beta

TIL: linfocitos infiltradores de tumor

TNF: factor de necrosis tumoral

TSH: tiroestimulina (hormona estimulante del tiroides)

VLA: antígenos muy tardíos

\bar{x} : media aritmética

ÍNDICE	1
I. INTRODUCCIÓN	7
1.1. CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE: LINFOCITOS, FAGOCITOS MONONUCLEARES Y FAGOCITOS POLIMORFONUCLEARES	7
1.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS Y FAGOCITOS MONONUCLEARES. FUNCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE	10
1.2.1. ANTÍGENOS EXPRESADOS EN LOS LT	10
1.2.2. ANTÍGENOS EXPRESADOS EN LOS LB	13
1.2.3. ANTÍGENOS EXPRESADOS EN LAS CÉLULAS NK	14
1.2.4. ANTÍGENOS EXPRESADOS EN LAS CÉLULAS MIELOIDES	16
1.2.5. ANTÍGENOS EXPRESADOS EN LOS LEUCOCITOS ACTIVADOS	17
1.3. CITOCINAS. FUNCIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE	18
1.3.1. INTERLEUCINA 1	20
1.3.1.1. ESTRUCTURA	20
1.3.1.2. CÉLULAS SECRETORAS	20
1.3.1.3. INDUCTORES	21
1.3.1.4. ACCIONES BIOLÓGICAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE	22
1.3.1.4.1. Sobre los LT Helper	22
1.3.1.4.2. Sobre los LT citotóxicos	23
1.3.1.4.3. Sobre los LT supresores	23
1.3.1.4.4. Sobre los LB	23
1.3.1.4.5. Sobre la células NK	23
1.3.1.4.6. Sobre los monocito/macrófago	23

1.3.1.5. ACCIONES GENERALES	24
1.3.1.5.1. Secreción de otras citocinas y mediadores	24
1.3.1.5.2. Actividad antitumoral	25
1.3.1.5.3. Interacción con el sistema nervioso	26
1.3.1.5.4. En la hematopoyesis	27
1.3.1.5.5. En la inflamación	28
1.3.1.5.6. Otras acciones	29
1.3.1.6. INHIBIDORES	29
1.3.1.7. RECEPTORES	30
1.3.2. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL	31
1.3.2.1. ESTRUCTURA	31
1.3.2.2. CÉLULAS SECRETORAS	32
1.3.2.3. INDUCTORES	32
1.3.2.4. ACCIONES BIOLÓGICAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE	33
1.3.2.5. ACCIONES GENERALES	35
1.3.2.5.1. Secreción de otras citocinas y mediadores	35
1.3.2.5.2. Actividad antitumoral	35
1.3.2.5.3. Interacción con el sistema nervioso	36
1.3.2.5.4. En la hematopoyesis	36
1.3.2.5.5. En la inflamación	36
1.3.2.5.6. Caquexia	37
1.3.2.5.7. En la resistencia a infecciones	37
1.3.2.5.8. Otras acciones	38

1.3.2.6. INHIBIDORES	38
1.3.2.7. RECEPTORES	39
1.3.3. INTERLEUCINA 2	40
1.3.3.1. ESTRUCTURA	40
1.3.3.2. CÉLULAS SECRETORAS	41
1.3.3.3. INDUCTORES	41
1.3.3.4. ACCIONES BIOLÓGICAS	42
1.3.3.4.1. Sobre los LT	42
1.3.3.4.2. Sobre los LB	43
1.3.3.4.3. Sobre las células NK	43
1.3.3.4.4. Sobre los monocitos/macrófagos	43
1.3.3.4.5. Sobre la red de citocinas	44
1.3.3.5. INHIBIDORES	44
1.3.3.6. RECEPTORES	44
1.3.4. INTERFERÓN GAMMA	47
1.3.4.1. ESTRUCTURA	47
1.3.4.2. CÉLULAS SECRETORAS	48
1.3.4.3. INDUCTORES	49
1.3.4.4. ACCIONES BIOLÓGICAS	49
1.3.4.4.1. Sobre los LT y los LB	50
1.3.4.4.2. Sobre las células NK	52
1.3.4.4.3. Sobre los monocitos/macrófagos	52

1.3.4.4.4. Sobre los leucocitos polimorfonucleares	53
1.3.4.4.5. Sobre la red de citocinas	53
1.3.4.5. INHIBIDORES	54
1.3.4.6. RECEPTORES	55
1.3.5. INTERLEUCINA 4	56
1.3.5.1. ESTRUCTURA	56
1.3.5.2. CÉLULAS SECRETORAS	56
1.3.5.3. INDUCTORES	57
1.3.5.4. ACCIONES BIOLÓGICAS	57
1.3.5.4.1. Sobre los LT y las células NK	58
1.3.5.4.2. Sobre los LB	59
1.3.5.4.3. Sobre las células mielomonocitarias	60
1.3.5.5. INHIBIDORES	61
1.3.5.6. RECEPTORES	61
1.3.6. INTERLEUCINA 10	63
1.3.6.1. ESTRUCTURA	63
1.3.6.2. CÉLULAS SECRETORAS E INDUCTORAS	64
1.3.6.3. ACCIONES BIOLÓGICAS	64
1.3.6.3.1. Propiedades inmunosupresoras "in vitro"	64
1.3.6.3.2. Propiedades inmunoestimulantes "in vitro"	67
1.3.6.3.3. Propiedades "in vivo"	68

1.3.6.4. INHIBIDORES	69
1.3.6.5. RECEPTORES	69
1.4. LA RESPUESTA INMUNE	70
1.4.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T HELPER	72
1.4.2. LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CITOTÓXICOS	74
1.4.3. LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B	74
1.4.4. LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T SUPRESORES	75
1.5. MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE. INMUNOSUPRESORES E INMUNOMODULADORES	76
1.5.1. INMUNOSUPRESORES	76
1.5.1.1. CORTICOSTEROIDES	76
1.5.1.2. DROGAS CITOTÓXICAS	80
1.5.1.3. CICLOSPORINA	81
1.5.2. INMUNOMODULADORES	84
1.6. ANAPSOS: EXTRACTO DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS	87
II. OBJETIVOS	90
III. MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO	91
3.2. MUESTRA DEL ESTUDIO	92
3.3. TESTS DE LABORATORIO	92

3.3.1. RESPUESTA PROLIFERATIVA FRENTE A MITÓGENOS	92
3.3.2. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS	93
3.3.3. ANÁLISIS FENOTÍPICO	94
3.4. ESTADÍSTICA	95
IV. RESULTADOS	96
4.1. PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA	96
4.2. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS	97
4.3. ANÁLISIS FENOTÍPICO	101
V. DISCUSIÓN	104
VI. CONCLUSIONES	117
VII. BIBLIOGRAFÍA	119
ÍNDICE DE FIGURAS	145
ÍNDICE DE TABLAS	147



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

I.- INTRODUCCION



I. INTRODUCCIÓN

1.1 CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE: LINFOCITOS, FAGOCITOS MONONUCLEARES Y FAGOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

El Sistema Inmune (SI) comprende diferentes tipos de células, incluyendo los linfocitos, fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos) y fagocitos polimorfonucleares (granulocitos). Estas células median funciones inmunes distintas y secretan una gran variedad de sustancias solubles que regulan el SI así como la inflamación y las funciones de otros tejidos y órganos (1).

Existen tres tipos diferentes de linfocitos: linfocitos T (LT), linfocitos B (LB) y células Natural Killer (NK) (1).

Los LT y LB pueden reconocer más de 10^{11} antígenos diferentes mediante sus receptores glicoproteicos de membrana, que son el receptor antigénico del LT (TCR) y las inmunoglobulinas de superficie (IgS), respectivamente. Estos receptores del LT y LB se generan respectivamente mediante la recombinación somática de elementos genéticos, durante el desarrollo de dichas células en el timo y en la médula ósea (2,3).

Las IgS de los LB se unen "directamente" a muchos tipos de antígenos, incluyendo proteínas, carbohidratos o lípidos. Por el contrario, el receptor antigénico

de la célula T, solamente se une a antígenos peptídicos que a su vez estén unidos a moléculas del tipo I o II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC/HLA), dispuestas a lo largo de la membrana de las células presentadoras de antígeno (APC). La unión de estos receptores de los LT o LB con el correspondiente antígeno, se traduce en una activación y proliferación de dichas células, y en la consiguiente liberación de factores solubles (citocinas) que inhiben o aumentan otros aspectos de la Respuesta Inmune (RI) (3,4).

Una característica importante y probablemente exclusiva de los linfocitos T y B es la "memoria inmunológica", a través de la cual, son capaces en un momento dado de recordar la exposición previa a un antígeno determinado y de responder rápida y enérgicamente tras la reexposición al mismo antígeno (1).

El tercer tipo de linfocitos, **la célula NK o agresora natural**, al contrario que el LT y LB no tiene memoria inmunológica y no expresa un receptor antigénico resultante del reordenamiento génico (no sufren reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas ni del receptor del LT). A diferencia de los LT, la célula NK no requiere de la presencia del MHC para reconocer a sus dianas (5).

Los fagocitos mononucleares (monocito/macrófago) son células fundamentales para la puesta en marcha y desarrollo de la respuesta inflamatoria, encargándose principalmente de la fagocitosis de aquellos agentes patógenos de crecimiento intracelular (determinadas bacterias, hongos y parásitos). Su capacidad de ingestión y de adherencia se ve intensificada cuando se unen a los microorganismos a través de

receptores especializados para ciertos carbohidratos, inmunoglobulinas (Ig) y Complemento.

Los monocitos y macrófagos pueden también comportarse como células presentadoras de antígeno a linfocitos T específicamente sensibilizados, y de esta forma responder de manera rápida a la eliminación del antígeno extraño, y posteriormente regular la respuesta una vez que el antígeno haya sido eliminado. En determinadas circunstancias, también adquieren actividad tumoricida (6-8).

Los granulocitos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, basófilos y eosinófilos, reciben estos nombres de acuerdo con la tinción histológica de los gránulos que poseen en su citoplasma. Aunque estas células no muestran ningún tipo de especificidad para los antígenos, desempeñan un papel importante en la inflamación aguda y en la protección contra los microorganismos, especialmente aquellos de crecimiento extracelular (determinadas bacterias, hongos y parásitos) (9). Los neutrófilos representan más del 90% de los granulocitos circulantes y su función primaria es la fagocitosis (10). Los eosinófilos representan el 2-5% de los leucocitos sanguíneos; aunque también son capaces de fagocitar, su función primaria radica en el papel especializado que ejercen contra las infecciones por helmintos (11,12). Los basófilos representan menos del 0'2% de los leucocitos sanguíneos, y junto con los mastocitos poseen gránulos en su interior que contienen diversos mediadores farmacológicos, que tras la estimulación antigénica (alergeno) son liberados al plasma desencadenando los síntomas adversos de la alergia; también pueden fagocitar (13,14).

1.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS Y FAGOCITOS MONONUCLEARES. FUNCIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE.

Las células del SI van a realizar su función a través del contacto célula-célula, mediante una serie de receptores o antígenos de membrana que se expresan en gran número a lo largo de su superficie. Algunas de estas moléculas aparecen en determinados estadios de la diferenciación o en la activación celular, durante breves períodos de tiempo, mientras que otras son características de distintas líneas celulares. Muchos de ellos son identificables desde hace tiempo en el laboratorio, mediante anticuerpos monoclonales (AcMo). En un intento de clasificar a los antígenos de superficie celular de los leucocitos humanos y de proveer una nomenclatura uniforme para dichas estructuras, se celebró en el año 1982 en Paris, un Workshop Internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, donde se acordó denominar a estos antígenos con las siglas "CD" (Cluster of Differentiation) (1).

1.2.1 Antígenos expresados en los LT:

Los cuatro genes del receptor antigénico de las células T (α , β , γ , δ), codifican glicoproteínas que forman heterodímeros de las subunidades α y β o γ y δ . TCR $\alpha\beta$ se expresa en aproximadamente el 95% de las células T humanas, y es el responsable del reconocimiento de los péptidos extraños asociados con antígenos propios del MHC de clase I o II (15-18). Estos heterodímeros de TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, para

poder expresarse en la superficie de la célula requieren su asociación a CD3, un complejo compuesto por varias cadenas de proteínas diferentes (4). Así, mientras los heterodímeros TCR se unen al antígeno, las proteínas CD3 median las señales de transducción celular, resultando en la activación subsecuente del LT. La expresión de las diferentes proteínas que comprenden el CD3 parecen ser linaje-específicas, por lo que el anticuerpo monoclonal anti-CD3 constituye el marcador más fiable para la identificación y cuantificación de los LT (4,19). Los LT representan el 65-75% del total de linfocitos en sangre periférica.

El antígeno CD4 es una glicoproteína de membrana de 59 Kilodaltons (Kd) que interactúa específicamente con moléculas MHC de clase II (DR, DP, DQ) (20). El antígeno CD8 es una estructura de dos cadenas, compuesta de heterodímeros de subunidades α y β y de homodímeros de subunidades α ; la mayor parte de los AcMo disponibles comercialmente, reaccionan solo con la subunidad α . La glicoproteína CD8, reacciona con moléculas MHC de clase I (A, B, C) (21-23). La interacción entre CD4 o CD8 y las moléculas MHC, facilita la activación del LT iniciada por la unión del complejo TCR al antígeno específico (24-26).

Los LT inician la RI, median respuestas efectoras específicas de antígeno, y regulan la actividad de otros leucocitos mediante la secreción de factores solubles. Las funciones efectoras de los LT incluyen la **citotoxicidad mediada por células** y la **inmunidad mediada por células (respuesta de hipersensibilidad retardada o DTH)**. El aumento de la activación y diferenciación de otros LT y de LB, la supresión de la RI (función supresora) y la secreción de potentes citocinas como el

Interferón gamma (INF- γ) y determinadas interleucinas (IL), constituyen las funciones reguladoras de las células T sobre muchos leucocitos y sobre otras células del Organismo no inmunes (27). Pueden distinguirse dos subpoblaciones principales de LT maduros según la expresión de los antígenos de diferenciación CD4 y CD8 (28-32):

- "La subpoblación de LT CD4+CD8-, recibe el nombre de cooperadora o inductora (TH, o helper/inducer), debido a su capacidad para aumentar las respuestas mediadas por LB y para amplificar la respuesta mediada por células efectoras CD4-CD8+. En sangre periférica, representan un 65-70% del total de LT. Tras la exposición al antígeno-MHC II, las células CD4+CD8- se activan y proliferan. Las células activadas secretan factores solubles o citocinas (IL-2 y otras interleucinas, factores estimulantes de colonias, factor de necrosis tumoral alfa, e INF- γ), que modulan las funciones efectoras ejercidas por otros leucocitos como los LB, células NK y monocitos, estimulando su crecimiento, activación y proliferación de un modo policlonal, independiente de antígeno.
- La población de LT CD4-CD8+ media la mayoría de las respuestas citotóxicas antígeno-específicas, ejerciendo su capacidad para matar a otras células, especialmente células infectadas por virus, células tumorales, o células alogénicas provenientes del trasplante de un órgano o tejido. Las células CD4-CD8+, reconocen al antígeno peptídico expuesto en la superficie de la célula diana y asociado a moléculas MHC propias de clase I. Tras el reconocimiento del antígeno, los linfocitos T citotóxicos (LTc) CD8+ se activan y destruyen a la célula diana; también pueden secretar

determinadas citocinas como la IL-2 o el INF- γ , las cuales pueden aumentar las respuestas inmunes mediadas por otros leucocitos. Pero además de la función citotóxica, la subpoblación de células T CD4-CD8+ puede también suprimir respuestas inmunes mediadas por otros leucocitos, a partir de la secreción de determinados factores supresores solubles que interfieren con la función de otras células inmunes. Es por ello por lo que se denomina a dicha subpoblación de linfocitos T, citotóxica/supresora.

Si bien lo descrito anteriormente para los linfocitos T cooperadores o los citotóxicos/supresores es la norma, también es cierto que la población de linfocitos T CD4+CD8-, puede en determinadas circunstancias mediar citotoxicidad e inmunosupresión".

El antígeno CD5 es una glicoproteína de 67 Kd que se expresa en la mayoría de las células T, y con una intensidad menor en una subpoblación de LB. Es otro antígeno comúnmente usado para fenotipar (identificar y cuantificar) a los LT (32,33).

1.2.2 Antígenos expresados en los LB:

El marcador más clásico de las células B lo constituyen las inmunoglobulinas de superficie (IgM e IgD). Sin embargo, hay que tener especial cuidado cuando se usan reactivos específicos contra la IgM o la IgD para la identificación de dichos linfocitos, ya que muchas células no B que expresan receptores para el Fc de la IgG,

pueden fijar inespecíficamente estos reactivos y de esta forma ser inapropiadamente enumeradas como células B (34).

El antígeno CD19, es una glicoproteína de 90 Kd que aparece en las células pre-B antes de que éstas adquieran las inmunoglobulinas de superficie, y que sigue presente en la mayor parte de la secuencia de maduración de las células de la línea B. Por ello constituye el marcador más fiable para identificar y cuantificar al LB (34).

Otro antígeno comúnmente utilizado para fenotipar al LB es el CD20, ya que se encuentra en cantidades más altas que el CD19 en la superficie celular. No obstante, este antígeno aparece más tarde en la diferenciación celular, y además también puede expresarse en cantidades más bajas en una subpoblación de linfocitos T (34).

Tras ser activados por el antígeno, se transforman en células plasmáticas, que son las que van a secretar los anticuerpos específicos frente a los distintos antígenos. Son pues los responsables de la inmunidad humoral. También pueden actuar como APC a los linfocitos T (1,34).

1.2.3 Antígenos expresados en las células NK:

Las células NK expresan los antígenos de diferenciación CD16 y CD56, pero no expresan CD3. En células NK en reposo, el CD16 es expresado en niveles mucho más altos que el CD56, por lo que constituye uno de los marcadores de elección para

identificar y cuantificar a dichas células; no obstante, hay que tener en cuenta que aproximadamente un 10% de NK de sangre periférica pueden no expresar el CD16. El fenotipo de la población NK será pues CD3-CD16+ y/o CD56+. Son responsables de mediar citotoxicidad contra algunas células infectadas por virus o contra células tumorales. A diferencia del LTc, los linfocitos NK son capaces de reconocer y matar tanto a las células tumorales autólogas como a las alogénicas, sin necesidad del reconocimiento de moléculas MHC en la superficie de la célula diana; su capacidad citotóxica no está pues restringidas por el MHC (35). No obstante, su papel fundamental es probablemente en la defensa contra la infección viral. A causa de que no requieren una exposición previa al antígeno para responder (carecen de memoria inmunológica), pueden proporcionar la defensa inicial contra los virus, durante el período de latencia que tiene lugar antes del desarrollo de anticuerpos y de los LTc específicos contra el antígeno. Representan un 10-15% del total de linfocitos de sangre periférica (5).

Además de su actividad NK, dichas células median también la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), mecanismo a través del cual una célula efectora citotóxica puede matar a una célula diana recubierta en su superficie por anticuerpos. La unión con el anticuerpo fijado a la célula diana y la consiguiente transducción de señales, tiene lugar a través del antígeno CD16. Esta glicoproteína es un receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, especialmente de la IgG1 e IgG3, y está presente en las células NK y en una pequeña subpoblación de LT que también expresan el CD16 y que por tanto median igualmente ADCC; dicho marcador también puede ser expresado en neutrófilos y en monocitos activados. La ADCC proporciona

a las células NK un mecanismo para, usando la especificidad de los anticuerpos por el antígeno, poder dirigir su actividad citotóxica (35).

Tras su activación, son también capaces de secretar determinadas citocinas, como la IL-2 o el INF- γ , pudiendo de esta forma ejercer un efecto modulador en el crecimiento, proliferación y activación policlonal de otros leucocitos (5).

Otros antígenos que pueden expresar las NK son poco específicos de las mismas, ya que se hallan también presentes en otras líneas celulares. Es el caso del CD2, CD7, CD8, CD11b o CD57. Concretamente el CD8 se expresa en aproximadamente un tercio de las células NK, pero con menor intensidad que en los LT citotóxicos/supresores (5,35).

1.2.4 Antígenos expresados en las células mieloides:

Al contrario de lo que ocurre con los linfocitos, donde los antígenos de superficie se han usado para definir un número de subpoblaciones funcionalmente distintas, los monocitos maduros y los granulocitos son más homogéneos. Los niveles de la mayoría de los antígenos de membrana detectados en las células mieloides, indican su estadio de diferenciación, más que delinear poblaciones funcionalmente distintas. Así, las células progenitoras mieloides expresan inicialmente CD34, una glicoproteína considerada como un marcador de todas las células madre hematopoyéticas, y CD33, una glicoproteína que se expresa comúnmente en las leucemias mieloides agudas (36). La maduración en la línea monocítica tiene lugar

con la pérdida del CD34 y la adquisición del CD11b (receptor para el complemento de tipo 3) y del CD14. La pérdida de CD34 y CD33 también acompaña la diferenciación a neutrófilos maduros, con la ganancia del CD11b, y de otros antígenos como el CD15 y el CD16-I durante los últimos estadios de desarrollo (36).

1.2.5 Antígenos expresados en leucocitos activados:

Los leucocitos, y de un modo especial los LT, sufren cambios sustanciales en la expresión de los antígenos de membrana, tras la estimulación inmune. Este proceso se acompaña de una regulación a la baja o a la alta de ciertos antígenos preexistentes, así como de la expresión de novo de otras estructuras. Antígenos preexistentes como el CD38 (una antígeno de función desconocida, también expresado en timocitos, células NK y células plasmáticas), aumentan su expresión después de la estimulación (37). También aparecen otros antígenos que habitualmente están ausentes o presentes en bajas cantidades en los LT en reposo; así, en las dos primeras horas tras la activación de la célula T, aparece el CD69, seguido varias horas más tarde de la aparición de HLA-DR, CD25 (subunidad p55 del receptor de baja afinidad de la interleucina-2) y CD71 (receptor para la transferrina) (37). Las diferentes isoformas del antígeno CD45, una fosfatasa de membrana, permite discriminar células T "naïve" (o vírgenes; aquellas que no han tenido contacto previo con el antígeno), de células T de memoria; así la isoforma CD45RA (220 Kd) se expresa preferentemente en las células T "naïve", mientras que tras la activación, hay conversión hacia otra isoforma, el CD45RO (180 Kd), que es la que persiste en las células de memoria (37).

1.3.- CITOCINAS. FUNCIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE.

Todas estas células, aparte de realizar sus funciones por contacto directo célula-célula, a través de sus receptores específicos, secretan diversos factores solubles, denominados citocinas. Constituyen un grupo de mediadores peptídicos que actúan como señales intercelulares "regulando" las respuestas inmunológica, inflamatoria o reparadora del huésped frente a una noxa de cualquier tipo. Son pues inmunomoduladores (1). Muchas de estas glicoproteínas "hormone-like" son secretadas en el curso de respuestas inmunológicas e inflamatorias. Las producidas por los linfocitos son llamadas **linfocinas**, mientras que las producidas por los monocitos-macrófagos son llamadas **monocinas** (38). Se diferencian de las inmunoglobulinas en la falta de especificidad por los antígenos y en que son operantes a concentraciones mucho más bajas (niveles de picogramos), similares al rango de actuación de las hormonas endocrinas. Pero se diferencian de éstas en que por regla general actúan localmente, de manera paracrina (en células vecinas dentro de un tejido; así es como actúan también los neurotransmisores) o autocrina (directamente sobre las propias células productoras), más que de un modo endocrino en células diana a distancia. Se diferencian de los neurotransmisores en que no están previamente preformados esperando ser liberados, sino que son sintetizados "de novo" tras la estimulación. Se trata de péptidos o glicopéptidos, cuyo Pm oscila entre 10.000 y 200.000 daltons, y cuya acción es ejercida a través de la unión a receptores celulares de superficie de alta afinidad. Las células normales en reposo y la mayoría de las líneas celulares deben ser por tanto previamente estimuladas (activadas) para

producirlas (38). Son muchas las citocinas secretadas por las células activadas y es difícil aislar unas de otras, así como delimitar claramente sus funciones, sobre todo teniendo en cuenta que citocinas con actividades biológicas distintas per se, pueden tener efectos similares al poner en marcha la producción de una cascada o red de citocinas idénticas, que a su vez pueden activar a otras citocinas, y así sucesivamente, formando un complejo entramado difícil de interpretar (1,38). Podríamos subdividir las en varios grupos: Factores de Crecimiento.- son segregados sobre todo por células no inmunes, normales o neoplásicas, procedentes de muchos tejidos, aunque algunos de ellos también pueden ser segregados por los macrófagos; Factores Estimulantes de Colonias granulocíticas (G-CSF), monocíticas (M-CSF) y mielomonocíticas (GM-CSF).- actúan sobre médula ósea, favoreciendo la producción por parte de ésta, de células del Sistema Mieloide; Factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y β).- es el responsable de la mayor parte de la actividad tumoricida de los monocitos humanos; posee muchos efectos en común con la IL-1, tanto sobre los leucocitos como sobre otros tejidos del Organismo); Interferones alfa, beta y gamma (INF- α , β y γ).- presentan actividad anti-vírica, anti-tumoral e inmunomoduladora) e Interleucinas (de la IL-1 a la IL-17) (38).

El papel de las citocinas en la respuesta inmunitaria se conoce sobradamente desde hace tiempo (39). Así, citocinas como la IL-1 β o el TNF- α , juegan un importante papel en la regulación de las funciones del monocito, la célula B y la célula T (40) y entre otras funciones, constituyen mediadores importantes en la inflamación, compartiendo multitud de efectos (41-43).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.3.1 INTERLEUCINA-1

1.3.1.1 ESTRUCTURA: La IL-1 (tanto humana como murina), existe en dos formas funcionalmente activas: IL-1 α e IL-1 β , codificadas por dos genes separados situados en el cromosoma 2 y sintetizadas como precursores de 30 Kd que, posteriormente, se fragmentan para dar las moléculas activas con Pm de 17 y 18 Kd; ambas tienen una homología en su secuencia del 45% (44-46). La actividad IL-1 puede detectarse en lisados celulares (en su forma intracelular), en células fijadas (en su forma de unión a la membrana; solo la forma IL-1 α se encuentra en la membrana, anclada como forma glicosilada fijada a las lecitinas y con un Pm de 23 Kd) y también en fluidos corporales y sobrenadantes (en su forma secretada), aunque a concentraciones muy bajas (47-49).

Al contrario que otras citocinas, la IL-1 puede almacenarse; es decir, puede haber inducción intracelular y no secreción. Las formas intracelulares son básicamente las precursoras de 30 Kd y para la secreción (no para la síntesis) se requiere de la presencia de proteínkinasa C (PKC). La forma proIL-1 β es inactiva y al salir de la célula, libera la IL-1 β activa de 17 Kd (48,49).

1.3.1.2 CÉLULAS SECRETORAS: Muchos tipos celulares, normales y transformados, son capaces de producir la IL-1 "in vitro"; los monocito/macrófagos (monocitos circulantes, alveolares, peritoneales, esplénicos, placentarios, células de

Kupffer, microglía), queratinocitos, células mesangiales del riñón, células del epitelio corneal, linfocitos T, linfocitos B, NK, astrocitos, células endoteliales, células de Langerhans, células dendríticas, fibroblastos, neutrófilos y células musculares lisas (50). De todas ellas, las células del sistema monocito/macrófago (SMM) (secretan predominantemente IL-1 β) (51) y los queratinocitos (52) son los mayores productores "in vivo".

1.3.1.3 INDUCTORES:

- algunas células y líneas celulares son capaces de producir constitutivamente bajos niveles de IL-1, en ausencia de cualquier estímulo. Tal es el caso de los queratinocitos y las células epidérmicas tímicas por ejemplo (53).

- la mayor parte de células normales necesitan ser previamente estimuladas por distintos agentes para producir IL-1. Así por ejemplo, los monocitos no la producen constitutivamente, sino a través de diversos estímulos:

.... Externos: como pueden ser productos microbianos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) u otras endotoxinas, exotoxinas, hemaglutininas víricas, radiaciones ultravioleta, cristales de urato o de sílice (50,54).

... Endógenos: como el factor 5 del Complemento (C5a), neuromediadores, TNF- α (55), factor de transformación del crecimiento (TGF-B) (56), IL-2 (57) e incluso la propia IL-1 (efecto autocrino) (58).

.. Los linfocitos T también pueden inducir la producción de IL-1 por los macrófagos, durante el contacto celular que se da en la presentación antigénica restringida por el MHC (57).

. Puede también producirse fisiológicamente en algunos tejidos normales, como en el líquido amniótico (59) y en la orina (60), piel (61), cerebro en desarrollo (62) e incluso en el cerebro adulto (63).

1.3.1.4 ACCIONES BIOLÓGICAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Aunque actúa básicamente a nivel local, en el sitio de producción, también puede actuar de forma autocrina o incluso endocrina. Es una de las citocinas más pleiotrópicas (64).

1.3.1.4.1 **Sobre los linfocitos T cooperadores (TH):** Parece ser que actúa más sobre aquellos que presentan ARNm para IL-4 (son los que presentan más receptores para la IL-1) que sobre los que son capaces de segregar IL-2 (TH1) (65). Su forma de actuar sobre los LT consisten en aumentar la producción de linfocinas y receptores para dichas linfocinas, como es el caso de IL-2 e IL-2R, y de este modo inducir la proliferación linfocitaria; no induce por sí misma la proliferación, sino que lo hace en sinergia con linfocinas y otras señales, tales como mitógenos o antígenos. Es en realidad la IL-2 secretada por los LT quien induce la síntesis de ADN y la división de la células T, al unirse a su receptor (57,66).

1.3.1.4.2 **Sobre los linfocitos T citotóxicos:** Probablemente su acción sobre los LTc, más que directa, es producto de la activación previa de los linfocitos TH. El caso es que también induce la proliferación a través de la IL-2 (50).

1.3.1.4.3 **Sobre los LT supresores (LTs):** Hay menos estudios pero podría actuar sobre los LTs antagonizando su desarrollo (50).

1.3.1.4.4 **Sobre los linfocitos B:**

- Tanto individualmente como en sinergia con otras citocinas producidas por LT, tales como IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6, aumenta la secreción de anticuerpos (67).

- Aumenta la maduración de los LB; aumenta la expresión de IgS (se sintetizan las cadenas ligeras) (67).

- Aumenta la proliferación (68).

1.3.1.4.5 **Sobre células NK:** Los linfocitos grandes granulares (LGL) aumentan moderadamente su actividad NK en presencia de IL-1, probablemente como respuesta a un efecto indirecto de cascada (5)

1.3.1.4.6 **Sobre los monocitos/macrófagos:** Aumenta la capacidad de las APC para activar las respuestas inmunes dependientes de la células T (69,70).



1.3.1.5 DIANAS Y ACCIONES GENERALES.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.3.1.5.1 Estimula la secreción de citocinas y otros mediadores al actuar sobre diferentes tipos de células:

* Sobre linfocitos: TGF- β (56), IL-2 (57), IL-3 (71), IL-4 (65), IL-6 (71).

* Sobre células endoteliales y del músculo liso vascular (72,73):

- "IL-1, IL-6, IL-8, prostaglandina E2 (PGE2), factor de activación plaquetaria (PAF), GM-CSF.
- Aumenta la adhesión, aumentando la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1).
- Actúa como mitogénica y angiogénica.
- Actividad procoagulante".

* Sobre monocitos/macrófagos:

- PAF (74), GM-CSF, PGE2, IL-6, IL-1, IL-8 (75).
- Aumenta su función citocida (75).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

* Sobre neutrófilos (72,75):

- "Aumenta la adhesión, fagocitosis, y la ADCC.
- Causa degranulación y liberación de enzimas".

* Sobre condrocitos:

- IL-6, PGE2 (71).
- Aumenta el turnover del cartílago (71).

* Sobre fibroblastos (71,72,75):

- "IL-6, IL-8, TNF- β , (M, G, GM)-CSF, PGE2, productos de degradación del fibrinógeno (PDGF), IL-1.
- Aumenta la colagenasa.
- Actúa como mitógeno".

1.3.1.5.2 Actividad antitumoral: (89,90)

- Acción citostática directa en algunos casos (64,75).
- En otros casos actúa junto a IL-2 o INF- γ , aumentando la actividad NK y la de células asesinas activadas por linfocinas (LAK o lymphokine activated killer). Junto al TNF, potencian la ADCC inducida por la IL-2 (5).

- Muchas líneas tumorales son sin embargo insensibles a la IL-1 e incluso algunas de ellas aumentan su crecimiento (75,76).

1.3.1.5.3 Interacción con el Sistema Nervioso: A nivel del sistema nervioso periférico (SNP), activa los nervios simpáticos (bazo, pulmón, riñón, suprarrenales) y vía PGE2 aumenta los reflejos dolorosos. También actúa sobre el sistema nervios central (SNC), donde puede llegar vehiculada en la sangre o bien producirse localmente (77,78) y su acción se manifiesta en:

- Fiebre: "Importante en los mecanismos de defensa frente a infecciones:

... Porque inhibe la multiplicación de microorganismos.

.. Una temperatura mayor de 38'5 °C, aumenta la capacidad microbiciada de PMN, aumenta la actividad antiviral del INF, aumenta la proliferación linfocitaria, aumenta la respuesta frente a antígenos timodependientes, la acción de los LTc y la activación de la vía alterna del complemento. La actividad de los macrófagos no se modifica por temperaturas elevadas" (79).

- Sueño: IL-1 induce la fase lenta del sueño (80).

- Nutrición: IL-1 está implicado en la anorexia (79,81,82).

- Regulación:

...Actúa sobre hipotálamo aumentando el factor de liberación de la corticotropina (CRF), que actúa sobre la hipófisis aumentando la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez aumentará los niveles de corticoides, los cuales frenarán la secreción de IL-1 por los macrófagos (feed back negativo) (83-85).

..Aumenta la somatotropa u hormona del crecimiento (STH), la hormona gonadotropa luteoestimulante (LH) y la tirotrópica u hormona tiroestimulante (TSH) (86).

.Aumenta el factor de crecimiento nervioso (NGF) que actúa sobre las neuronas induciendo un aumento de la sustancia P que a su vez incrementa la producción de IL-1 por los macrófagos (regulación positiva) (87).

1.3.1.5.4 Hematopoyesis

- Prolonga la supervivencia de las células madre hematopoyéticas y aumenta su proliferación. De ahí que los animales tratados con IL-1 sobreviven a dosis letales de irradiación (75).

- Aumenta la mielopoyesis por inducción de G-CSF, GM-CSF, IL-3 e IL-5, y a su vez muchos de estos factores inducen la producción IL-1 (potenciación) (88).

- Inhibe la eritropoyesis y la linfopoyesis B, probablemente por neutralizar la acción de la IL-7 (38).

1.3.1.5.5 **Inflamación:** La IL-1 junto con otras citocinas (muchas de ellas estimuladas por la IL-1: IL-6, IL-8, TNF e INF- γ) aumenta la inflamación articular (89), lo cual se traduce en:

- "proliferación de fibroblastos, con producción de colágeno.
- In vitro induce la resorción del hueso por activación de los osteoclastos.
- Induce la secreción de colagenasa por las células sinoviales.
- Induce la secreción de proteasas y proteoglicanasas por los condrocitos" (71,75,90).
- Participa en la inflamación aguda y crónica:

...La inyección de IL-1 induce respuestas inflamatorias agudas locales que comienzan a la hora y pican a las 3-4 horas. Inicialmente los neutrófilos se adhieren a las células endoteliales (que han aumentado la expresión de moléculas de adhesión, como el ICAM-1) y se marginan a lo largo de la pared de los vasos. Esto es seguido de una infiltración por neutrófilos, y de edema (91,92).

..En contra, la liberación lenta de IL-1 de discos de acetato implantados subcutáneamente, resulta en una reacción DTH con formación de granuloma con infiltración mononuclear predominante, fibrosis y formación de nuevos vasos sanguíneos (91,92).



1.3.1.5.6 Otras acciones:

- En Hepatocitos: Induce reactantes de fase aguda que aumentan la inflamación; decrece el citocromo P450; aumenta el componente 3 del complemento (C3); aumenta el cobre plasmático y disminuye el hierro y zinc plasmáticos (75,93).

- Células beta pancreáticas: Aumenta la secreción de insulina (75).

1.3.1.6 INHIBIDORES.

- Corticoides: Impiden la producción (94). Sin embargo, tiene la capacidad de aumentar la expresión del receptor para la IL-1 (IL-1R) en LB humanos. Ello sugiere que la IL-1 puede participar en la capacidad referida de los esteroides para actuar como activadores policlonales de los LB "in vitro" e "in vivo" (68). El paradójico aumento de expresión de IL-1R en LB por drogas que son inmunosupresoras, puede servir para suprimir la inflamación, divergiendo la respuesta inmune humoral de la inmunidad celular. Así, los esteroides parecen favorecer la inmunidad humoral a expensas de la inmunidad celular, disminuyendo con ello la inflamación (95-97).

- Alfa-melato hormona (α -MSH) (95).

- Ciclosporina A (95).

- PGE2 (95,98).

- Dieta rica en ácidos grasos Omega-3 poliinsaturados (99).
- IL-4, IL-10 (100), IL-13, TGF- β (citocinas antiinflamatorias) (101).
- IL-1R antagonista (IL-1Ra): secretada también por macrófagos, células epiteliales y queratinocitos. Compite con la IL-1 para unirse al receptor; ha de haber mayor concentración de IL-1Ra que de IL-1 para notar una reducción significativa de la actividad de esta última (102).

1.3.1.7 RECEPTORES.

Son dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas (103). Los mismos receptores se unen a IL-1 α , IL-1 β , y ProIL-1 α , pero no a ProIL-1 β . Tras la unión el complejo se internaliza (104). Hay dos clonados (105):

- Tipo I: En linfocitos T, fibroblastos, células del músculo liso y endoteliales.
- Tipo II: En monocitos, LB, LT activados, placenta y neutrófilos.

Los receptores cerebrales y de órganos endocrinos son de tipo I. La IL-1 β se fija con mayor afinidad y selectividad al tipo II (105). Las señales intracelulares tras la unión IL-1/receptor, son múltiples (activación de la PKC, elevación del adenosín monofosfato cíclico intracelular o AMPc) (106-108).



1.3.2 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.3.2.1 ESTRUCTURA:

- TNF- α (cachectina) y TNF- β (linfotoxina) son miembros de una familia de genes muy próximos (6000 pares de bases), situados en el MHC (109,110).
- Presentan una serie de funciones comunes "in vitro" y se unen a los mismos receptores, por lo que tienen las mismas actividades biológicas (109).
- En cambio, su homología es muy limitada (34%) (110).
- Ambos son glicoproteínas y su origen celular es diferente (110).
- El ARNm del TNF- α es en ocasiones detectable en condiciones basales, sin estimulación, y su transcripción aumenta tras la activación, con una vida media corta de aproximadamente 30 minutos (111). En cambio, el ARNm del TNF- β tiene una transcripción basal indetectable, que aumenta tras la estimulación inespecífica, aunque no tanto como la del ARNm del TNF- α ; su vida media es más alta (aproximadamente 5.5 horas). Estos datos indican las diferencias en la regulación molecular de estos genes, que se manifiestan en la misma célula y en las mismas condiciones de activación (112,113).



1.3.2.2 CÉLULAS SECRETORAS:

- El TNF- β solo se produce por los linfocitos T (114).
- El TNF- α se produce por numerosas fuentes celulares: monocitos/macrófagos (115), neutrófilos (116), linfocitos B (117), linfocitos T (TH1-like) (118), células NK (LAK) (5,119), timocitos, queratinocitos, células mesangiales, trofoblastos, células del músculo liso, fibroblastos (120), astrocitos, células epiteliales, mastocitos, células de la microglía, células endoteliales, células de Langerhans y células granulosas del ovario (121,122).

1.3.2.3 INDUCTORES:

- La mayoría de los inductores de IL-1 también lo son de TNF- α y, si son activadores de los LT, también inducen TNF- β , aunque este último es más lento en su secreción (75).
- Citocinas y mediadores: IL-3 (para los mastocitos) (140), IL-1 (75), IL-2 (118), TNF (efecto autocrino), GM-CSF (124), ACTH (125), leucotrieno B4 (LTB4), PAF, e INF- γ junto con LPS (126,127).
- Productos microbianos: bacterias (LPS) (128), parásitos, hongos, micoplasmas, virus (129-131).

- Estímulos inmunológicos: tumores (120), GvH (132), rechazos (133), anti-CD3 (134), fragmentos de fibronectina (135).

- Otros: ejercicio, partículas de latex, zimosán, mitógenos, IgA polimérica (136), ésteres de forbol (PMA), ionóforos del Ca⁺⁺ (137).

- Puede producirse fisiológicamente durante el ciclo menstrual y la gestación, y también en la leche humana (138).

"In vivo" se encuentra en plasma o líquido cefalorraquídeo (LCR) durante las infecciones; por ejemplo, en las meningitis hay una buena correlación entre las tasas de LPS y TNF- α en el LCR (139), y en las septicemias entre los niveles plasmáticos de TNF- α , la gravedad del proceso y las posibilidades de supervivencia (140).

1.3.2.4 ACCIONES BIOLÓGICAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE:

Los múltiples efectos de los dos mediadores inflamatorios de más amplio espectro, la IL-1 y el TNF, pueden revisarse conjuntamente. Aunque sus receptores específicos de alta afinidad han sido detectados en virtualmente todas las células nucleadas, y son estructuralmente distintos, las dos citocinas comparten un alto grado de solapamiento en sus actividades inmunológicas y no inmunológicas, "in vitro". Aunque sus efectos "in vivo" también muestran muchas similitudes, el TNF exhibe

mayores efectos tóxicos, de oclusión vascular y anti-tumoral, mientras que la IL-1 es más protectora contra la radiación letal y provoca más turnover óseo (75).

*** Linfocitos T:**

- Es un factor de activación de LT y timocitos, actuando como comitógeno e induciendo la expresión de citocinas e IL-2R (141-143).

*** Linfocitos B:**

- puede coparticipar en la proliferación de los linfocitos activados, pero no en reposo.
- aumenta la producción de anticuerpos.
- aumenta la expresión de IgS (144,145).

*** monocitos/macrófagos :**

- es un activador de los mismos; induce la producción de PGE2, IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, lisozima y del propio TNF.
- aumenta la capacidad citocida y microbicida de éstos.
- al contrario que la IL-1, es quimioattractante (55,106).



1.3.2.5 ACCIONES GENERALES:

1.3.2.5.1 Estimula la secreción de citocinas y otros mediadores, al actuar sobre diferentes tipos de células:

Los efectos "in vitro" del TNF sobre los neutrófilos, células endoteliales y del músculo liso vascular, monocitos, condrocitos y fibroblastos son similares a los de la IL-1 y en algunos casos (neutrófilos, monocitos y células endoteliales) más potentes. Además el TNF es quimioattractante para neutrófilos y monocitos, y no la IL-1, y favorece una mayor adhesión de los neutrófilos a los vasos por una mayor expresión de integrinas (en sinergia con el INF- γ) (146-148).

1.3.2.5.2 Actividad anti-tumoral

Actividad tumoricida por mecanismos necrosantes o de apoptosis, mayor a la observada con IL-1 (106). Dicha acción es incrementada por la IL-1 y el INF- γ , por efecto directo (149), o por estimulación de las células NK o LAK (150).

No obstante, su utilización con fines profilácticos en el cáncer está siendo decepcionante y con numerosos efectos secundarios, ya sea solo o asociado a IL-2 o LAK (151).

1.3.2.5.3 Interacción con el Sistema Nervioso

Similar a la IL-1, pero al contrario que ésta, no es capaz de inducir la producción de CRF en hipotálamo, ni por tanto de esteroides. Sí induce la producción de PGE2 y de IL-1 (55,122).

1.3.2.5.4 Sobre la hematopoyesis

- In vitro: inhibe la eritropoyesis y la mielopoyesis (152).
- In vivo: favorece la reconstitución hematopoyética tras la quimioterapia o radioterapia, aunque menos que la IL-1 (efecto sinérgico mayor que el de cada una por separado), y ello debido a fenómenos indirectos vía producción de CSF (153).

1.3.2.5.5 Sobre la inflamación

Es responsable de la inducción de un gran número de mediadores; en este sentido tiene numerosas acciones comunes con la IL-1 (ya descritas) y con frecuencia tienen acción sinérgica (154-156).

A nivel sistémico induce coagulación intravascular diseminada (CID) (157), hiperpermeabilidad vascular (origen de edema pulmonar) e inhibe la angiogénesis in vitro (158); in vivo esto se confirma para dosis altas, mientras que las bajas la

favorecen. La sobreproducción induce fiebre, hipotensión e hipertrigliceridemia, signos característicos del shock séptico (159).

1.3.2.5.6 Caquexia

- acompañando a las infecciones crónicas de origen viral y parasitario, así como a los procesos malignos (151).

- actúa sobre los adipocitos, inhibiendo al Enzima lipoproteín-lipasa y aumentando de este modo la lipólisis, más intensamente que la IL-1 (151).

1.3.2.5.7 Sobre la resistencia a las infecciones

- aumenta la respuesta "in vitro" frente a antígenos timo dependientes e independientes. La adición de TNF- α aumenta la actividad citotóxica de macrófagos y PMN frente a bacterias y parásitos (147,148).

- "In vivo" aumenta la supervivencia de ratones con distintas infecciones (151).

- Potencia la citotoxicidad de los eosinófilos (160).

- Su efecto antivírico parece mediado por la inducción de INF- γ (151).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.3.2.5.8 Otras acciones

- mismos efectos sobre los hepatocitos que la IL-1 (161)
- no modula los niveles de insulina al contrario que la IL-1 (162)

1.3.2.6 INHIBIDORES

- el receptor soluble para el TNF: es un inhibidor fisiológico que se ha identificado en plasma, orina y sobrenadantes celulares (163,164).
- esteroides y otros fármacos como la serotonina, histamina, adrenalina, quinolonas, pentoxifilina, cloroquina, talidomida (165).
- Catepsina G, elastasa leucocitaria y otros enzimas producidos por los PMN activados, son capaces de degradarlo (151).
- IL-4 inhibe la síntesis por los monocitos activados, pero no sobre los linfocitos activados (166).
- TGF- β (101), IL-10 (167).



1.3.2.7 RECEPTORES:

- se han clonado dos receptores (168), el p55 (tipo I) y el p75 (tipo II).
- están codificados por genes diferentes, en los cromosomas 12 y 1 respectivamente (169).
- el p75 actúa como mediador de la proliferación celular y el p55 está implicado en los fenómenos de muerte celular (168).
- ambos receptores fijan a ambos TNF (168,169).
- el tipo I se encuentra en la superficie de los LB y LT, mientras que el tipo II está en los monocitos, aunque la mayoría de las células expresan los dos receptores. Se han demostrado formas solubles de los dos tipos de receptores (163,164,168).



1.3.3 INTERLEUCINA-2

1.3.3.1 ESTRUCTURA

La IL-2 es un péptido de peso molecular 15400 daltons, constituido por 133 aminoácidos y una unión disulfuro interna esencial. Ejerce numerosos efectos inmunológicos, estimulando la proliferación y la producción de linfocinas por las células T, células B y células NK. La presencia de cantidades variables de carbohidratos, resulta en formas de IL-2 de mayor peso molecular; no obstante, estos carbohidratos no son necesarios para la actividad de la molécula (170-172).

Estudios moleculares con el ADN complementario clonado de varias fuentes humanas y otras especies, indican que hay un solo gen para la IL-2, localizado en el cromosoma 4. Hay poca o ninguna homología entre la secuencia de dicha citocina y la de otros factores de crecimiento (171,172).

Tras la activación de las células T, la transcripción y la traducción de novo preceden a la secreción de la citocina. En linfocitos humanos normales estimulados con fitohemaglutinina (PHA), el ARNm de la IL-2 se acumula a las 4 horas, alcanza un máximo a las 12 horas y después decae rápidamente. La expresión máxima de la proteína se da a las 24-48 horas postactivación, y va disminuyendo paulatinamente para casi no detectarse a partir de los 3 días (173).

1.3.3.2 CÉLULAS SECRETORAS

Células T frescas aisladas, en reposo, no expresan ARNm de IL-2, ni contienen proteína IL-2. La producción de IL-2 por linfocitos T normales, requiere que las células se activen previamente por antígenos o por activadores policlonales de células T (174). Otras vías de activación de linfocitos T y timocitos, como es la unión del ligando al receptor de superficie CD2, también estimula la producción de IL-2 (175,176). Estudios de subpoblaciones aisladas de linfocitos y timocitos, muestran que la producción de IL-2 en células activadas por el antígeno se dá sobre todo en las células T cooperadoras CD4+ (24). Sin embargo, mitógenos policlonales potentes y aloantígenos MHC de clase I, pueden estimular a los linfocitos T CD8+ a que produzcan IL-2 (26). Además, una subpoblación de LGL que comparten con el linfocito T los receptores de membrana CD2 y CD6 y a los que se refiere como células NK, pueden ser inducidas por lectinas como la PHA o por factores estimulantes de colonias o INF- γ , para producir IL-2 (177).

1.3.3.3 INDUCTORES

Para la inducción y secreción de la IL-2 se necesita la activación previa de las células T con mitógenos o antígenos. Para que la producción de IL-2 sea máxima, se requiere la presentación previa del antígeno por células accesorias a los linfocitos T (15-18,24,26).

1.3.3.4 ACCIONES BIOLÓGICAS

El papel principal de la IL-2 es la expansión clonal de las células T maduras. La inducción de la proliferación linfocitaria incluye dos pasos. El primer paso es iniciado por una señal exógena, suministrada al linfocito T quiescente por el antígeno o el mitógeno (24,26); ello lleva a una activación parcial del linfocito T, que resulta en un incremento del tamaño del mismo, en la inducción de la transcripción de ciertos genes, y en el paso de la fase G_0 a la fase G_1 del ciclo celular. Una segunda señal, endógena, es necesaria para inducir progresión del ciclo celular con transición a la fase S del ciclo y finalmente a la división celular; para este segundo paso, se necesita la unión de la IL-2 a su receptor de alta afinidad (178-180).

Aunque su papel en la fisiología del sistema inmune es muy importante, sus efectos sobre las células de otros sistemas son marginales y, desde este punto de vista, es la menos pleiotrópica de las citocinas.

1.3.3.4.1 sobre clones y líneas de células T dependientes de la IL-2: la IL-2 favorece sobre todo la expansión de células CD8+ citotóxicas y aumenta su citotoxicidad; las células T cooperadoras y unas pocas líneas de células supresoras también crecen en presencia de IL-2. Además de la capacidad de estas células clonadas para liberar ellas mismas la IL-2, cooperan con células adherentes histocompatibles en presencia del antígeno específico, para liberar otras linfocinas (181-182).

1.3.3.4.2 Sobre los linfocitos B: Al igual que ocurre con las células T activadas, los linfocitos B activados y determinadas líneas de linfoblastos B transformados pueden también expresar el receptor de alta afinidad para la IL-2, y a este nivel, dicha citocina puede actuar como factor de proliferación, así como inducir la diferenciación del linfocito B a célula productora de inmunoglobulinas (principalmente IgM, aunque también IgG) (183).

1.3.3.4.3 Sobre las células NK: LGL (con actividad NK) frescas aisladas y en reposo, no expresan la cadena alfa del receptor de la IL-2 (p55 o antígeno Tac), pero sí la cadena beta (p75), la cual es necesaria para que células LGL sin estimular puedan responder a la IL-2. Tras la activación in vitro con IL-2, las LGL adquieren el p55 y el receptor de alta afinidad para la dicha citocina. En este sentido, la IL-2 estimula la proliferación y aumenta la actividad citotóxica de dichas células, induciendo en ellas además la producción de otras citocinas como el INF-gamma (5).

1.3.3.4.4 Sobre los monocitos/macrófagos: las células mieloides (precursores macrofágicos en la médula ósea y monocitos/macrófagos periféricos), expresan normalmente el antígeno Tac, aunque con baja densidad; lo habitual es por tanto que expresen receptores de baja afinidad para la IL-2. Sin embargo, la activación de los macrófagos por INF- γ o LPS, resulta en un incremento en la expresión de receptores de alta afinidad para dicha citocina. La adición posterior de IL-2 a estas células activadas, resulta en la activación de los genes Tac, GM-CSF y G-CSF, y también aumenta la actividad citotóxica y tumoricida de las mismas (184).

1.3.3.4.5- Sobre la red de citocinas: los linfocitos T activados por la IL-2, pueden producir otras citocinas como el INF- γ , la linfoxina, IL-4, IL-6, IL-3, IL-5, GM-CSF y TGF-B (72,185,186).

Fundándose en los efectos mencionados, esta citocina se utiliza como inmunomodulador en la terapia de determinados tumores, inmunodeficiencias e infecciones crónicas (186).

1.3.3.5 INHIBIDORES

- corticoides (94)
- ciclosporina A (187)
- IL-4. Los efectos de la IL-2 pueden amplificarse por IL-4 cuando se trata de la proliferación de células T, pero ambas citocinas actúan antagónicamente cuando se trata de las células NK y de los linfocitos B humanos (188,189).
- IL-10 (100)

1.3.3.6 RECEPTORES (IL-2R)

La expresión de los IL-2R es muy específica de las células implicadas en la respuesta inmune; todos los linfocitos, sean T o B, expresan el IL-2R en algún momento de su diferenciación o activación. Además, las células NK y las de la línea monocito/macrófago (incluyendo células de Langerhans y células de Kupffer) poseen

IL-2R, y también pueden expresarlo las células precursoras hematopoyéticas. Actualmente se conocen tres tipos de receptores: el de baja afinidad (constituido por una cadena alfa), el de afinidad intermedia (constituido por una cadena beta y otra gamma) y el de alta afinidad (constituido por la unión no covalente de los tres tipos de cadena (190,191).

La cadena alfa (antígeno Tac) se corresponde con el marcador de diferenciación CD25; es una glicoproteína de peso molecular 55000 daltons, que además de en la membrana puede detectarse en forma soluble en el plasma, tras la activación de las células T in vivo. Su papel en la transmisión de señales inducidas por IL-2 es muy escaso (192,193).

La cadena beta pertenece a la familia de receptores de factores hematopoyéticos. Es una glicoproteína de 75000 daltons de peso molecular, y posee una región rica en serina que juega un papel fundamental en la transmisión de señales durante la proliferación (194,195).

La cadena gamma, identificada en 1992, es una glicoproteína de 64000 daltons que también pertenece a la familia de receptores de factores hematopoyéticos. Su expresión es necesaria para la formación de receptores de afinidad intermedia y de alta afinidad (191).

El IL-2R de alta afinidad contiene las tres cadenas. La afinidad alta de este receptor por la IL-2 es consecuencia de su asociación rápida y de su disociación lenta

a dicha citocina, y es capaz de transmitir todos los efectos biológicos inducidos por la IL-2. La expresión única de las cadenas alfa no transmite ningún impulso, lo que demuestra la necesidad de las cadenas beta y gamma para que exista un receptor funcional (196). Tras su fijación al IL-2R de alta afinidad, la IL-2 se interioriza y degrada en el interior de la célula. Las etapas posteriores de la transducción, están fundamentalmente asociadas a una actividad tirosín-quinasa (178).



1.3.4 INTERFERÓN GAMMA

1.3.4.1 ESTRUCTURA

- Pese a no presentar homología con los otros dos interferones (α y β), muy distintos desde el punto de vista estructural, comparte los efectos antiviral y antiproliferativo (197).

- Su función principal es la de mediador del sistema inmunitario, con profundos efectos inmunomoduladores e inflamatorios (197).

- Está codificado por un solo gen, y el análisis en SDS-PAGE da dos bandas menores de Pm 20 y 25 Kd y otra mayor, de 45 Kd, todas ellas funcionales desde el punto de vista biológico (198).

- Es muy lábil a pH 2, propiedad usada a menudo para identificarlo (197).

- Tras la inducción, la aparición del ARNm es muy rápida (30-60 minutos) y el nivel máximo de transcripción se obtiene entre las 6 y las 18 horas, aunque su secreción es más lenta (198).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.3.4.2 CÉLULAS SECRETORAS

- A diferencia de los otros interferones, que pueden producirse por múltiples células del organismo, la síntesis de INF- γ está limitada a LT activados y a células NK (199).

- Entre los LT, lo producen tanto los CD4+ como los CD8+ tras la activación por aloantígenos o mitógenos, mientras que los antígenos solubles estimulan preferentemente su producción por los CD4+, y dentro de ellos por los TH tipo I (193,194). Los LT de memoria producen más cantidad y más rápidamente INF- γ que las no sensibilizadas; la síntesis depende de la producción previa de IL-1 por las células accesorias, e IL-2 por las células T auxiliares, lo que a su vez lleva a la producción de INF- γ que amplifica la secreción de IL-1 (200).

- Las células NK sin embargo, solo requieren una señal para producir el INF- γ : un mitógeno, un éster de forbol o una citocina, especialmente la IL-2 y/o la IL-12 (200,201).

- Otras células distintas a los leucocitos también pueden segregar INF- γ en cantidades importantes, como es el caso de las células epiteliales de la capa externa (trofoblasto) del embrión de cerdo, en el momento de su implantación en la mucosa uterina (202).

1.3.4.3 INDUCTORES

Para la inducción y secreción del INF- γ se necesita la activación con mitógenos o antígenos, junto con la producción simultánea de IL-1 por las APC, e IL-2 por los LT (199,200).

1.3.4.4 ACCIONES BIOLÓGICAS

Las relaciones entre inmunidad mediada por anticuerpos e inmunidad celular, y la resistencia o susceptibilidad a ciertas infecciones, pueden explicarse por la acción de los distintos subtipos de células TH, que se caracterizan por los diferentes patrones de producción de citocinas (185). En el hombre, la mayoría de los LT CD4+ "naïve" obtenidos de donantes sanos, tras la primera activación solo son capaces de producir inicialmente IL-2. Tras varios días de activación, se transforman en TH0 y pueden producir simultáneamente INF- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, TNF, GM-CSF, IL-10 e IL-12 o combinaciones de varias de ellas (203). Sin embargo, tras exposiciones prolongadas al antígeno y dependiendo del antígeno con el que estas células hayan sido estimuladas (no está claro si las TH0 contienen precursores comprometidos de TH1 y TH2), las TH0 se convertirán en TH tipo I secretoras fundamentalmente de IL-2 e INF- γ y que mediarán sobre todo respuestas de inmunidad celular, o en TH tipo II, secretoras fundamentalmente de IL-4 e IL-10 y que mediarán respuestas mediadas por anticuerpos. De este modo las TH1 y TH2 representan clones terminalmente diferenciados (185,188,203).

Se ha comprobado que el INF- γ , inhibe la proliferación de TH2 (y por tanto de las citocinas que estos producen) pero no de TH1. Por tanto, la mayoría de células esplénicas seleccionadas en presencia de INF- γ son TH1 y, además, la presencia de dicha citocina durante la respuesta inmune debe resultar en la expansión preferente de linfocitos TH1 (204).

Induce un estado antiviral que comparte con otros interferones, y que protege a las células contra la mayor parte de los virus (197,199,205).

También ejerce una acción de inhibición de la proliferación celular (función compartida con otros INF) y del crecimiento de tumores. Pueden aumentar o inhibir la diferenciación celular, dependiendo del tipo de célula y de la dosis de INF (199,205).

Posée efecto inmunomodulador: actúa sobre las células del Sistema Inmune, estimulándolas para sintetizar mediadores, moléculas de superficie, etc, desempeñando con ello un importante papel en las defensas del huésped (205-207). Su efecto es pleiotrópico, al igual que la IL-1 y el TNF, y del mismo modo que éstas, es también una citocina de la inflamación, aunque se segrega más tardíamente (206-209).

1.3.4.4.1 Sobre los LT y los LB

Puede actuar aumentando o disminuyendo la inmunidad celular y humoral, dependiendo de la dosis y del momento de administración a las células. "In vitro", la

adición de altas dosis de INF- γ a las células antes de ponerlas a cultivar, o simultáneamente, suprime la proliferación linfocitaria y la producción de anticuerpos, mientras que bajas dosis de INF o la adición tardía a las células en cultivo, aumenta la proliferación linfocitaria y la producción de anticuerpos. Los mecanismos por los cuales el INF- γ puede aumentar la inmunidad celular y humoral son los siguientes (205-209,210,211):

- aumento de la expresión de MHC tipo II en los LB (211).
- induce selectivamente la producción de IgG2a e inhibe otros isotipos (especialmente la IgE) en los LB (211).
- aumenta la expresión de IL-2R en LTH (especialmente TH1), así como la secreción de IL-2. Del mismo modo, aumenta la actividad de los LT CD8+ citotóxicos, jugando un papel fundamental en la activación de los linfocitos infiltradores de tumor (TIL) (210).
- aumenta la expresión de moléculas MHC tipo I en las células diana de los LTc, lo que favorece el reconocimiento (210).
- favorece la producción de otras citocinas, como la IL-1, TNF e IL-2 por parte de LT y LB (210,211).



1.3.3.4.2 Sobre las células NK

Aumenta la actividad NK de las LGL, así como de las LAK. Sin embargo, y paradójicamente, el pretratamiento de algunos tumores con INF in vitro, los hizo menos sensibles a la acción de las NK, lo cual refleja la enorme complejidad de acciones del INF en el Sistema Inmune (201,207-209).

1.3.4.4.3 Sobre los monocitos/macrófagos:

Es un factor activador e inhibidor de la migración de los macrófagos, aumentando sus funciones bactericida y tumoricida así como sus funciones accesorias; digamos que prepara a los macrófagos para que puedan llevar a cabo las reacciones de inflamación crónica o hipersensibilidad retardada, que los hace más eficaces en la eliminación de tumores y de bacterias y parásitos de crecimiento no solo extra sino también "intracelular"; todo ello de la siguiente manera (212):

- aumenta la expresión de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, lo que se traduce en un aumento de la fagocitosis de inmunocomplejos y en una capacidad aumentada de lisar bacterias, parásitos y células tumorales revestidas de anticuerpos (ADCC); por tanto aumentan también su capacidad citotóxica (212).

- aumenta la expresión de MHC tipo II en la membrana de los macrófagos, e incluso induce la expresión "de novo". Ello se traduce en un aumento de las funciones accesorias del macrófago (presentación antigénica), que le permite activar LT más eficazmente (212,213).

- aumenta la expresión de receptores de IL-2 de alta afinidad en la membrana del macrófago, lo cual favorecerá el que estos macrófagos, si existe IL-2 en el medio, vean aumentada su capacidad tumoricida (212,213).

- induce la secreción por parte del macrófago de otras citocinas, como IL-1, IL-6, TNF, así como de moléculas del complemento y prostaglandinas; también aumenta la expresión de moléculas de adhesión (212,213).

- uno de los mecanismos que intervienen en la eliminación de los gérmenes intracelulares es la destrucción del triptófano constitutivo de dichos gérmenes, mediante la activación del enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (212).

1.3.4.4 Sobre los PMN

Actúa de modo similar a como lo hace en los macrófagos, aumentando la fagocitosis y la citotoxicidad (209,214).



1.3.4.4.5 Sobre la red de citocinas:

- es antagónico de la IL-4. El tratamiento de monocitos de sangre periférica con INF- γ , inhibe la expresión del receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de la IgE, cuya síntesis se induce por la IL-4 (204).

- en los macrófagos, aumenta la síntesis de IL-1 inducida por LPS (215).

- actúa sinérgicamente con la IL-1 para inducir la síntesis de TNF- α por los astrocitos (122).

- actúa sinérgicamente con el TNF- α en la actividad antivírica frente a algunos virus (151).

- es antagónico de la IL-10 (216)

- favorece la producción de IL-1 e IL-2 por macrófagos, LT y LB (206,215).

1.3.4.5 INHIBIDORES

- corticoides (217)

- ciclosporina A (187)

- IL-4 e IL-10 (100)

- el humano recién nacido tiene disminuida su capacidad para sintetizar INF- γ (200).
- el receptor soluble (dominio extracelular) del INF- γ (218).

1.3.4.6 RECEPTORES

- Se trata de una glicoproteína específica de especie, de Pm 90 Kd, que tiene un gran dominio extracelular (228 aminoácidos), uno transmembrana (23 aminoácidos) y un dominio intracelular (221 aminoácidos), y cuyo gen estructural se halla en el cromosoma 6 (219). Para que el receptor sea funcionante, se requiere la presencia de al menos dos componentes: la proteína descrita, junto con una proteína accesoria codificada por un gen del cromosoma 21; esta última proteína es un factor transductor de señales, que también actúa de modo específico de especie (218-220).

- el dominio extracelular se está probando en forma soluble como antagonista del INF- γ (en lugar de los AcMo) (218).



1.3.5 INTERLEUCINA 4

1.3.5.1 ESTRUCTURA

- Glicoproteína de 153 aminoácidos, que incluye un péptido señal de 24 aminoácidos (221).
- Se han aislado tres variantes de 15, 18 y 19 Kd (222).
- Es un monómero compacto de aspecto casi esférico gracias a la presencia de 3 puentes disulfuro cuya integridad es indispensable para la acción biológica (221,222).
- Su estructura se compone de 4 grandes hélices alfa, y la sustitución de la tirosina 124 por ácido aspártico genera una antagonista de la IL-4 de fuerte afinidad (223).

1.3.5.2 CÉLULAS SECRETORAS

- Subpoblaciones de LT cooperadores (TH0 y TH2) (185,188,203).
- Línea mastocitos/basófilos (224).
- Grupo de células CD8+; la IL-4 sería en este caso la responsable de las propiedades supresoras de esta población (225).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.3.5.3 INDUCTORES

- Estimulación inespecífica (mitógenos) y específica (antígenos, especialmente alergenicos) (226).

- IL-2 (188,189).

- La propia IL-4 (227).

1.3.5.4 ACCIONES BIOLÓGICAS

Recordemos que los linfocitos TH tipo 2, se asocian con la producción de anticuerpos y con la alergia (226). Las citocinas segregadas por los TH tipo 2 son IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, TNF- α , GM-CSF (188). Una característica importante de los TH1 y TH2 es su capacidad para inhibirse recíprocamente y esta inhibición se manifiesta a nivel de las células efectoras activadas por estas distintas subpoblaciones como, por ejemplo, la inhibición por el INF- γ de la producción de IgE inducida por IL-4 o la inhibición por IL-4 de la proliferación linfocitaria inducida por la IL-2 (203); es más, los efectos inhibidores se manifiestan a nivel de las propias subpoblaciones: INF- γ inhibe la proliferación de las TH2, mientras que IL-4 e IL-10 inhiben la producción de INF- γ por las TH1. Se conocen mal los mecanismos que controlan el desarrollo de las TH1 y TH2, pero parece que INF- γ e IL-4 juegan un papel crucial en el desarrollo de las respectivas subpoblaciones; para ello, la IL-4

puede ser producida por las células de la línea mastocitos/basófilos, y el INF- γ por las células NK (204).

La respuesta inmune normal se caracteriza por un equilibrio entre los tipos de respuesta TH1 y TH2. El predominio de TH1 se traducirá en fenómenos inflamatorios crónicos (hipersensibilidad retardada), mientras que el de las TH2 se manifestará mediante fenómenos alérgicos e hipergammaglobulinemias (185).

La IL-4 está dotada de numerosas propiedades biológicas, lo que concuerda con la existencia de receptores específicos sobre prácticamente todos los tipos celulares. Una gran parte de los efectos biológicos de la IL-4 pueden deberse también a su potente efecto regulador sobre la producción de citocinas (227).

1.3.5.4.1 Sobre los LT y las células NK

- en coestimulación con un mitógeno, induce la proliferación de los timocitos, LT maduros y células NK; actúa por tanto como comitógeno (221,227,228).
- interviene en la maduración de los timocitos, induciendo la desaparición de las células CD4+CD8+ y la aparición de CD4+CD8- y de CD4-CD8+ (225-228).
- parece capaz de inducir la diferenciación de las células CD4+ TH0 (productoras de IL-2, IL-4 e INF- γ) en CD4+ TH2, con aumento en la secreción de las citocinas características de estas células (203,204,229).

- aumenta la citotoxicidad en LT CD8+ activados, y estimula el desarrollo de células citotóxicas específicas para células alogénicas o infectadas por virus (230).

1.3.5.4.2- Sobre los LB

- Favorece la linfopoyesis B: estimula la proliferación de las células pro-B murinas e inhibe el crecimiento de los progenitores B más diferenciados (189); también inhibe la proliferación espontánea de las células de la leucemia aguda linfoblástica del tipo Pre-B (231).

- Activación de células B en reposo: aumenta el volumen de las mismas, aunque sin inducir la síntesis de ADN, y modifica de forma importante la expresión de antígenos de superficie; aumenta especialmente la expresión de IgM y la del antígeno CD23 (receptor de baja afinidad para el Fc de la IgE y ligando del CD21). También aumenta la expresión de los antígenos CD40 y B7/BB1, que representan los receptores para dos moléculas expresadas específicamente en los LT (el ligando de CD40 y el CD28), así como la expresión de moléculas DR. Lógicamente, estos efectos de IL-4 van a favorecer la interacción LT/LB; así por ejemplo, el aumento de la IgM y el CD23 permiten una mejor captación de los antígenos, libres o formando parte de inmunocomplejos respectivamente; el aumento de B7/BB1 favorecerá la unión al CD28 del LT, y el aumento de DR incrementará su capacidad como APC (189).

- Proliferación de LB activados: induce la proliferación de los LB coestimulados o preactivados con anticuerpos anti IgM; actúa por tanto como

comitógeno. Curiosamente, no es capaz de inducir la proliferación de las células B estimuladas por células T activadas, e incluso puede bloquear la proliferación de células B inducida por IL-2; parece ser que en este caso actuaría bloqueando la expresión de CD25 (189).

- Favorece la transformación de los LB a plasmocitos; en el ratón los induce a producir IgG1 e IgE, mientras que en el humano los induce a producir IgG4 e IgE, y disminuye la producción de IgG2b e IgG3 (232,233).

1.3.5.4.3 Sobre las células mielomonocitarias

- Estimula la Hematopoyesis, favoreciendo la proliferación y diferenciación de los progenitores granulocíticos dependientes de G-CSF (224).

- En combinación con la IL-3, y la IL-5, juega un papel importante en la generación de eosinófilos y de los basófilos/mastocitos. Sobre los eosinófilos maduros, actúa aumentando la expresión de CD23 e inhibiendo la expresión de receptores para la IgG (234). La administración conjunta de anticuerpos anti IL-4 e IL-3, se traduce en la desaparición de basófilos y mastocitos y en una mayor predisposición a infecciones por nemátodos (223,235).

- sobre los monocitos/macrófagos:

que disminuye la ADCC (166).

. inhibe la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF, IL-8, GM-CSF, INF- γ) y de PGE2 e iones superóxido, y estimula la producción de IL-1Ra, al igual que el resto de citocinas antiinflamatorias. También inhibe la adhesión de los mismos a las células endoteliales (166,236,237).

- Sobre los neutrófilos estimula la fagocitosis y la actividad metabólica respiratoria (236).

1.3.5.5 INHIBIDORES

- Anticuerpos anti IL-4 o receptor soluble (223).
- Citocinas TH1 (204).

1.3.5.6 RECEPTORES

- Es de alta afinidad (87 Kd), y se expresa en escaso número (de 100 a 1000) sobre prácticamente todos los tipos celulares (238).

- Presenta homología significativa con los dominios extracelulares de IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, G-CSF, CM-CSF, STH y eritropoyetina (superfamilia de las hemopoyetinas) (238).

- Hay otros dos polipéptidos de 65-70 y 75-80 Kd, que no intervienen en la

fijación de la IL-4, pero podrían intervenir en la transducción de señales (238).

- Como muchas otras hormonas peptídicas, IL-4 se internaliza tras fijarse al receptor y se degrada (238).

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



1.3.6 INTERLEUCINA 10

1.3.6.1 ESTRUCTURA

- Se designó inicialmente como CSIF o factor inhibidor de la síntesis de citocinas producidas por los LTH tipo I (239).

- Se comprobó más tarde que realizaba otras dos actividades, que eran la de coestimular a los timocitos (240) y a los mastocitos; con respecto a estos últimos, su acción se distinguía de la ejercida por IL-3 e IL-4 (241).

- Glicoproteína de 178 aminoácidos y Pm de 18 Kd (239).

- Una proteína producida por un gen del virus de Epstein-Barr (EBV), el BCRF1, ha mostrado una fuerte homología en su estructura con la de la IL-10 murina y humana. Los datos en conjunto sugieren que BCRF1 corresponde a un gen ancestral de IL-10, que en un momento dado habría sido capturado por el virus. Por eso se ha llamado a su producto IL-10v (242).

- Especificidad de especie: la IL-10 murina no tiene efecto sobre los linfocitos humanos, pese a presentar ambas una homología en su estructura del 73%. Sin embargo, la IL-10 humana y la IL-10v sí son capaces de inhibir la síntesis de citocinas tanto de los clones TH1 murinos, como de las células mononucleares de

sangre periférica (PBMNc) humanas (242,243).

1.3.6.2 CÉLULAS SECRETORAS E INDUCTORES

- En humanos, linfocitos TH0 y TH tipo II activados previamente por PMA y anticuerpos anti-CD3 (243), así como ciertas líneas linfocitarias B transformadas por el EBV (244), en algún linfoma B (240), en ciertas líneas mastocitarias (241) y en células del SMM estimuladas por LPS (167,245). Los LB CD5+ son también unos potentes productores (246).

- En murinos, clones TH2 activados por concanavalina A (ConA) y en algún clon TH2 sin estimular, así como constitutivamente en todos los linfomas B y en monocitos/macrófagos estimulados por LPS (242,243).

1.3.6.3 ACCIONES BIOLÓGICAS

1.3.6.3.1 Propiedades inmunosupresoras "in vitro"

- **Inhibición de la síntesis de citocinas monocito/macrófago dependientes por PBMNc, NK y clones TH1:**

... Inhibición intensa de la producción de INF- γ , GM-CSF, TNF- α y TNF- β en PBMNc estimuladas con PHA, anti-CD3 o IL-2. Dicha inhibición se observa tanto en clones TH1 murinos como en PBMNc humanas y es ejercida tanto a nivel de la

proteína como del ARNm (242,243). Ello no se debe a un efecto directo de la IL-10 sobre las células efectoras, sino a la inhibición de la función presentadora de los monocitos/macrófagos (247). Si las células presentadoras son LB esplénicos purificados en vez de los monocitos, la producción de las citocinas no se ve afectada (lo mismo ocurre en líneas B transformadas por el EBV) (243). El fallo no está a nivel del procesamiento antigénico, puesto que si los clones TH1 se estimulan con la enterotoxina B del *Estafilococo Aureo* que se comporta como un superantígeno y por tanto no necesita procesamiento, la inhibición de las citocinas por la IL-10 se sigue dando (247). El fallo radica a nivel de la presentación, y es posible que al menos parcialmente ello sea debido a la fuerte disminución de la expresión de MHC clase II sobre la superficie de los monocitos, por acción de la IL-10; esta citocina además, vuelve refractarios a los macrófagos a la expresión de MHC tipo II inducida por IL-4 e INF- γ (248).

.. Se observan resultados similares en NK estimuladas con células accesorias (monocitos purificados) más IL-2, en cuanto a la inhibición en la síntesis de INF- γ por dichas NK. Sin embargo, la IL-10 no es capaz de inhibir la síntesis del INF por células NK estimuladas con IL-2 sin la presencia de monocitos. Por tanto, el modo de actuar de la IL-10 en este caso sería el mismo que en el caso de los TH1 (249).

- Inhibición de la proliferación inducida por mitógenos (monocito/macrófago dependiente) de LTH0, TH1 y TH2 en humanos y de TH1 en ratones:

El efecto inhibitor sobre la función APC de los macrófagos por la IL-10, descrito anteriormente, no se limita a la presentación del antígeno específico, sino que afecta igualmente a la respuesta proliferativa de los LT inducida por mitógenos (PHA, ConA) o anti-CD3. La supresión afecta tanto a los CD4 como a los CD8, y solo se observa si las células T purificadas se cultivan en presencia de macrófagos, no observándose ningún efecto inhibitor si el cultivo es con LB activados, células dendríticas o fibroblastos como APCs. Por tanto, el efecto inhibitor es específico sobre el macrófago y no sobre las células efectoras. La IL-10 pues, más que impedir la proliferación, previene la presentación y con ello la activación de las células efectoras. Dicha inhibición es solo parcialmente revertida si se añaden al medio altas concentraciones de IL-2, lo cual sugiere que la causa de la disminución de la proliferación no es simplemente una baja producción de IL-2 (250).

- **Inhibición de la formación de LT citotóxicos aloespecíficos en cultivos mixtos de linfocitos:** no está claro si la IL-10 inhibe directamente a la generación de LT CD8+ citotóxicos, o si por el contrario afecta a la activación de los LT CD4+, necesarios para la generación de los CD8 citotóxicos (100).

- **Sobre los monocitos/macrófagos, además de inhibir la función presentadora de antígeno y la expresión de MHC tipo II, va a ejercer los siguientes efectos:**

.... Modificación en la morfología y en la adhesión, aunque no altera la expresión de CD11 abc, CD18, CD54, CD58, ni antígenos muy tardíos (VLA-4 y VLA-5), en monocitos cultivados (248).

... Inhibición de la síntesis de citocinas por macrófagos murinos peritoneales, líneas de macrófagos y monocitos humanos, estimulados con LPS, INF- γ o LPS mas INF- γ : IL-10 inhibe la producción de IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF y TNF (100,167,245). Si se añade al cultivo anticuerpos anti IL-10 neutralizantes, se da un aumento importante de todas estas citocinas en el medio, así como un aumento en la expresión de MHC tipo II (167). Es interesante resaltar que IL-10 no suprime completamente la síntesis proteica de los macrófagos, pues no tiene efecto sobre TGF- β (167), y que regula positivamente la expresión de IL-1Ra, al igual que la mayoría de citocinas antiinflamatorias (100).

.. Inhibición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de óxido nítrico (NO) por los macrófagos activados (100,251).

. Inhibición de la capacidad citocida de los macrófagos sobre patógenos intra y extracelulares (*Toxoplasma*, *Leishmania*, *Schistosoma*) (100).

1.3.6.3.2 Propiedades inmunoestimulantes "in vitro"

- Aumenta la expresión de moléculas MHC tipo II en LB (justo al contrario que en los macrófagos) (100,252).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

- Aumenta la viabilidad de los LB (253)
- Aumenta la proliferación de LB activados con IL-2 (no en reposo), y la secreción de inmunoglobulinas (G, A y M) (253,254).
- Actúa como factor coestimulante (con IL-2 e IL-4) en el crecimiento de timocitos (240,255).
- Factor coestimulante en la diferenciación y proliferación de LT CD8+ citotóxicos: solo en presencia de IL-2 (256).
- Actúa como factor coestimulante (con IL-3 e IL-4) en el crecimiento y proliferación de los mastocitos (241).

1.3.6.3.3 Propiedades de la IL-10 "in vivo"

- La elevación de las citocinas inflamatorias en ratones tratados con anticuerpos anti IL-10, sugiere que dicha citocinas puede ser un potente agente antiinflamatorio. Datos preliminares sugieren que es capaz directamente de proteger de la muerte a ratones con shock endotóxico (257).
- La administración de anticuerpos anti IL-10 a ratones, produce una deplección de células B CD5+. Parece ser que dicha población, por otro lado

numéricamente muy pequeña y aún bastante desconocida, podría ejercer las siguientes funciones en el sistema inmune:

- ... Inmunidad antibacteriana
- .. Aclaramiento de debris celulares, como los hematíes senescentes
- . Modulación del repertorio de anticuerpos durante el desarrollo

Todo ello sugiere un posible papel de la IL-10 como incrementadora de la inmunidad anti-bacteriana mediada por anticuerpos (257).

1.3.6.4 INHIBIDORES

- INF- γ (258).

1.3.6.5 RECEPTORES

El receptor para la IL-10 ha sido recientemente caracterizado. El gen codificador del receptor para dicha citocina, se halla localizado en el cromosoma 11 (251).



1.4. LA RESPUESTA INMUNE

Hay dos niveles de defensa contra la invasión por agentes externos: la inmunidad innata o inespecífica, y la inmunidad específica (adaptativa o adquirida). La diferencia principal entre las dos estriba en la especificidad y la memoria inmunológica, ambas propiedades exclusivas de la inmunidad adquirida (1). Para simplificar, podemos decir que cuando un agente infeccioso entra en el Organismo, encuentra primero los elementos efectores de la inmunidad innata inespecífica (barreras cutánea y mucosas, lisozima y otros enzimas, proteínas de fase aguda, fagocitos, células NK y Complemento). Estos pueden ser suficientes para prevenir la enfermedad, pero, si no es así, entonces se activa además el sistema inmunitario adaptativo o específico (linfocitos T, linfocitos B y anticuerpos), que permite la recuperación de la enfermedad y establece una memoria inmunológica específica; se dice entonces que el individuo ha adquirido inmunidad contra el agente infeccioso (38).

Es obvio que ambos tipos de inmunidad, la innata y la adquirida, no actúan separada ni secuencialmente, sino en íntima relación. Por ejemplo, los anticuerpos producidos por los linfocitos ayudan a que los fagocitos reconozcan sus dianas. Después de la activación clonal por el antígeno, los LT producen linfocinas que estimulan a los fagocitos para destruir con mayor efectividad los agentes infecciosos. Los macrófagos, a su vez, ayudan a los linfocitos transportando el antígeno desde la

periferia hasta los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides, donde es presentado a esos linfocitos en una forma que puedan reconocer (1,38).

Las respuestas frente a la mayoría de los inmunógenos requieren pues el procesamiento previo de dicho inmunógeno por la célula encargada de presentarlo a los linfocitos T, y la expresión ulterior del mismo en la superficie celular, junto a otras moléculas también de membrana, que se agrupan bajo el nombre de Sistema Mayor de Histocompatibilidad o MHC, y desempeñan un papel fundamental en la distinción entre lo propio y lo no propio, ya que cualquier antígeno es reconocido por el receptor de las células T sólo cuando éste les es presentado en conjunción con moléculas MHC. Los genes que codifican estas moléculas se clasifican en clase I, II y III, y se hallan en el brazo corto del cromosoma 6 (38). Los genes de clase I y II pertenecen a la familia del "supergen de las inmunoglobulinas". Esta familia codifica una amplia variedad de moléculas de la superficie celular, que abarca también a las inmunoglobulinas, al TCR, al CD4 y al CD8 (259). **Las moléculas de clase I** incluyen los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, y se encuentran presentes en la superficie de todas las células del organismo. **Las moléculas de clase II** incluyen a los genes HLA-DR, HLA-DP, y HLA-DQ, y sólo se expresan en células del SI, especialmente en macrófagos y linfocitos B (259). Los genes de clase III codifican a los componentes C2 y C4 de la vía clásica del Complemento, al Factor B (Properdina) de la vía alterna, al TNF- α y β , y a los enzimas 21-hidroxilasa A y B (260).

1.4.1 La activación de los linfocitos T cooperadores

Los linfocitos T cooperadores (CD4+) son los principales orquestadores de la respuesta inmune porque su ayuda es necesaria para la activación de las células efectoras principales de esta respuesta, es decir, los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y los linfocitos B productores de anticuerpos (1,38). También media la respuesta de hipersensibilidad retardada, útil sobre todo frente a la infección por parásitos intracelulares como la tuberculosis, y frente a algunos virus (261).

La activación de los linfocitos T cooperadores ocurre tempranamente en el curso de la respuesta inmune, y requiere al menos dos señales. Una primera señal proviene de la unión del receptor para el antígeno del linfocito T con el complejo antígeno-MHC de clase II de la célula presentadora (sistema monocito/macrófago) (262). La segunda señal deriva de la IL-1, una citocina producida por la APC activada cuya principal función es la de iniciar la respuesta inmune. Estas dos señales juntas inducen la expresión de receptores para otra linfocina, la IL-2, así como la producción de la propia IL-2 (57). La principal función de la IL-2 es la de amplificar la respuesta iniciada por el contacto del linfocito T cooperador con la APC. Ello lo va a llevar a cabo induciendo el crecimiento y la activación de las células que expresen receptores para la IL-2, incluyendo las propias células T cooperadoras (65), que son las que principalmente la producen (efecto autocatalítico), los linfocitos T citotóxicos (181,182) y las células NK (5). Estas células activadas por la IL-2 son capaces de producir a su vez otras citocinas como factores de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (IL-4, IL-5, IL-6), factores hematopoyéticos (IL-3, GM-CSF) que

estimulan la producción en médula ósea de nuevas células inmunes mieloides que pasan a la circulación, o $\text{INF-}\gamma$ (72,185,186). El $\text{INF-}\gamma$ (secretado por linfocitos T y células NK) tiene, entre otras funciones, la de aumentar la actividad de las propias células NK (201), aumentar la expresión de receptores de alta afinidad para la IL-2 en células del SMM, aumentar el número de moléculas MHC de clase II y de receptores para Fc y Complemento en la membrana de células del sistema mononuclear fagocítico (SMF) (212,213), y aumentar los MHC de clase I de células diana de los linfocitos T citotóxicos (209). Todo ello se traduce en un incremento final en la actividad de las NK, de los LTc y de las funciones principales de las células del SMM (fagocítica-bactericida, presentadora de antígeno, tumoricida) (38); estas células macrofágicas, reclutadas y potenciadas enormemente en sus funciones por la activación inicial de los linfocitos T cooperadores, serán las principales células efectoras que medien las respuestas de hipersensibilidad retardada (inflamación crónica) (263). Los macrófagos que van siendo reclutados al foco inflamatorio presentan el antígeno a otros linfocitos T cooperadores, y segregan más IL-1 y otras citocinas como el $\text{TNF-}\alpha$, perpetuando la respuesta (1,38). Ambas citocinas, aparte de inducir la formación de IL-2 por los linfocitos T y otras células del sistema inmune, son también activadoras de las prostaglandinas en diferentes tejidos del Organismo, y por tanto responsables directas de muchos de los síntomas y signos del proceso inflamatorio, como son el aumento de las proteínas de fase aguda por los hepatocitos, la neutrofilia y la fiebre. Sus efectos en cerebro aparte de la fiebre, son fundamentalmente somnolencia, anorexia y aumento de la secreción hipotalámica de CRF, con el consiguiente estímulo del eje hipófiso-suprarrenal y aumento de esteroides (154).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.4.2 La activación de los linfocitos T citotóxicos

Requiere, al igual que los T cooperadores, dos señales de activación. Una proviene de la interacción del receptor del linfocito T con el complejo antígeno-MHC de clase I presente en la membrana de la célula diana (célula infectada por virus, célula tumoral o injerto de tejido extraño) (264). La segunda señal la proporciona la IL-2 producida por el linfocito T cooperador activado (181,182).

El linfocito T citotóxico activado liberará entonces sus citotoxinas, que son las encargadas de eliminar a la célula diana (38).

1.4.3 La activación de los linfocitos B

La producción de anticuerpos requiere, por un lado, la activación de los linfocitos B (265), y por otro su diferenciación en células plasmáticas, que serán las que secreten las inmunoglobulinas (266,267). Mientras el linfocito T cooperador es activado por un antígeno concreto, los LB específicos para ese mismo antígeno lo reconocen a través de sus receptores de membrana (inmunoglobulinas de superficie). La unión con el antígeno es seguida de la internalización receptor-antígeno, y ello constituye la primera señal en la activación; sin embargo es insuficiente, por lo que la activación completa y posterior diferenciación a célula plasmática es proporcionada por los linfocitos T cooperadores a través de la secreción de factores de crecimiento (268) y diferenciación de LB (269-270).

Los LB también pueden actuar como APC. Para ello, tras internalizar el antígeno, éste es procesado y expresado en la superficie de la membrana junto con moléculas MHC de clase II (271).

1.4.4 La activación de los Linfocitos T Supresores

No está tan claramente definida como en el caso de los T cooperadores o los T citotóxicos. Al contrario que ellos, numerosos hallazgos sugieren que algunas poblaciones de Linfocitos T supresores son capaces de reconocer antígenos nativos, sin necesidad de que éstos sean procesados por la APC. Sin embargo, otras poblaciones serían MHC-restrictas, al igual que los T cooperadores o T citotóxicos. Ejercen su acción a través de Factores Supresores, que parecen ser capaces de sustituir a las propias células en su función supresora específica de antígeno. Al igual que los LT cooperadores, su misión principal es la de regular la intensidad de la respuesta inmune, pero en este caso en sentido negativo. Ello lo hacen a través de dos vías generales: o bien ejerciendo una acción directa negativa sobre las propias células efectoras del sistema inmune, o bien inhibiendo la función de las células T cooperadoras, que de esta manera no pueden desempeñar su función estimuladora de células efectoras (38).

1.5. MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE. INMUNOSUPRESORES E INMUNOMODULADORES.

1.5.1 INMUNOSUPRESORES.

El crecimiento de la Inmunología Clínica ha puesto al descubierto un número creciente de enfermedades que son debidas a respuestas inmunes aberrantes. Ello ha resultado en la búsqueda de drogas capaces de inhibir esas respuestas no deseadas. A lo largo de las dos pasadas décadas, se han hecho considerables progresos en la identificación de un grupo de compuestos capaces de alcanzar una *inhibición no específica* de la respuesta inmune (272).

1.5.1.1 Corticosteroides

Las hormonas esteroideas glucocorticoideas son ampliamente usadas para suprimir de modo eficaz las manifestaciones de numerosas reacciones inflamatorias e inmunes. Las actividades antiinflamatorias e inmunosupresoras de los corticosteroides pueden agruparse en tres categorías: el efecto de estas drogas en la circulación leucocitaria, su capacidad para alterar funciones celulares específicas y otra miscelánea de actividades antiinflamatorias (273).

Tras la administración intravenosa de una sola inyección de glucocorticoides, se produce un rápido aumento en el número de neutrófilos y una disminución

concomitante del número total de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos; los cambios máximos se observan a las 4-6 horas de la inyección, y al cabo de 24 horas todas las cifras han retornado a sus valores normales (274).

La neutrofilia resultante de la administración esteroidea, parece ser debida al menos a dos actividades distintas: liberación de neutrófilos maduros desde la reserva en la médula ósea, y disminución del paso de los neutrófilos desde los espacios intravasculares a los exudados inflamatorios. Ello se traduce en un incremento en la vida media de los neutrófilos circulantes. Las actividades de los neutrófilos como la quimiotaxis y la liberación de enzimas lisosómicos, no se ven afectadas por los esteroides; sin embargo, la liberación de enzimas proteolíticas no lisosómicas como la colagenasa y el activador del plasminógeno, sí disminuyen por la acción de los esteroides (274).

El número de eosinófilos y de basófilos circulantes, también se reduce a causa de la redistribución (275).

La reducción en el número de linfocitos circulantes, resulta del secuestro de las células linfoides en los tejidos linfoides, incluyendo la propia médula ósea. El número total de linfocitos T circulantes disminuye marcadamente, mientras que la reducción del número de linfocitos B es solo moderada; el número de células no T no B, no sufre ningún cambio. Entre las subpoblaciones de linfocitos T, el número de células CD4+ se reduce en un mayor grado que el número de células CD8+. Las actividades de los linfocitos T se alteran considerablemente; así, los esteroides inhiben

la respuesta linfoproliferativa in vitro, en parte debido a una lesión en la síntesis y secreción de interleucina-2, que más probablemente es el resultado indirecto de una producción suprimida de la IL-1 por los monocitos. La expresión del receptor de IL-2 no se ve afectada (276). Los corticosteroides pueden también bloquear la progresión de los linfocitos estimulados por PHA a través del ciclo mitótico, inhibiendo la entrada de células en la fase G₁ del ciclo, y parando la progresión de los linfocitos activados desde la fase G₁ a la fase S. El efecto de los corticosteroides sobre los linfocitos B es menor; dosis altas de corticosteroides reducen modestamente, tras 2-3 semanas de administración, las concentraciones séricas de IgG e IgA, pero no de IgM. La terapia esteroidea no altera ni la actividad de las células NK, ni la ADCC (94).

Uno de los cambios importantes inducidos por los esteroides, es una monocitopenia pronunciada. La cuenta de monocitos frecuentemente cae por debajo de 50 células/ μ l y ello se ha postulado como de máxima importancia en la capacidad de los esteroides para mediar su actividad antiinflamatoria (275). Los esteroides producen numerosos cambios en las funciones del monocito-macrófago; así, son capaces de suprimir la actividad bactericida de dichas células fagocíticas, traduciéndose ello en una mayor susceptibilidad a determinadas infecciones. También interfieren en la función de presentación del antígeno de dichas células. Otros efectos incluyen un daño en la migración del monocito en respuesta a factores quimiotácticos, una respuesta disminuída al factor de inhibición (MIF), un bloqueo de la diferenciación de los monocitos a macrófagos, y una supresión de la capacidad de los monocitos para expresar receptores para el Fc y receptores para el complemento, lo

cual puede contribuir al daño de la actividad fagocítica (274). Suprimen igualmente la capacidad de las células reticuloendoteliales para fagocitar antígenos revestidos de anticuerpos, probablemente a causa de la disminución de la unión de los inmunocomplejos a los receptores de membrana para el Fc y el C3b, cuya expresión se halla disminuída por la acción directa de los esteroides; ello puede justificar su efecto beneficioso sobre enfermedades como la púrpura trombocitopénica idiopática y la anemia hemolítica autoinmune. Los tests cutáneos de hipersensibilidad retardada, también se inhiben en el tratamiento prolongado con esteroides (277).

Los efectos descritos de los esteroides sobre el sistema inmune, permiten su aplicación en la Clínica bajo tres protocolos diferentes, según las circunstancias:

- "administrar la cantidad más pequeña capaz de suprimir las manifestaciones de enfermedad, durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, 7'5-10 mg diarios de prednisona para tratar la artritis reumatoidea.

- cantidades más grandes, en un intento de suprimir completamente y de un modo rápido, las manifestaciones de una enfermedad mediada por el sistema inmune. Por ejemplo 1-2 mg/kg diarios, en dosis única o repartido en varias dosis; se usa a menudo en enfermedades como la anemia hemolítica autoinmune, la púrpura trombocitopénica idiopática y varios tipos de glomerulonefritis inducidas por el sistema inmune.

- cantidades muy elevadas de corticoides intravenosos (por ejemplo metilprednisolona a 10-30 mg/kg). Este protocolo se reserva para aquellas enfermedades graves que en un momento dado amenazan la vida del paciente" (273,278).

La terapia prolongada con corticosteroides no es inocua; estas drogas tienen numerosos efectos secundarios, potencialmente graves. Es importante tener en cuenta que la terapia crónica con dosis elevadas de esteroides, puede causar mayor morbilidad que la originada por la propia enfermedad de base (279,280).

1.5.1.2 Drogas citotóxicas

Las drogas citotóxicas son un grupo de compuestos químicos con la propiedad farmacológica de matar células capaces de autoreplicarse. Los linfocitos inmunológicamente competentes representan pues un población susceptible de ser atacada por estas drogas (281).

Inicialmente fueron introducidas para su uso medicina, en la terapia contra el cáncer (282); sin embargo, estudios posteriores revelaron que muchas de estas sustancias también poseían propiedades inmunosupresoras (283). De este modo, su uso se extendió al tratamiento de enfermedades causadas por respuestas inmunes aberrantes, y a la inhibición de la reacción de rechazo en los transplantes. Hay 4 drogas citotóxicas utilizadas rutinariamente en Clínica para la inmunosupresión: ciclofosfamida, azatioprina, metrotexate y clorambucil (273).

Estas drogas pueden ejercer una toxicidad diferente para los linfocitos T y B. La ciclofosfamida causa una reducción proporcionalmente mucho mayor del número de linfocitos B, que de las células T; ello se correlaciona bien con su mayor efecto supresor de las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos, que de las reacciones mediadas por células (284). Es por ello que en Clínica, la ciclofosfamida se usa para tratar aquellas enfermedades en las que hay una respuesta inmune humoral aberrante, como sucede por ejemplo en la púrpura trombocitopénica idiopática, mientras que es poco eficaz en la inhibición de la reacción de rechazo en los trasplantes. La azatioprina por el contrario, parece ser más potente como inhibidor de las respuestas mediadas por células T y también parece reducir eficazmente el número de células NK circulantes, aunque puede suprimir tanto la respuesta inmune celular como la humoral (273,283).

La toxicidad de las drogas citotóxicas no es selectiva para los linfocitos; también pueden matar células proliferadoras no linfoideas, incluyendo precursores hematopoyéticos, células mucosas gastrointestinales y células germinales en las gónadas. Es por ello que los efectos secundarios predecibles de estas drogas, incluyen pancitopenia, toxicidad gastrointestinal e infertilidad (285,286).

1.5.1.3 Ciclosporina

La ciclosporina es un agente inmunosupresor derivado de la fermentación de ciertos hongos, con propiedades distintas a las de los anteriores compuestos y mucho más selectiva. Así es capaz de modificar la actividad inmunoreguladora de los

linfocitos T cooperadores, sin afectar a las células T supresoras, T efectoras, linfocitos B, granulocitos o macrófagos (273). De este modo, bloquea selectivamente aquellas respuestas inmunes, incluyendo el rechazo de los aloinjertos, que son dependientes de los linfocitos T cooperadores. Al contrario que las drogas citotóxicas, es capaz de producir inmunosupresión sin producir linfólisis. Actúa en la fase temprana de desarrollo de la respuesta inmune; su mayor actividad parece ser una inhibición de la síntesis y secreción de la IL-2. También puede dañar la capacidad de los linfocitos T cooperadores activados para responder a la IL-2, tal vez, limitando la expresión del receptor para dicha citocina (287). A causa de su potencia, ha llegado a ser una droga de uso estándar en la Clínica para inhibir las reacciones de rechazo a aloinjertos, así como para prevenir la reacción de injerto frente al huésped en el trasplante de médula ósea. Su eficacia inmunosupresora puede aumentarse si se administra simultáneamente con dosis moderadas de esteroides, ya que ambas drogas parecen actuar sinérgicamente; la ciclosporina inhibiendo directamente la producción de IL-2, y los esteroides suprimiendo indirectamente la síntesis de dicha citocina, a partir del bloqueo en la liberación de IL-1 por parte del monocito-macrófago (288).

El tratamiento con ciclosporina tiene efectos secundarios que incluyen entre otros hiperplasia gingival, hirsutismo y manifestaciones del sistema nervioso central (187).

En ciertas circunstancias, puede darse un efecto paradójico con el tratamiento inmunosupresor en general, como es el caso de aumentar una respuesta específica. Así

por ejemplo, el efecto de la ciclofosfamida sobre las reacciones mediadas por células es variable; algunas reacciones son inhibidas mientras que otras por el contrario son aumentadas. Por ello la ciclofosfamida, a causa de su mayor toxicidad para los linfocitos B, es capaz de suprimir eficazmente las respuestas humorales frente a un determinado antígeno y simultáneamente de aumentar por ejemplo las respuestas de hipersensibilidad retardada frente al mismo antígeno, probablemente debido en parte a una toxicidad directa de la droga sobre los linfocitos T supresores (283,284).

Por otro lado, la capacidad de los inmunosupresores para inhibir una respuesta inmune, puede resultar de una actividad farmacológica distinta a la propia inmunosupresión. En este sentido, la expresión de muchas respuestas inmunes comprende tanto la participación de células de la inmunidad específica como de células efectoras no específicas, como es el caso de neutrófilos y monocitos. El número o la función de dichas células efectoras no específicas puede también ser alterado por drogas inmunosupresoras. En consecuencia, una inmunosupresión aparente puede ser más bien el resultado de las propiedades anti-inflamatorias de un agente específico. Por ejemplo, los corticosteroides son potentes supresores del asma alérgica mediada por IgE y de la dermatitis por contacto mediada por células T, y en ambas enfermedades su principal mecanismo de acción es a partir de una inhibición de la inflamación, sin afectar las respuestas inmunes subyacentes (274,275,277).



1.5.2 INMUNOMODULADORES.

Los inmunomoduladores (modificadores de la respuesta biológica) son drogas que modifican directamente una función inmune específica, o tienen un efecto positivo o negativo sobre la actividad del sistema inmune. Los usos potenciales de los inmunomoduladores en Clínica, incluyen la reconstitución de una función inmune deficiente y la supresión de una función inmune normal, o excesiva como ocurre en el caso de las enfermedades autoinmunes. Existen numerosas sustancias capaces de modular la reacción inmune; estas sustancias incluyen las citocinas, anticuerpos monoclonales e inmunomoduladores no específicos (289).

La tecnología del ADN recombinante ha proporcionado cantidades ilimitadas de citocinas altamente purificadas, permitiendo la evaluación clínica de dichas sustancias en ausencia de contaminantes biológicamente activos. La mayor parte de las citocinas han sido estudiadas en ensayos clínicos en Fase I para determinar su seguridad y farmacología, y en ensayos en Fase II para determinar su actividad inmunomoduladora en situaciones clínicas específicas y para definir regímenes de tratamiento. Las clases mayores de citocinas que han sido evaluadas clínicamente, incluyen interferones, algunas interleucinas, factores estimulantes de colonias y factores de necrosis tumoral. En general, son sustancias caras y de difícil manejo; en ocasiones las dosis que hay que suministrar para conseguir el efecto deseado, causan efectos secundarios que si bien no suelen ser graves, sí son molestos para el paciente (1,38,273).

Los anticuerpos monoclonales son producidos por hibridomas, un procedimiento en el cual un ratón es inmunizado con un antígeno específico y sus células de bazo posteriormente fusionadas con una línea inmortal de células B, para producir una célula híbrida con capacidad de secretar de un modo indefinido, anticuerpos con especificidad clonal para ese antígeno (1). Ello permite obtener grandes cantidades de anticuerpos frente a un epítipo concreto del antígeno deseado. Los ensayos clínicos iniciales se realizaron en pacientes cancerosos a los que se administraba anticuerpos monoclonales murinos frente a determinados antígenos tumorales, surgiendo numerosos problemas que incluían la enorme heterogeneidad tumoral, la captación no específica de los anticuerpos en sitios no tumorales, el acceso vascular limitado de muchos de los tumores o la aparición de anticuerpos humanos frente a los anticuerpos murinos, problemas todos ellos que siguen limitando el uso de esta terapia en el cáncer, sobre todo en los tumores sólidos. No obstante, el uso de Ac Mo conjugados a radioisótopos, toxinas celulares u otras drogas, sigue siendo hoy en día una de las numerosas líneas de investigación más de moda en la terapia contra el cáncer (1,290). Del mismo modo, anticuerpos monoclonales como el OKT3, que posee especificidad por el antígeno CD3 presente en las células T, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del rechazo agudo del trasplante renal y también del trasplante hepático y cardíaco, obteniéndose en algunos casos resultados similares a los conseguidos con terapias convencionales (esteroides a altas dosis); sin embargo los efectos colaterales también son importantes, incluyendo síntomas similares a los de un cuadro gripal, cambios en la presión arterial y disnea. Por otro lado, el desarrollo de anticuerpos humanos frente a ratón, acaba limitando su uso repetido (290).

Los inmunomoduladores no específicos, pueden dividirse en tres grupos: productos de origen microbiano, productos obtenidos de mamíferos y compuestos sintéticos. Los *inmunomoduladores de origen microbiano* han demostrado tener un beneficio terapéutico limitado, baja pureza y mucha variabilidad entre los distintos lotes; el más estudiado ha sido el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), que se ha usado en distintos tipos de cáncer con diferentes resultados, siendo el carcinoma superficial de vejiga (inyección intravesical) una de sus principales indicaciones (1,273). En cuanto a los *productos de origen mamífero* como las timosinas (sustancias hormone-like producidas por el timo y que tienen diversas actividades biológicas, incluyendo el aumento de la respuesta inmune en animales normales y timectomizados), aunque potencialmente útiles en el tratamiento de determinados estados de inmunodeficiencia, su verdadera eficacia no ha sido demostrada aún en ensayos clínicos controlados (273). Los *compuestos sintéticos* como el levamisol, una droga antihelmíntica capaz de inhibir la actividad de células T supresoras, cuando es administrado a pacientes con cáncer se asocia a un incremento en la respuesta de hipersensibilidad retardada y a un aumento de la proliferación linfocitaria y de las respuestas mitogénicas in vitro (273).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.6 ANAPSOS: EXTRACTO DE POLYPODIUM LEUCOTOMOS

Calaguala es el nombre común del helecho *Polypodium leucotomos*, típico de determinadas zonas de Centroamérica, y cuyo crecimiento óptimo se da entre los 2000-2500 m. de altura; desde hace tiempo, viene siendo utilizado en Sudamérica y España en el tratamiento de enfermedades cutáneas como el psoriasis y la dermatitis atópica. Los efectos clínicos del extracto preparado a partir de los rizomas de la planta (Anapsos), han sido confirmados y documentados en ensayos clínicos abiertos y doble-ciego placebo controlados. El extracto es administrado oralmente a los pacientes, y hasta el momento solo se han observado efectos secundarios menores, del tipo de molestias gástricas (291-293).

Estudios iniciales demostraron un efecto antitumoral de Anapsos (ANP). La actividad metabólica de dicha sustancia sobre fragmentos de tumores humanos "in vitro", mostró inhibición de la síntesis de ADN y proteínas, así como disminución del transporte de glucosa marcada al interior de la célula, atribuyéndose el efecto antineoplásico a modificaciones en la membrana plasmática. La acción del producto sobre tejidos normales, al contrario que la acción de los citostáticos, fue más bien anabólica, tanto in vitro como in vivo (294). Otros autores, atribuyeron el efecto antineoplásico a una interacción con receptores citoplasmáticos similar a la ejercida por los glucocorticoides (295).

En el año 1983, se describió por vez primera un efecto inmunomodulador de Anapsos. En sujetos voluntarios sanos, la administración del producto por vía oral, disminuye la respuesta linfoblástica a la estimulación con mitógenos y los niveles séricos de inmunoglobulinas después de tres días de tratamiento, y aumenta el índice de supresión, la respuesta linfoblástica a mitógenos, los niveles séricos de inmunoglobulinas y la proporción de células CD8+, sin alterar la tasa de células CD3+ y CD4+, tras cinco días de administración (296). Diversos estudios refieren el efecto inmunomodulador de Anapsos en patologías diferentes como la dermatitis atópica, la psoriasis o el vitíligo (291-293,297). Del mismo modo, en un estudio realizado en Esclerosis Múltiple, el tratamiento con extracto de *Polypodium leucotomos* resultó útil para corregir las alteraciones del fenotipo inmunológico más frecuentes en dicha enfermedad (aumento de linfocitos T inductores de células B y disminución de linfocitos T supresores) coincidiendo ello a su vez con una estabilización clínica de los pacientes (298). El efecto inmunomodulador de Anapsos ha sido igualmente puesto de manifiesto por otros autores (299).

En estudios experimentales realizados con Anapsos se ha podido comprobar que este compuesto actúa como potencial agente neurotrófico y neuroinmunoregulador modulando la producción de IL-1, IL-2 y TNF en SNC de ratas tratadas con diferentes dosis del extracto (300). Posteriormente, los mismos autores han demostrado que la administración aguda y crónica de Anapsos revierte la hiperactividad motora y el deterioro del aprendizaje, y tiende a normalizar las alteraciones neuroinmunes cerebrales observadas en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer (301). En un estudio en el que se administró Anapsos por vía

subcutánea a ratones viejos durante once meses, se ha observado que el producto mejora la coordinación psicomotora con respecto a animales no tratados, sin afectar significativamente la tasa de supervivencia, la evolución del peso corporal, la ingesta sólida y líquida, ni la aparición de signos neurológicos (301).

Anapsos se ha mostrado también útil en el tratamiento de patologías tan diversas como el herpes zoster (302), la estomatitis aftosa (303) o afecciones oculares primarias o secundarias a enfermedad sistémica (304-305).

Diversos autores han referido una actividad colagenopoyética del producto, relacionándola con mecanismos inmunológicos (306,307).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

II.- OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

En un intento de ahondar en la actuación del producto desde un punto de vista inmunológico que nos permitiera hallar un nexo común capaz de justificar la mayor parte de sus efectos, decidimos testar la capacidad inmunomoduladora de dicha sustancia "in vitro". Para ello nos planteamos los siguiente objetivos:

- 1.- Comprobar si Anapsos ejerce una acción pleitrópica sobre el sistema inmune.
- 2.- Valorar el efecto de Anapsos sobre la producción de citocinas por células del sistema monocito/macrófago.
- 3.- Valorar el efecto de Anapsos sobre la producción de citocinas por los diferentes clones de linfocitos T helper: TH0, TH1 y TH2.
- 4.- Valorar el efecto de Anapsos sobre proliferación y activación de linfocitos T, de linfocitos B y de células NK. Análisis fenotípico por citometría de flujo.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

III.- MATERIAL Y METODOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

III- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

Anapsos (extracto de *Polypodium leucotomos*), en forma de liofilizado, fue amablemente cedido por ASAC Pharmaceutical International A.I.E (Alicante, España). Todos los experimentos fueron realizados con el mismo lote del producto (Pal-22).

Los rizomas del *Polypodium leucotomos* fueron recolectados en las Plantaciones Experimentales y de Recuperación Ecológica de Guatemala, propiedad de ASAC Pharmaceutical International situada a 2000 metros por encima del nivel del mar. Los rizomas fueron examinados para su identificación por JM. Aguilar Cumes (Jefe del Jardín Botánico de la Universidad de San Carlos de Guatemala). La deshidratación de los rizomas se hizo a 50° C durante 48 horas. Los rizomas secos (500 gr) fueron sumergidos y macerados en una mezcla de disolventes polares (5 litros) a una temperatura inicial de 70° C y llevados a temperatura ambiente (temperatura final) durante 8 horas. El extracto así obtenido, fue filtrado y liofilizado para su uso en el experimento.



3.2 MUESTRA DEL ESTUDIO

Las células se obtuvieron de un grupo de diez donantes sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 21 y 35 años.

3.3 TEST DE LABORATORIO

Células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas a partir de sangre heparinizada, mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque).

Las células separadas fueron ajustadas en todos los casos a 1×10^6 /ml con medio de cultivo RPMI 1640 (WHITAKER), suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FLOW), 1% de antibiótico (GIBCO) y 1% de Glutamina (GIBCO).

3.3.1 Respuesta proliferativa frente a mitógenos

Las células fueron sembradas por triplicado en placas de 96 pocillos (COSTAR) de fondo plano, a razón de 200.000 células/pocillo (200 μ l/pocillo). Las células fueron estimuladas con 0'5 μ g/ml del mitógeno PHA o 4 μ g/ml de Pokeweed (PWM), con y sin Anapsos, así como con Anapsos solo. Las dosis de Anapsos utilizadas en todos los casos fueron de 75, 150, 500, 1000, 1500 y 4500 μ g/ml. Como control de la proliferación se utilizaron células conteniendo solo medio de

cultivo. Las células se incubaron a continuación en estufa de cultivo, durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂; 18-20 horas antes de finalizar el cultivo, se incorporó al medio 1 μ Cu de ³[H]-Timidina (AMERSHAM). Finalmente las células fueron recolectadas en el Harvester y la proliferación medida en un contador beta y expresada en c.p.m. (cuentas por minuto).

3.3.2 Determinación de citocinas

Las células se sembraron a razón de 1x10⁶/pocillo (1 ml/pocillo). La estimulación se realizó con LPS solo (control), LPS+PHA, LPS+Anapsos y LPS+PHA+Anapsos. Se decidió utilizar LPS como estimulante común, para asegurar una buena producción de citocinas inflamatorias como IL-1 β o TNF- α . Las dosis utilizadas en cada caso fueron 20 μ g/ml de LPS, 4 μ g/ml de PHA y 150 μ g/ml de Anapsos. Se utilizó esta dosis de Anapsos por ser la que presentó mayor efecto sobre la proliferación linfocitaria. Las células se incubaron en estufa (37°C, 5% de CO₂) y se realizó una cinética completa de cada una de las citocinas (a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas), para cada una de las condiciones de estimulación. Tras centrifugar los medios, se recolectaron los sobrenadantes en viales de congelación (1 ml/vial) y se guardaron en congelador a -70°C, hasta su ulterior procesamiento. Las citocinas medidas fueron la IL-1 β , TNF- α , IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10 y su determinación se realizó mediante ELISA (RD Diagnostics). Los límites de detección para los distintos Kits, fueron de <5 pg/ml.



3.3.3 Análisis fenotípico

Las células se sembraron a 1×10^6 /ml en placas (COSTAR) a razón de 1 ml/pocillo. Las condiciones de estimulación fueron las mismas que las utilizadas para determinar producción de citocinas (20 μ g/ml de LPS, y/o 4 μ g/ml de PHA y/o 150 μ g/ml de Anapsos). Las células se incubaron durante 48 horas en estufa (37°C, 5% de CO₂) y a continuación fueron lavadas con medio RPMI 1640 conteniendo 2% de suero de ternera fetal y 1% de azida sódica (10 minutos a 1500 rpm y 5 minutos a 1200 rpm; T^a: 18°C), ajustadas a un mínimo de 200.000 células/tubo, e incubadas durante 45 minutos a 4°C con 50% de suero AB, 1% de azida sódica y los diferentes anticuerpos monoclonales. Finalmente se lavaron de nuevo las células (2 lavados de 5 minutos a 1200 rpm, 4°C) y se resuspendieron en 2 ml de PBS/glicerol al 50%. Seguidamente las distintas poblaciones fueron cuantificadas por inmunofluorescencia directa mediante análisis fenotípico por citometría de flujo analítica con doble o triple marcaje, usando la combinación de anticuerpos monoclonales más adecuada en cada caso (CALTAG: CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD19, CD25, CD38, CD45RA; Becton Dickinson: CD45RO). Como fluorocromos se utilizaron la fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o tercer color (TC).



3.4 ESTADÍSTICA

Los resultados de la proliferación vienen expresados en media geométrica \pm error estandar de la media geométrica. La significación estadística se determinó mediante el test de la t-Student para datos pareados. Se consideraron significativos aquellos valores para una $p < 0'05$.

Tanto para el análisis de la producción de citocinas como para el análisis fenotípico, la significación estadística se determinó mediante el test de la t-Student para datos pareados. Los resultados vienen expresados como los valores medios \pm error estandar de la media; se consideraron significativos aquellos valores para una $p < 0'05$.

La correlación entre las distintas citocinas para las diferentes condiciones de estimulación, se determinó mediante los coeficientes de correlación lineal.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

IV.- RESULTADOS



IV. RESULTADOS

4.1 PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA

Cuando las células se estimularon con Anapsos solo, se observó un aumento estadísticamente significativo en la proliferación, con las concentraciones de 75 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{cpm} = 5815 \pm 1716$; $p = 0.013$) y 150 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{cpm} = 6954 \pm 1751$; $p = 0.017$) vs. control (células sin estimular) ($\text{cpm} = 3806 \pm 766$); dichas dosis coinciden respectivamente con los niveles plasmáticos aproximados que se alcanzarían con la toma de 3-6 cápsulas/día de 120 mg ($< 500 \mu\text{g/ml}$). A dosis superiores de Anapsos, este efecto de estimulación fue disminuyendo progresivamente, llegando incluso con la dosis de 4500 $\mu\text{g/ml}$ a obtener valores de proliferación inferiores a los del control, pero sin llegar en ningún caso a alcanzar niveles de significación (Figura 1; resultados expresados en media geométrica \pm error estándar de la media geométrica). Mencionar a este respecto que la viabilidad celular del cultivo medida por la técnica de Azul Trypan, en aquellos casos en los que se utilizó la dosis más alta de Anapsos (4500 $\mu\text{g/ml}$) fue inferior al 50%, siendo en el resto de casos superior al 90%. El aumento mencionado en las cifras de proliferación quedó consistentemente enmascarado cuando las células fueron simultáneamente estimuladas con los mitógenos PHA (Fig.2) o PWM (Fig.3); dosis superiores a 1000 $\mu\text{g/ml}$ de anapsos, mostraron una tendencia progresiva a disminuir la proliferación inducida por ambos mitógenos, sin que los resultados fueran estadísticamente significativos (Fig.2 y 3).

* $p < 0.01$ vs controles sin estimular con Anapsos

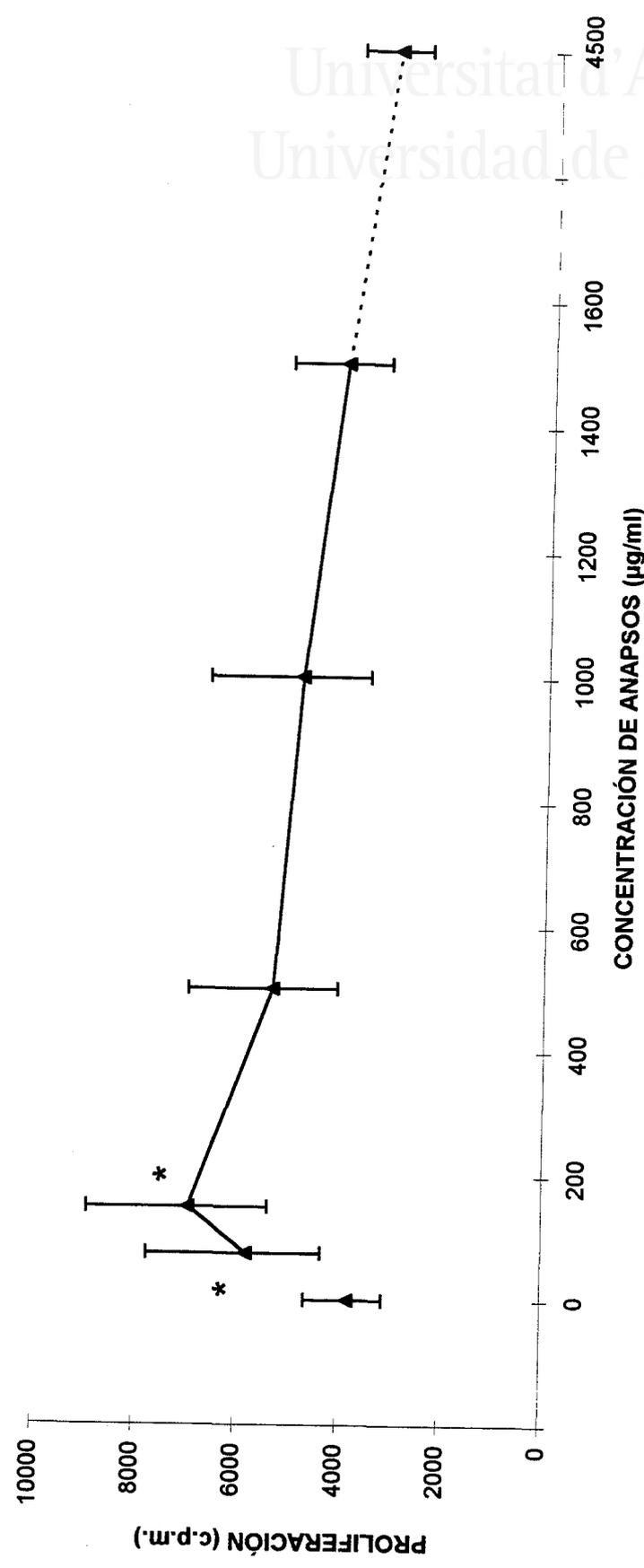


FIGURA 1

Proliferación en c.p.m de células estimuladas sólo con Anapsos.
Resultados expresados como media geométrica \pm error estándar de la media geométrica.

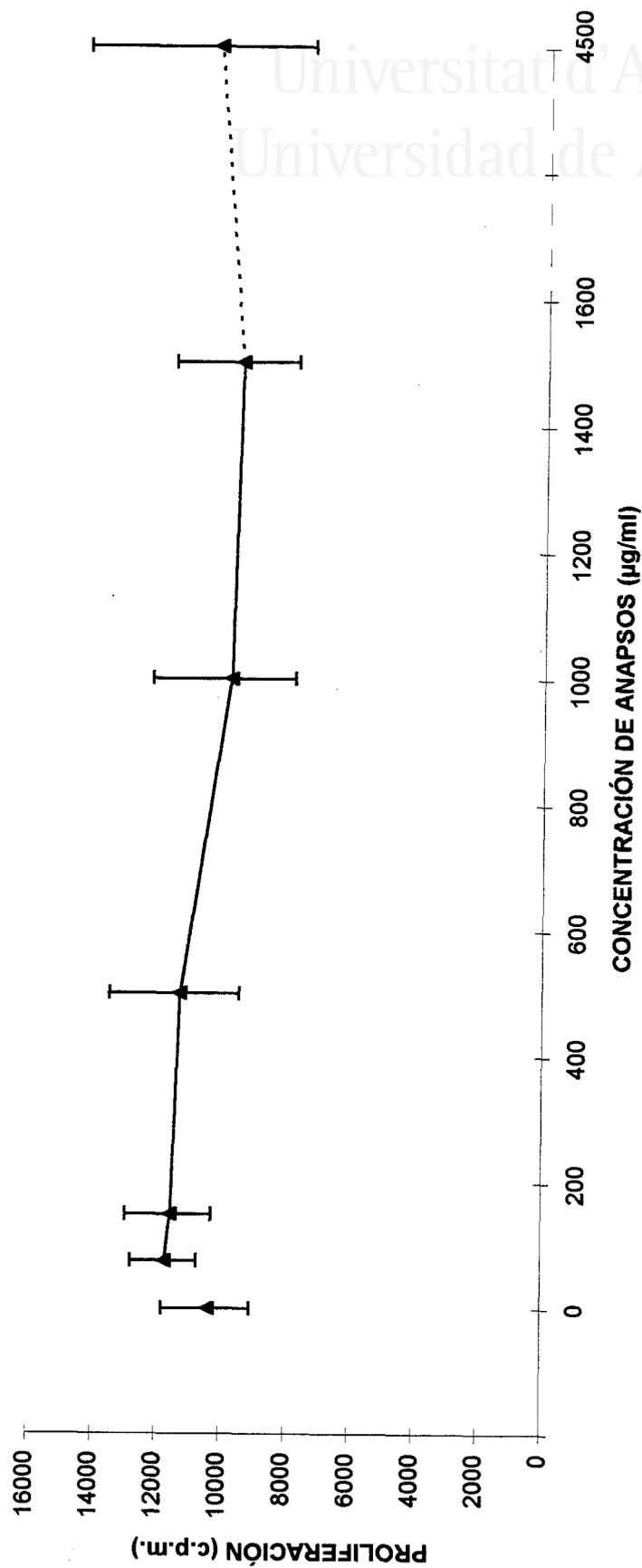


FIGURA 2

Proliferación en c.p.m. de células estimuladas con PHA (0'5 µg/ml) + Anapsos.
Resultados expresados como media geométrica ± error estándar de la media geométrica

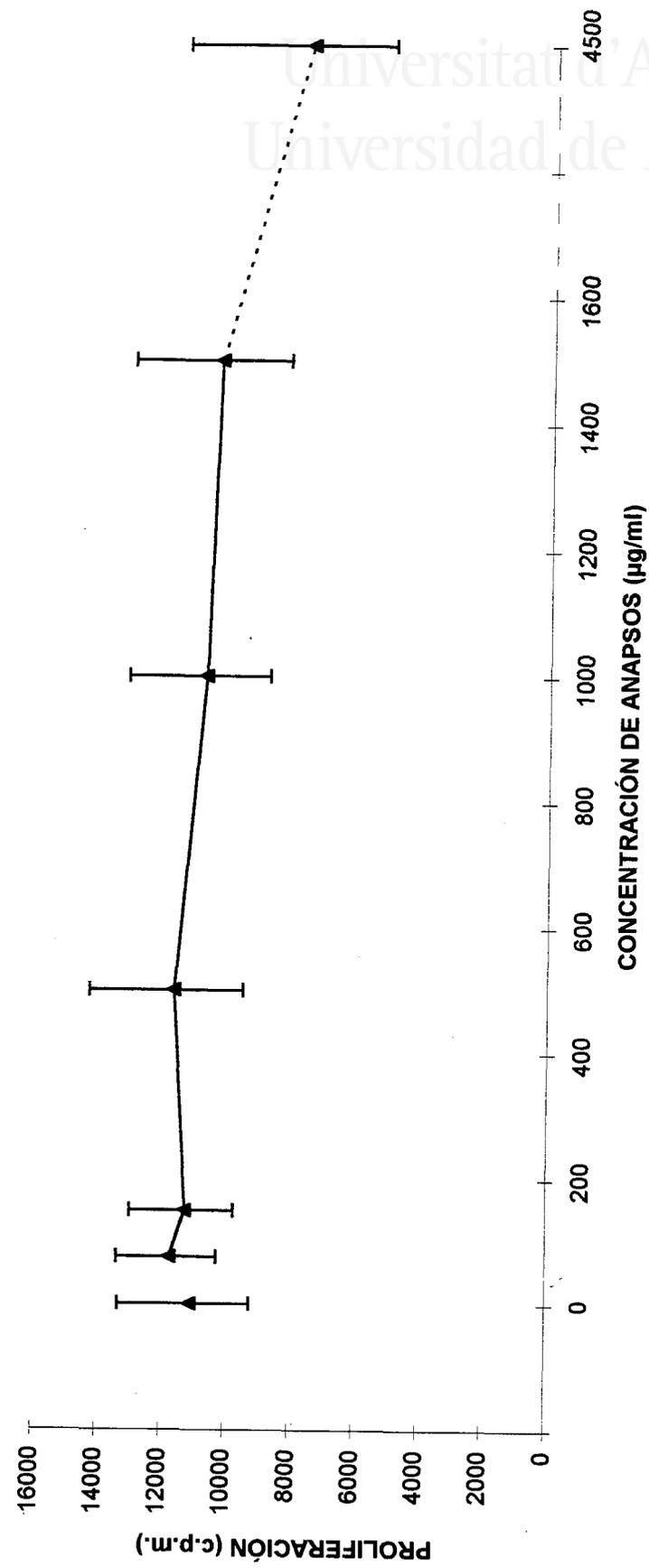


FIGURA 3

Proliferación en c.p.m de células estimuladas con PWM (4 µg/ml) + Anapso.
Resultados expresados como media geométrica ± error estándar de la media geométrica.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

t (horas) de cultivo	LPS	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
0	11 ± 4	11 ± 4	11 ± 4	11 ± 4
12	1141 ± 98	810 ± 67 *	755 ± 74 **	790 ± 84
24	877 ± 104	668 ± 85	1117 ± 92	1234 ± 120
48	669 ± 127	550 ± 36	569 ± 57	487 ± 41
72	598 ± 79	547 ± 79	560 ± 87	376 ± 36
96	587 ± 81	500 ± 71	481 ± 53	350 ± 76

TABLA I
 CINETICA DE PRODUCCION DE INTERLEUCINA 1 BETA
 PARA LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACION
 (LPS; LPS+PHA; LPS+ ANP; LPS+PHA+ANP)
 Resultados expresados en media ± e.s.m. (pg/ml)

* p < 0'05 ; ** p < 0'025 vs células estimuladas sólo con LPS



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

t (horas) de cultivo	LPS	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
0	31 ± 15	31 ± 15	31 ± 15	31 ± 15
12	623 ± 118	575 ± 118	468 ± 120,0	664 ± 130
24	162 ± 21	206 ± 5	348 ± 121	220 ± 44
48	64 ± 9	97 ± 19	52 ± 9	60 ± 13
72	61 ± 9	55 ± 13	39 ± 9	59 ± 13
96	31 ± 7	54 ± 20	40 ± 10	37 ± 12

TABLA II
 CINETICA DE PRODUCCION DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
 PARA LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACION
 (LPS; LPS+PHA; LPS+ANP; LPS+PHA+ANP)
 Resultados expresados como media ± e. s. m (pg/ml)



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

t (horas) de cultivo	LPS	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
0	20 ± 5	20 ± 5	20 ± 5	20 ± 5
12	20 ± 1	21 ± 4	19 ± 1	31 ± 6 *
24	19 ± 1	22 ± 1	20 ± 1	30 ± 5 *
48	37 ± 8	27 ± 1	23 ± 3	39 ± 11
72	41 ± 3	39 ± 5	51 ± 5	60 ± 5 ***
96	43 ± 11	17 ± 1	20 ± 2	12 ± 1

TABLA III:
 CINETICA DE PRODUCCION DE INTERLEUCINA 2
 PARA LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACION
 (LPS; LPS+PHA; LPS+ ANP; LPS+PHA+ANP)
 Resultados expresados como media ± esm (pg/ml)

* p<0'05; *** p<0'01 vs células estimuladas sólo con LPS



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

t(horas) de cultivo	LPS	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
0	17 ± 1	17 ± 1	17 ± 1	17 ± 1
12	22 ± 1	21 ± 1	20 ± 2	23 ± 2
24	18 ± 2	20 ± 1	19 ± 2	23 ± 2
48	14 ± 2	12 ± 1	11 ± 1	15 ± 1
72	12 ± 1	11 ± 0	10 ± 5	9 ± 1
96	9 ± 1	10 ± 1	11 ± 0	8 ± 1

TABLA IV
 CINETICA DE PRODUCCION DE INTERLEUCINA 4
 PARA LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACION
 (LPS; LPS+PHA; LPS+ANP; LPS+PHA+ANP)
 Resultados expresados como media ± e.s.m (pg/ml)

t(horas) de cultivo	LPS	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
0	6 ± 2	6 ± 2	6 ± 2	6 ± 2
12	6 ± 2	18 ± 4	7 ± 2	13 ± 1
24	6 ± 1	29 ± 9 **	8 ± 1	39 ± 8 ****
48	15 ± 1	43 ± 11 **	11 ± 1	49 ± 8 ***
72	16 ± 1	47 ± 11 ***	13 ± 3	63 ± 9 ****
96	33 ± 6	58 ± 11	35 ± 10	65 ± 10

TABLA V
CINETICA DE PRODUCCION DE INTERFERON GAMMA
PARA LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACION
(LPS; LPS+PHA; LPS+ANP; LPS+PHA+ANP)
Resultados expresados como media ± e.s.m (pg/ml)

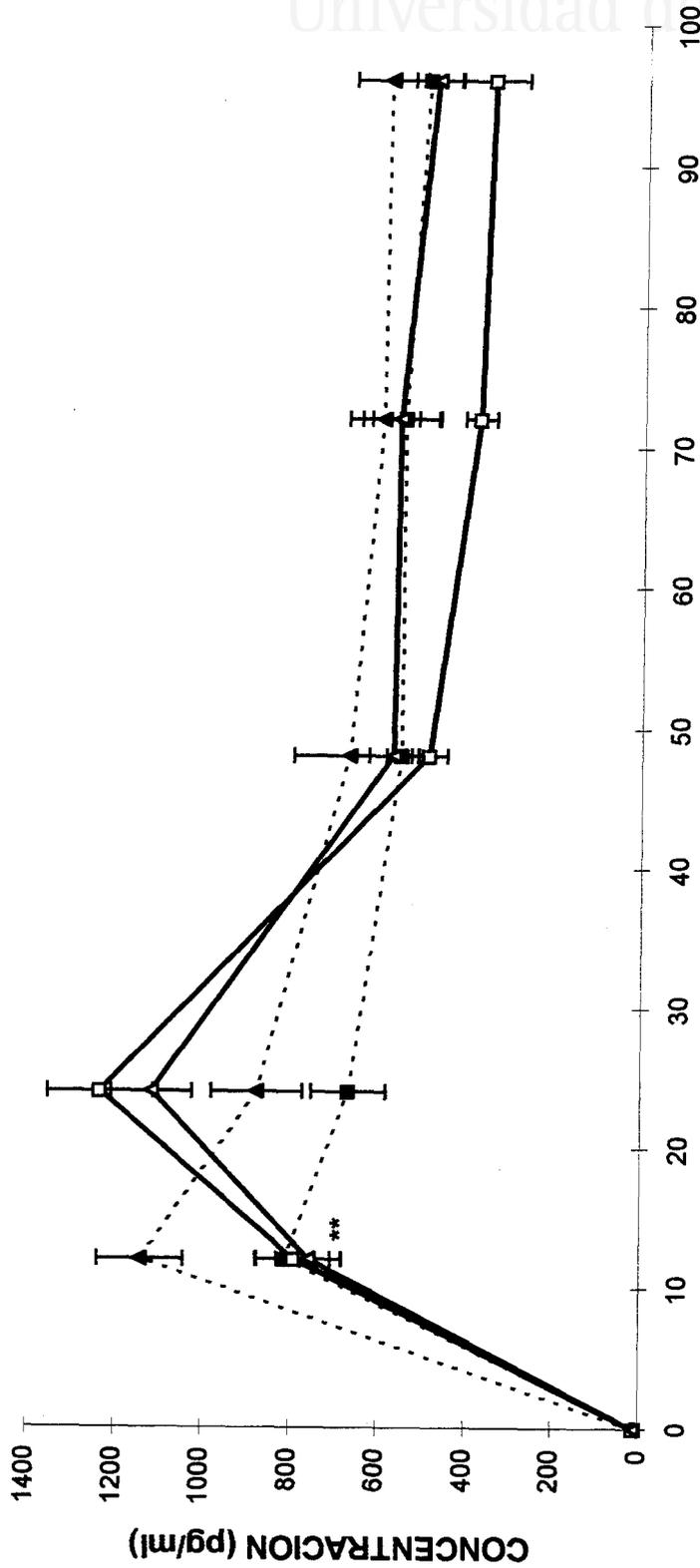
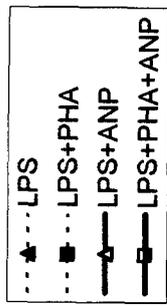
** p<0'025; *** p<0'01; **** p<0'005 vs células estimuladas sólo con LPS

t(horas) de cultivo	LPS	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
0	32 ± 16	32 ± 16	32 ± 16	32 ± 16
12	530 ± 96	3080 ± 334 *****	1418 ± 421 *	2130 ± 308
24	2444 ± 337	4000 ± 305 ****	2756 ± 475	4460 ± 202 *****
48	1911 ± 526	3426 ± 578 *	2122 ± 468	4000 ± 489 **
72	1768 ± 361	3040 ± 452 **	1299 ± 205	3940 ± 363 *****
96	1123 ± 423	3000 ± 500	1100 ± 300	2310 ± 489

TABLA VI
CINETICA DE PRODUCCION DE INTERLEUCINA 10
PARA LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ESTIMULACION
(LPS; LPS+PHA; LPS+ANP; LPS+PHA+ANP)
Resultados expresados como media ± e.s.m (pg/ml)

* p<0'05; ** p<0'025; **** p<0'005; ***** p<0'001 vs células estimuladas sólo con LPS

IL-1 BETA



TIEMPO (horas de cultivo)
FIGURA 4

Secreción de IL-1 beta para las diferentes condiciones de estimulación.
Resultados expresados como media \pm e.s.m.
(* $p < 0.05$; ** $p < 0.025$ vs células estimuladas sólo con LPS)



4.2 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS

Las Tablas I, II, III, IV, V y VI, muestran la cinética de producción de las diferentes citocinas analizadas, para las diferentes condiciones de estimulación. Los resultados vienen expresados como la media (\bar{x}) \pm error estándar de la media (e.s.m).

La Figura 4 muestra la producción de IL-1 β "in vitro" ($\bar{x} \pm \text{esm}$) en PBMNC de sujetos sanos estimuladas con Anapsos, comparada con la estimulación debida a los mitógenos solos. Los niveles de IL-1 β de células estimuladas con LPS+PHA, fueron inferiores a lo largo de toda la curva a los producidos por células control estimuladas solo con LPS, aunque solo a las 12 horas de cultivo las diferencias fueron estadísticamente significativas (810 ± 67 pg/ml vs. 1041 ± 98 pg/ml) ($p < 0'05$). También se aprecia en estas primeras 12 horas, una reducción estadísticamente significativa en los niveles de IL-1 β en el grupo de células estimuladas con LPS+Anapsos (755 ± 74 pg/ml), comparados con los niveles de dicha citocina en células control estimuladas solo con LPS (1041 ± 98 pg/ml) ($p < 0'025$). Globalmente, lo que se observa es un retraso de 12 horas en la síntesis y/o liberación de IL-1 β cuando las células fueron estimuladas con Anapsos, de modo que las curvas correspondientes a las células estimuladas con este producto alcanzaron un máximo de producción a las 24 horas, mientras que las curvas correspondientes a células estimuladas solo con LPS o con LPS+PHA alcanzaron dicho máximo a las 12 horas de cultivo. Las diferencias obtenidas entre los niveles de IL-1 β a las 24 horas en

células estimuladas con Anapsos y a las 12 horas en células estimuladas con LPS y PHA+LPS, no fueron significativas.

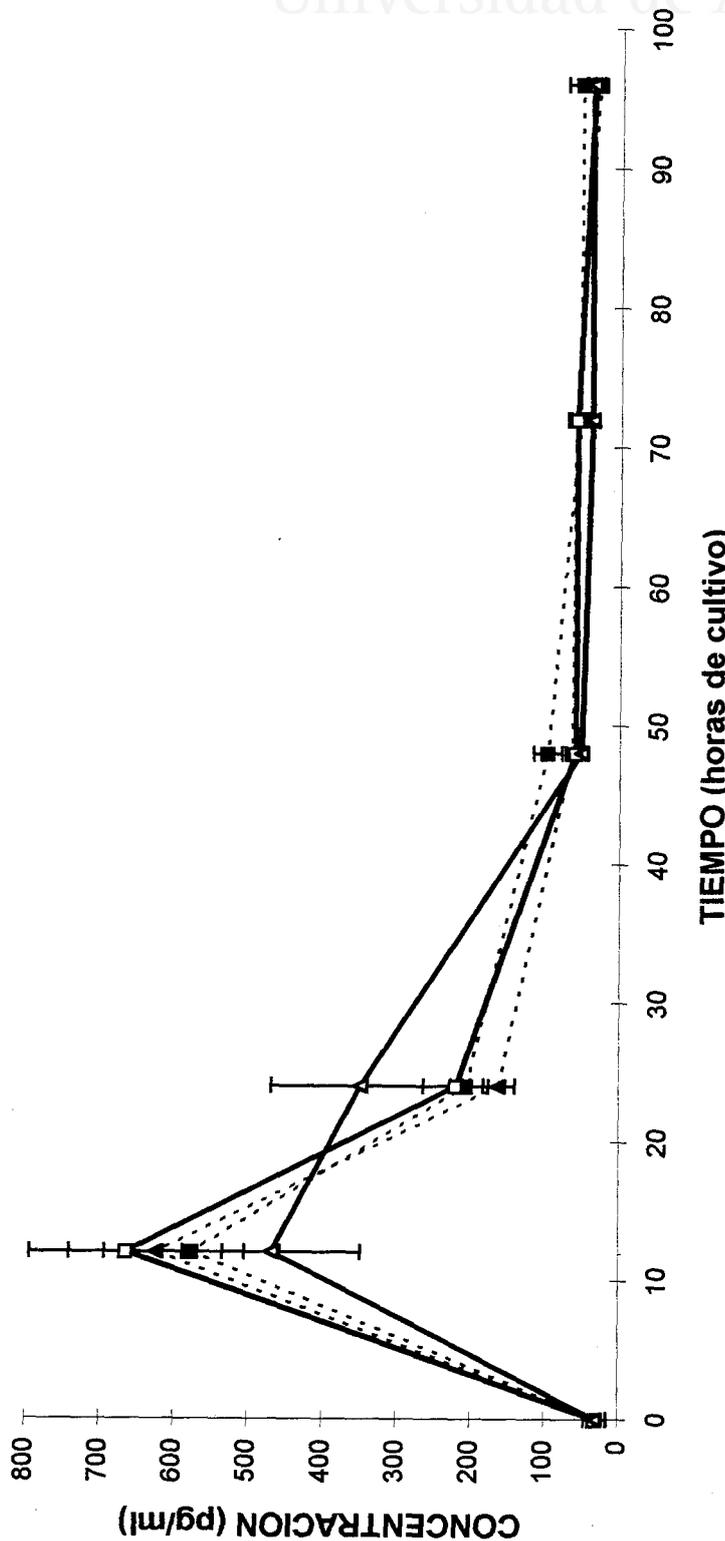
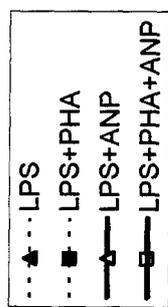
La Figura 5 muestra la cinética de producción de TNF- α "in vitro" ($\bar{x} \pm \text{esm}$) en PBMNc de los sujetos del estudio. Los niveles alcanzados de TNF- α en células estimuladas con LPS+Anapsos en las primeras 12 horas de cultivo (468 ± 122 pg/ml), fueron inferiores a los obtenidos en células estimuladas solo con LPS (623 ± 118 pg/ml); a las 24 horas de cultivo sin embargo, los niveles de TNF- α en las células estimuladas con LPS+Anapsos fueron mayores (358 ± 121 pg/ml) que los obtenidos con las células estimuladas solo con LPS (162 ± 21 pg/ml). No obstante, ni a las 12 ni a las 24 horas dichas diferencias fueron significativas.

La cinética de producción de la IL-2, aparece representada en la Figura 6 (resultados expresados en $\bar{x} \pm \text{esm}$). Cuando las células fueron estimuladas con PHA+LPS, la cinética de la curva de producción de IL-2 fue prácticamente idéntica a la obtenida cuando se estimularon las células solo con LPS, observándose tan solo una ligera elevación en los niveles de dicha citocina que en ningún caso fue significativa. Sin embargo, cuando a la suma de ambos mitógenos se añadió Anapsos, se produjo un incremento en los niveles de IL-2 a lo largo de toda la curva. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a las células control estimuladas solo con LPS, a las 12 horas de cultivo (31 ± 6 pg/ml vs. 20 ± 1 pg/ml) ($p < 0'05$), a las 24 horas (30 ± 5 pg/ml vs. 19 ± 1 pg/ml) ($p < 0'05$) y a las 72 horas, donde alcanzó su máxima significación (60 ± 5 pg/ml vs. 41 ± 3 pg/ml) ($p < 0'01$).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

TNF ALFA



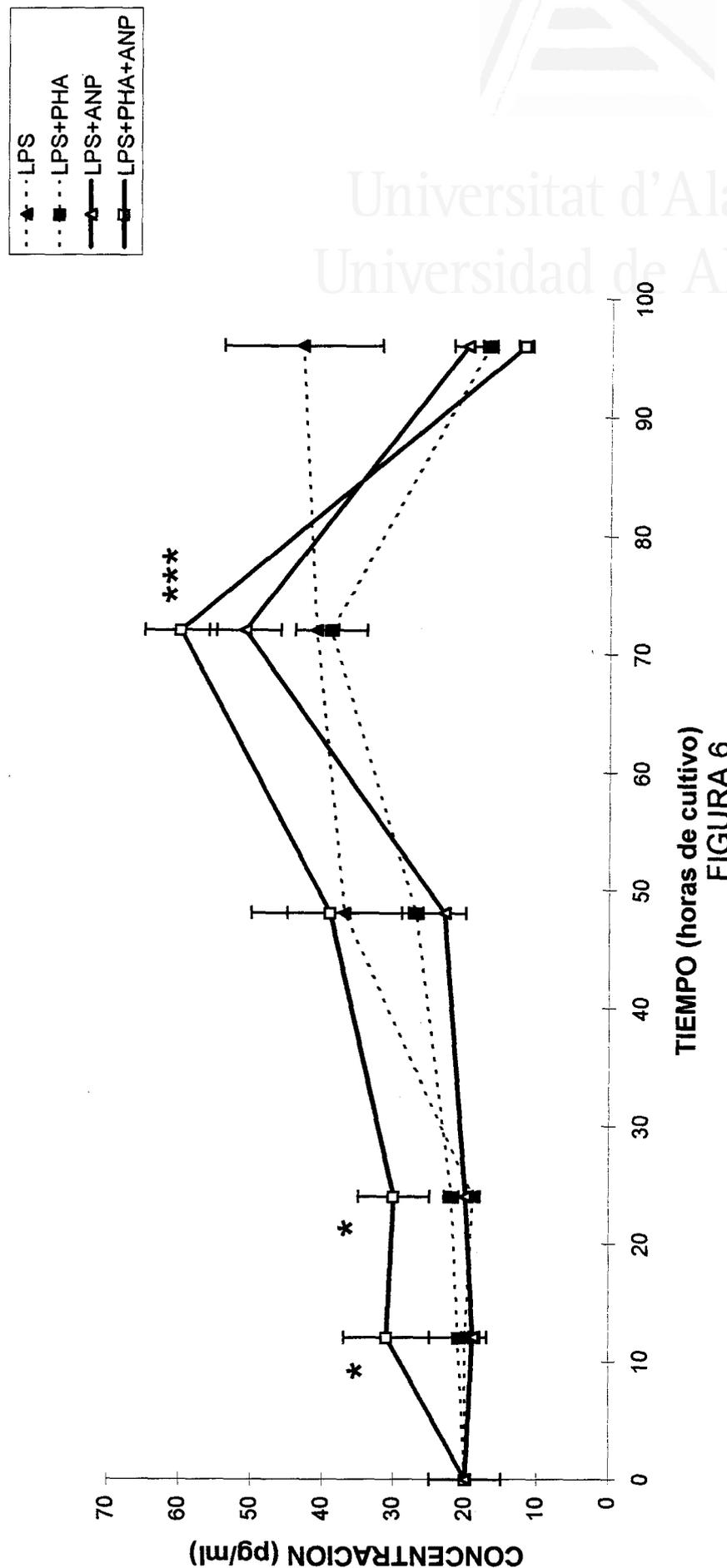
TIEMPO (horas de cultivo)
FIGURA 5

Secreción de TNF alfa para las diferentes condiciones de estimulación.
Resultados expresados como media \pm e.s.m.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

IL-2



TIEMPO (horas de cultivo)
FIGURA 6

Secreción de IL-2 para las diferentes condiciones de estimulación.
Resultados expresados como media \pm e.s.m.
(* $p < 0.05$; *** $p < 0.01$ vs células estimuladas sólo con LPS)

Con respecto a la producción "in vitro" de INF- γ , las distintas curvas aparecen representadas en la Figura 7 (resultados expresados en $\bar{x} \pm \text{esm}$). La adición de PHA al LPS se tradujo en un incremento en los niveles de producción de dicha citocina, si se comparaban con los obtenidos al estimular las células con LPS solo; estas diferencias se hicieron significativas a partir de las 24 horas de cultivo (29 ± 9 pg/ml vs. 6 ± 1 pg/ml) ($p < 0.025$), manteniéndose a las 48 (43 ± 11 pg/ml vs. 15 ± 1 pg/ml) ($p < 0.025$) y alcanzando su máxima significación a las 72 horas (47 ± 11 pg/ml vs. 16 ± 1 pg/ml) ($p < 0.01$). Cuando a PHA+LPS se añadió Anapsos, dichas diferencias aumentaron, alcanzando a partir de las 24 horas de cultivo una mayor significación que al añadir solo la PHA al LPS ($p < 0.005$ a las 24 horas, $p < 0.01$ a las 48 horas y $p < 0.001$ a las 72 horas).

En la Figura 8 aparece representada la cinética de producción de la IL-10 ($\bar{x} \pm \text{esm}$). Ocurrió algo similar a lo observado en el caso del INF- γ . Cuando se añade PHA al LPS, también se observa un incremento en los niveles de producción de dicha citocina, comparándolos con los obtenidos al estimular las células con LPS solo; estas diferencias fueron significativas a las 12 horas de cultivo (3080 ± 334 pg/ml vs. 530 ± 96 pg/ml) ($p < 0.001$), a las 24 (4000 ± 305 pg/ml vs. 2444 ± 337 pg/ml) ($p < 0.005$) a las 48 (3426 ± 578 pg/ml vs. 1911 ± 526 pg/ml) ($p < 0.05$) y a las 72 horas (3040 ± 452 pg/ml vs. 1768 ± 361 pg/ml) ($p < 0.025$). Al añadir Anapsos a PHA+LPS, las diferencias anteriores aumentaron, alcanzando a partir de las 24 horas de cultivo una mayor significación que al añadir solo la PHA al LPS ($p < 0.001$ a las 24 horas, $p < 0.025$ a las 48 horas y $p < 0.001$ a las 72 horas). La adición de Anapsos



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

INF-GAMMA

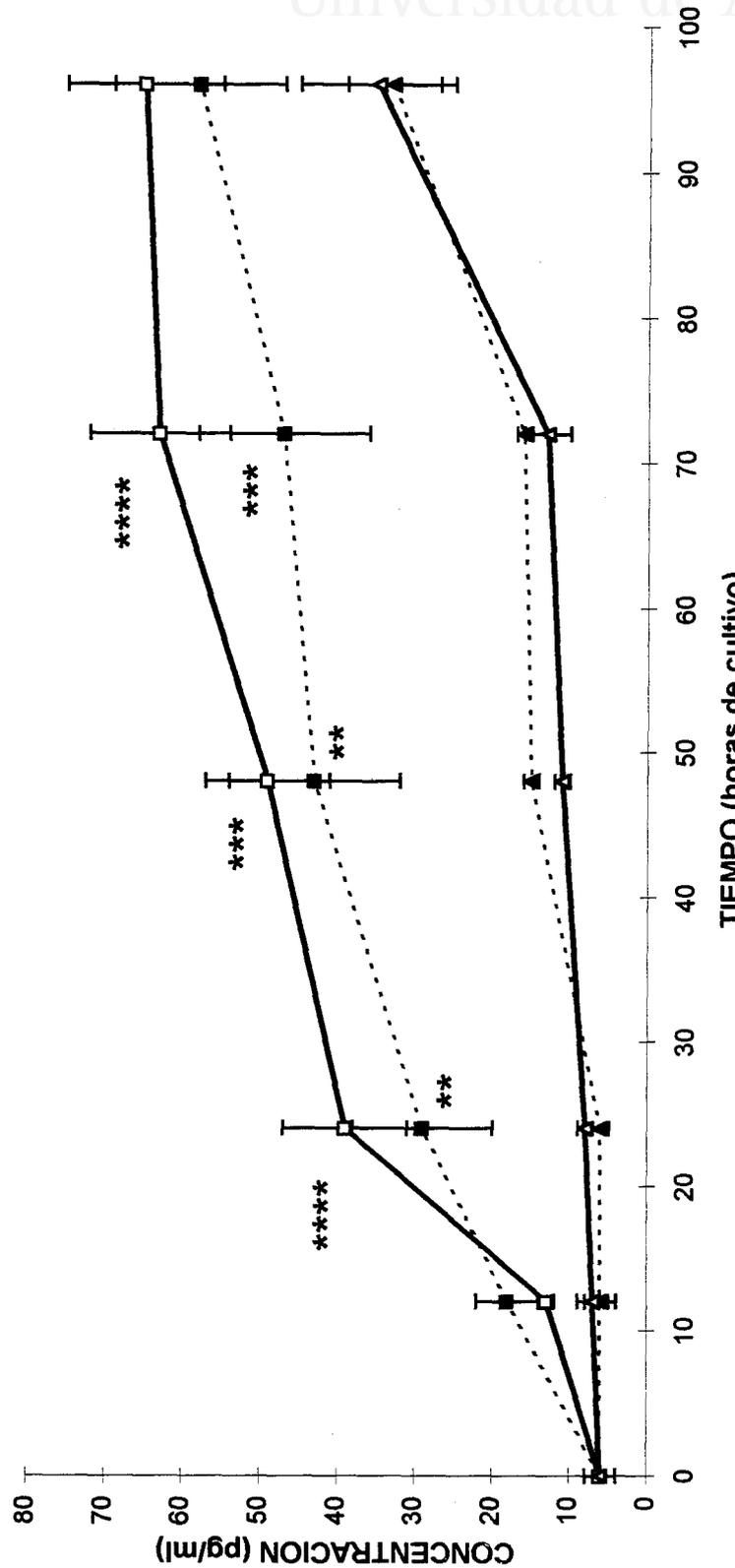
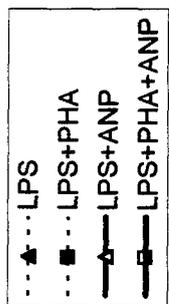


FIGURA 7

Secreción de INF-gamma para las diferentes condiciones de estimulación.
 Resultados expresados como media ± e.s.m.
 (**p<0'025; ***p<0'01; ****p<0'005 vs células estimuladas sólo con LPS)

IL-10

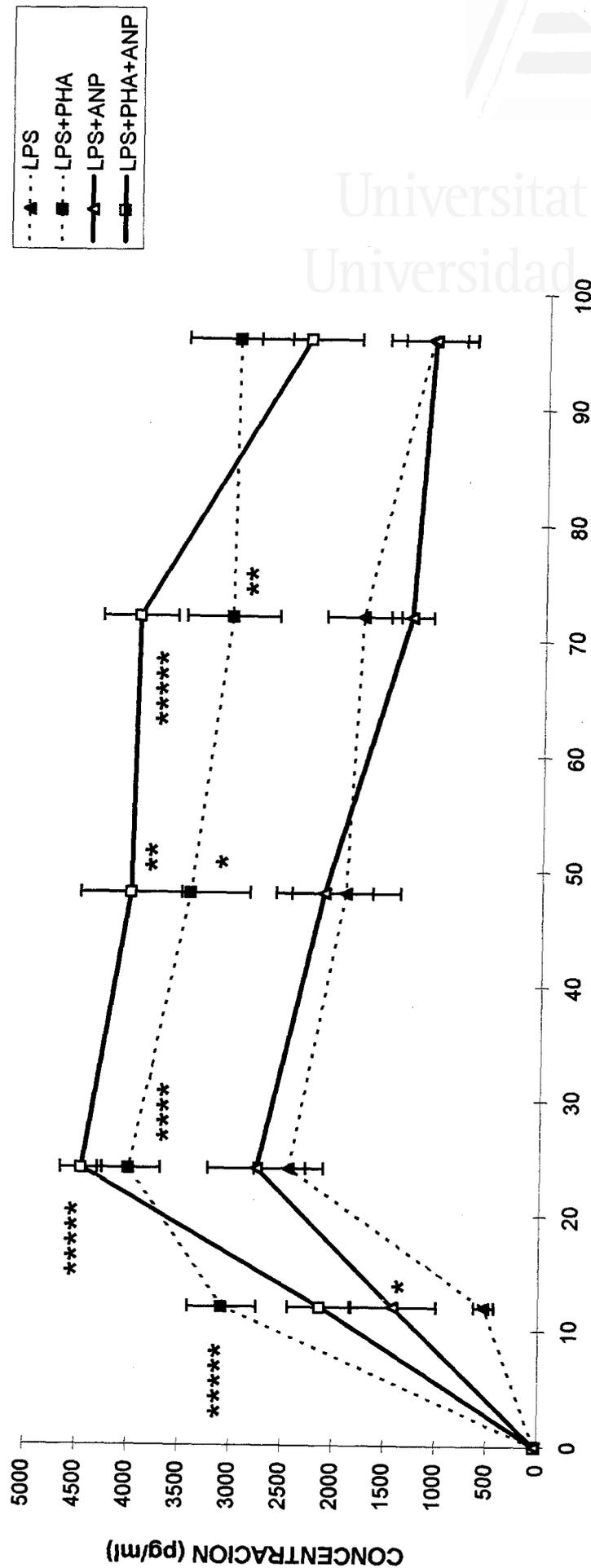


FIGURA 8
 Secreción de IL-10 para las diferentes condiciones de estimulación
 Resultados expresados como media ± e.s.m.
 (*p< 0'05; ** p< 0'025; **** p< 0'005; ***** p< 0'001 vs células estimuladas sólo con LPS)

a LPS, se tradujo también en un incremento significativo de dicha citocina (1418 ± 421) ($p < 0.05$) en las 12 primeras horas de cultivo.

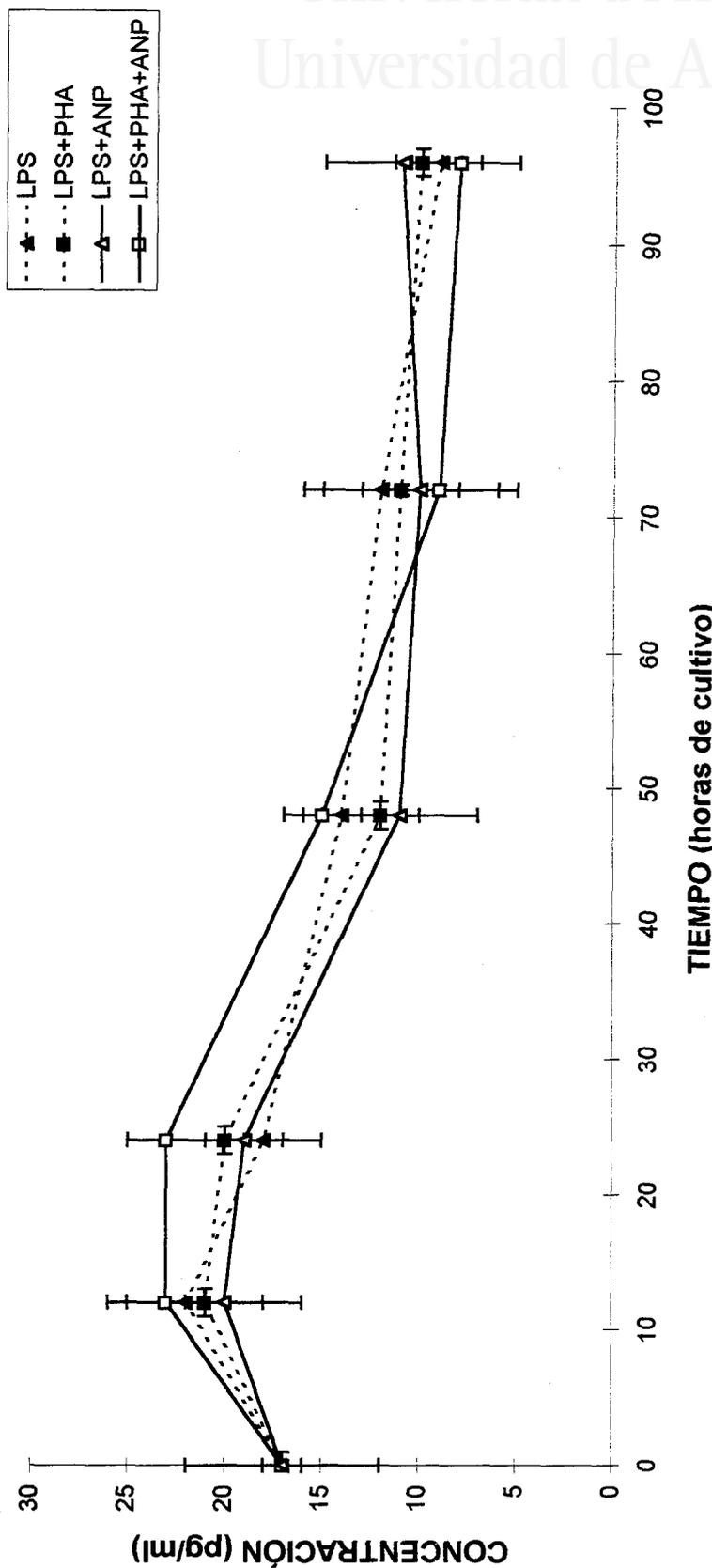
La cinética de producción de la IL-4 aparece representada en la Figura 9; los niveles obtenidos de dicha citocina en las 4 curvas fueron prácticamente idénticos, no existiendo en ningún caso diferencias significativas entre ellas.

La Tabla VII muestra las correlaciones lineales entre citocinas, que revierten cuando se añade Anapsos al cultivo.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

IL-4



TIEMPO (horas de cultivo)
FIGURA 9

Secreción de IL-4 para las diferentes condiciones de estimulación.
Resultados expresados como media \pm e.s.m.

ESTIMULO			CORRELACION	HORAS DE CULTIVO	(r)	(p)
LPS	PHA	ANP				
+	-	-	INF- γ / IL-10	12	- 0'60	0'002
+	+	-	INF- γ / IL-10	12	0'20	NS
+	+	+	INF- γ / IL-10	12	0'85	0'001
+	-	-	IL-1 β / IL-2	24	0'33	NS
+	+	-	IL-1 β / IL-2	24	0'80	0.004
+	+	+	IL-1 β / IL-2	24	- 0'80	0'005
+	-	-	IL-1 β / INF- γ	48	0'94	0'004
+	+	-	IL-1 β / INF- γ	48	0'22	NS
+	+	+	IL-1 β / INF- γ	48	- 0'69	0'003
+	-	-	IL-1 β / IL-10	48	0'25	NS
+	+	-	IL-1 β / IL-10	48	0'73	0'02
+	+	+	IL-1 β / IL-10	48	- 0'66	0'003

TABLA VII

Indica las correlaciones lineales entre citocinas, que revierten cuando se añade Anapsos al cultivo.

r: Coeficiente de correlación

p: nivel de significación

NS. no significativo



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4.3 ANÁLISIS FENOTÍPICO

Las Tablas VIII, IX y X muestran los porcentajes de expresión de diferentes antígenos de diferenciación leucocitarios, para las condiciones de estimulación F0 (células sin estimular), LPS+PHA, LPS+Anapsos y LPS+PHA+Anapsos; los resultados vienen expresados como la $\bar{x} \pm \text{esm}$.

Tras 48 horas de estimulación con LPS+PHA, se observa un descenso significativo en el porcentaje de expresión de marcadores de membrana característicos de la línea de linfocitos T (CD3, CD5, CD4) vs. células sin estimular a tiempo inicial (F0); en el caso del CD3 ocurre lo mismo, en la estimulación con LPS+Anapsos y LPS+PHA+Anapsos. Cuando las células fueron estimuladas con LPS+Anapsos, se produjo un incremento significativo del porcentaje total de células CD8+ ($p=0'001$) vs. F0 y del porcentaje total de células CD5+ ($p=0'001$) y células CD4+ ($p=0'004$) vs. LPS+PHA. La adición de Anapsos a LPS+PHA produjo un aumento significativo en la expresión del marcador CD4 ($p=0'017$), así como una tendencia al aumento en la expresión de CD3 y CD5; igualmente se produjo un incremento significativo (vs. F0) en el porcentaje de células expresando CD8 (Fig.10) (Tabla VIII).

La estimulación con LPS+PHA tras 48 horas de cultivo, produjo un incremento significativo (vs. F0) en el porcentaje de células CD4+CD25+ ($p=0'005$), que aumentó cuando se incluyó Anapsos en las condiciones de



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

ANTIGENO DE MEMBRANA	F0	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
CD5	79 ± 2	70 ± 3 **	80 ± 1 □□	75 ± 4
CD3	79 ± 2	62 ± 3 ***	59 ± 2 ***	65 ± 4 **
CD4	53 ± 2	40 ± 3 ***	49 ± 2 □□	46 ± 3 □
CD8	32 ± 1	35 ± 1	41 ± 1 **	40 ± 1 *
CD19	6 ± 1	10 ± 2	2 ± 1	4 ± 1

TABLA VIII

Porcentaje de células expresando los antígenos de membrana CD5, CD3, CD4, CD8 ó CD19, para las diferentes condiciones de estimulación.

Resultados expresados como media ± e.s.m.

* p<0'025; ** p<0'005; *** p<0'001 vs células sin estimular

□ p<0'025; □□ p<0'005 vs LPS+PHA



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

ANTIGENO DE MEMBRANA	F0	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
CD8+CD25+	4 ± 1	12 ± 2 **	19 ± 1 *** □□	18 ± 1 *** □□
CD8 BRIGHT	26 ± 2 •	22 ± 1 •	13 ± 1	18 ± 2
CD8 DIM	6 ± 1	12 ± 1	27 ± 1 *** □□□	22 ± 2
CD16+	10 ± 2	15 ± 3 **	23 ± 3 *** □	21 ± 5 p<0.1

TABLA X

Porcentaje de células CD16+, CD8+CD25+ y expresión de CD8 con alta (bright) o baja (dim) intensidad de fluorescencia, para las diferentes condiciones de estimulación.
 Resultados expresados como media ± e.s.m.

- ** p<0'005; *** p<0'001 vs células sin estimular
- p<0'05; □□ p<0'025; □□□ p<0'001 vs LPS+PHA
- p<0'001 vs LPS+ANP



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

ANTIGENO DE MEMBRANA	F0	LPS+PHA	LPS+ANP	LPS+PHA+ANP
CD4+CD25+	12 ± 2	25 ± 2 *	33 ± 1 ***	32 ± 2 ***
CD4+CD38+	46 ± 2	35 ± 3	45 ± 2 □	37 ± 3
CD4+CD45RA+	16 ± 2	17 ± 2	18 ± 2	19 ± 2
CD4+CD45RO+	8 ± 1	9 ± 2	13 ± 1 ** □□	13 ± 1 ** □□

TABLA IX

Porcentaje de células CD4+ con expresión simultánea de CD25, CD38, CD45RA o CD45RO, para las diferentes condiciones de estimulación.

Resultados expresados como media ± e.s.m

* p<0'01; ** p<0'005; *** p<0'001 vs células sin estimular
 □ p<0'01; □□ p<0'005 vs LPS+PHA

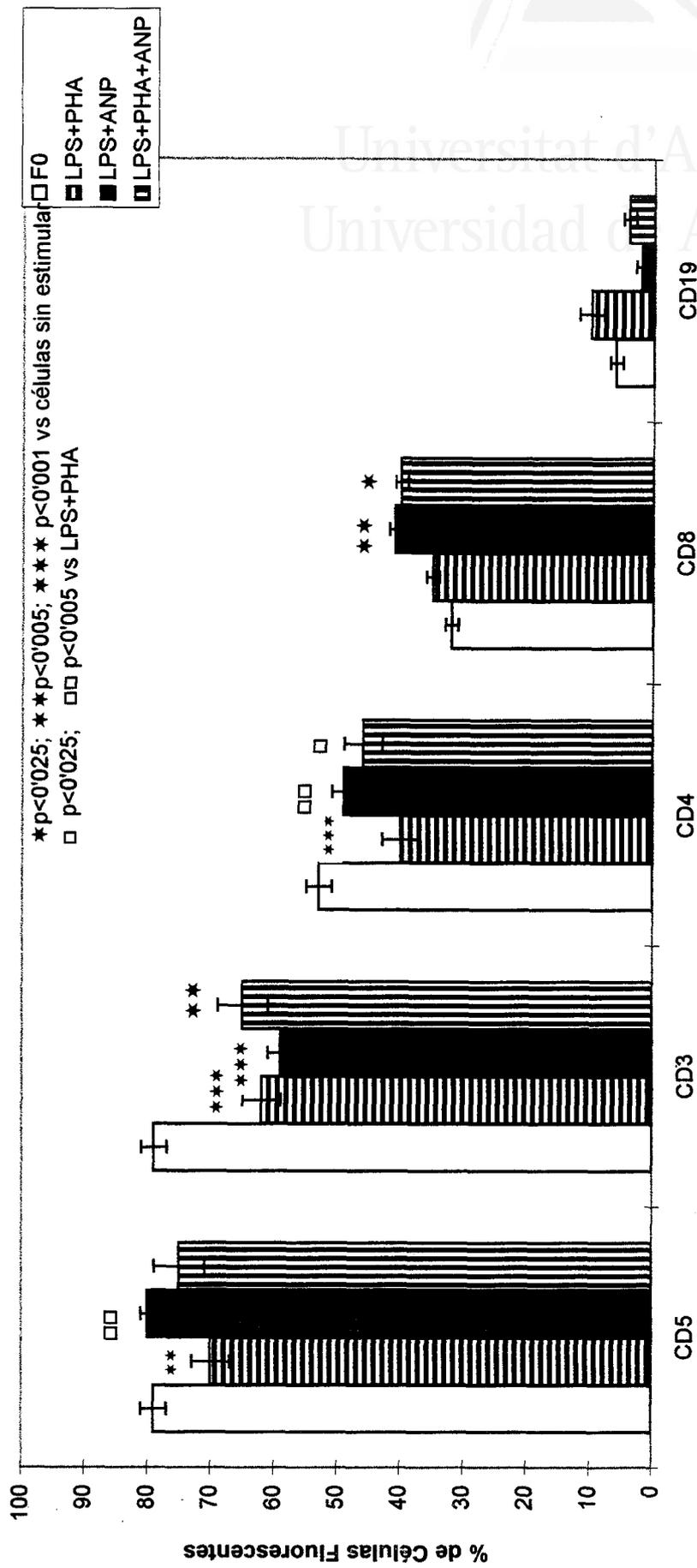


FIGURA 10

Porcentaje de células expresando los antígenos de membrana CD5, CD3, CD4, CD8 ó CD19, para las diferentes condiciones de estimulación. Resultados expresados como media \pm e.s.m.

estimulación ($p < 0'001$). La ligera tendencia al aumento del porcentaje de células CD4+CD45RO+ observada tras la estimulación con LPS+PHA (vs. F0), se transforma en un incremento significativo de dicho porcentaje ($p < 0'005$ vs. F0 y LPS+PHA), cuando las células son estimuladas con LPS+Anapsos, apreciándose también en este último caso un incremento significativo en el porcentaje de células CD4+CD38+ ($p = 0'01$) vs. LPS+PHA. La adición de Anapsos a LPS+PHA produjo una tendencia al aumento en el porcentaje de células CD4+CD25+ vs. LPS+PHA, así como un incremento significativo de la proporción de células CD4+CD45RO+ vs. F0 y LPS+PHA ($p < 0'005$) (Fig.11) (Tabla IX).

La estimulación con LPS+PHA produjo tras 48 horas de cultivo un incremento significativo vs. F0 ($p < 0'005$), de los porcentajes de células CD8+CD25+ y CD16+. Cuando las células fueron estimuladas con LPS+Anapsos, los niveles de significación para dichas células aumentaron ($p < 0'001$ vs. F0), y también se observó un incremento significativo vs. LPS+PHA ($p = 0'024$ para CD8+CD25+ y $p = 0'035$ para las CD16+). La adición de Anapsos a LPS+PHA se tradujo también en un incremento significativo del porcentaje de células CD8+CD25+ ($p = 0'02$; $p < 0'001$ vs. F0) y en una tendencia al aumento de las células CD16+ (vs. F0). El porcentaje de células con alta y baja densidad de expresión de CD8, también se modificó en función del estímulo recibido. Así cuando las células están sin estimular (F0) o estimuladas con LPS+PHA, los patrones son similares, mostrando un mayor porcentaje de células con alta expresión del receptor de membrana CD8 (CD8_{bright}) ($p < 0'001$ vs LPS+Anapsos). La estimulación con LPS+Anapsos da lugar a un patrón opuesto al anterior, con un porcentaje superior

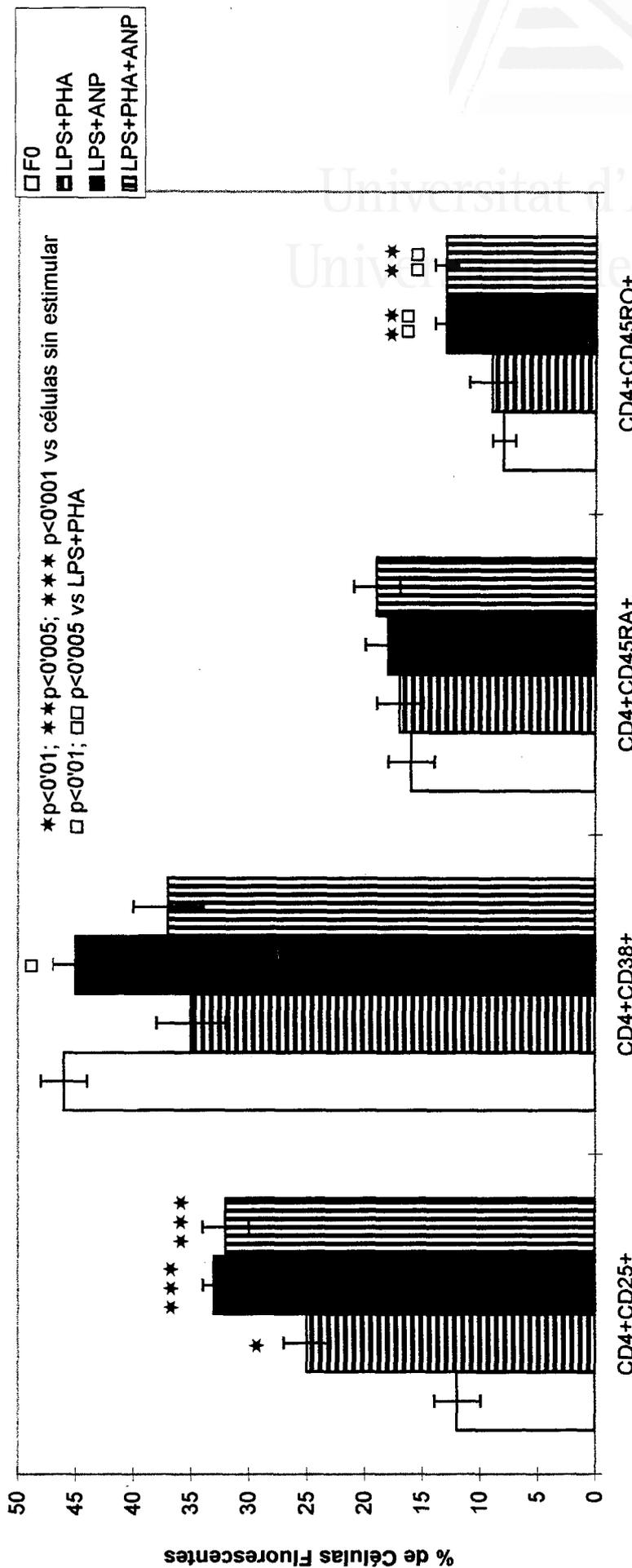


FIGURA 11

Porcentaje de células CD4+ con expresión simultánea de CD25, CD38, CD45RA o CD45RO,
 para las diferentes condiciones de estimulación.
 Resultados expresados como media \pm e.s.m.

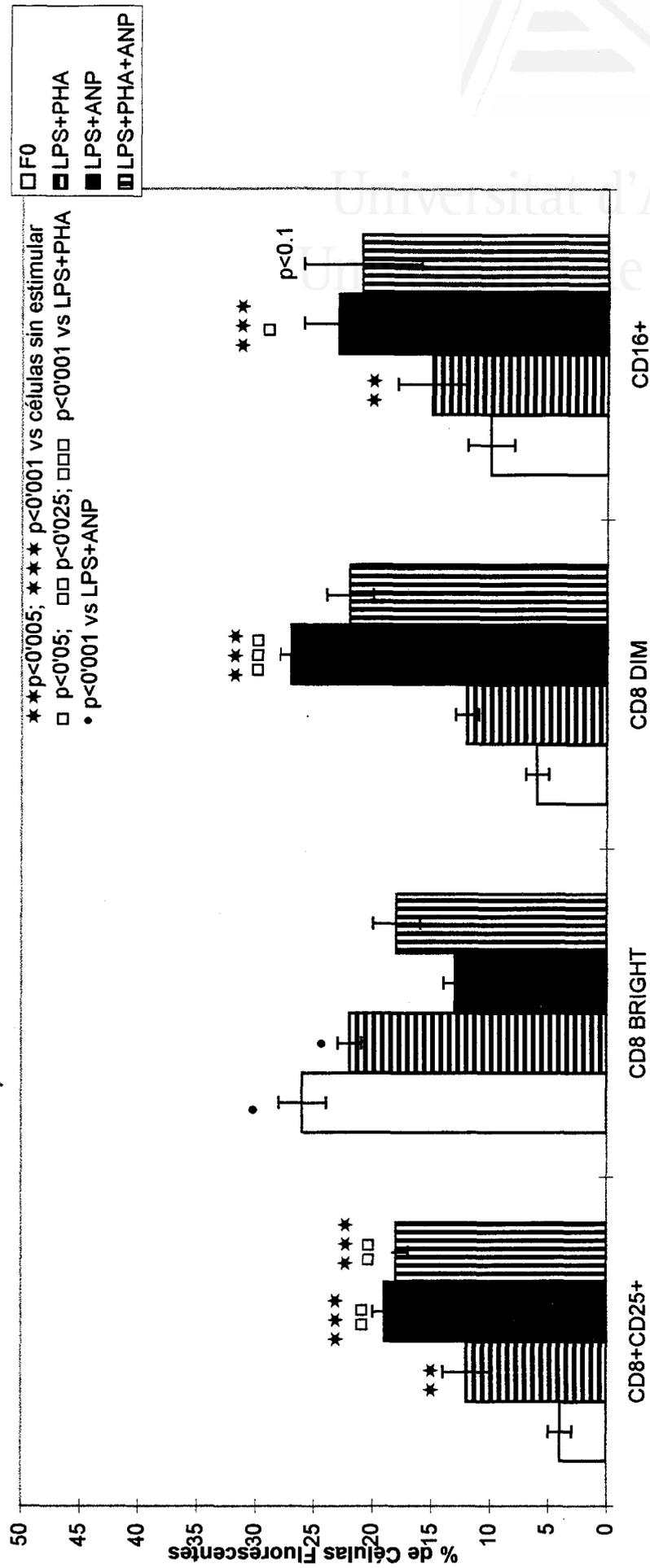


FIGURA 12

Porcentaje de células CD16+, CD8+CD25+ y expresión de CD8 con alta (bright) o baja (dim) intensidad de fluorescencia, para las diferentes condiciones de estimulación. Resultados expresados como media ± e.s.m.

de células con baja expresión de dicho receptor ($CD8_{dim}$) vs F0 y LPS+PHA ($p < 0'001$). La adición de Anapsos a LPS+PHA, tiende a disminuir el porcentaje de células $CD8_{bright}$ y a aumentar el de células $CD8_{dim}$ (Fig.12) (Tabla X).

No se produjeron cambios significativos en los porcentajes de expresión de células $CD19+$ (Fig.10) ni de células $CD4+CD45Ra+$ (Fig.11), para las diferentes condiciones de estimulación.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

V.- DISCUSIÓN



V-DISCUSIÓN

En 1986, fue propuesta una subdivisión mayor de los linfocitos T cooperadores CD4+ de ratón, basada en diferencias en sus patrones de producción de citocinas. Hoy se acepta que los clones de linfocitos T de la subpoblación TH1, sintetizan y secretan entre otras citocinas interleucina-2 e interferón-gamma, pero no interleucina-4 ni interleucina-5, mientras que los clones de linfocitos T de la subpoblación TH2 producen entre otras IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 pero no IL-2 ni INF- γ ; una tercera subpoblación de linfocitos T, la TH0, sintetiza un patrón mixto de dichas citocinas (185).

Diversos autores han aislado clones de linfocitos T humanos, similares a los TH0, TH1 y TH2 del ratón, hablando de patrones de citocinas TH0-like, TH1-like y TH2-like. Algunos de estos autores han comprobado además que dichos patrones pueden acumularse en los tejidos o en la sangre periférica de pacientes con distintas enfermedades, siendo el patrón distinto dependiendo de la enfermedad en cuestión, y comprueban que la inmunización de los pacientes con agentes diferentes evoca respuestas distintas, TH1 o TH2. Así, tras la primoactivación, los linfocitos T "naïve" solo producen IL-2; a los pocos días de haberse activado se transforman en células TH0, las cuales dependiendo del tipo de antígeno estimulante y tras varios días de exposición al mismo, se transforman en células TH1 o TH2. La subpoblación TH1 representa a las células efectoras más importantes en reacciones inflamatorias asociadas a respuestas vigorosas de hipersensibilidad retardada, pero con baja

producción de anticuerpos, tal como ocurre por ejemplo en la dermatitis por contacto o en infecciones debidas a algunas bacterias intracelulares. El fenotipo funcional de la mayor parte de los clones TH2, no se asocia a respuestas de hipersensibilidad retardada, pero sí a producción persistente de anticuerpos (incluyendo IgE) y eosinofilia, tal como ocurre en infecciones helmínticas en humanos, y en la alergia (203,210,227).

Numerosas enfermedades (Artritis Reumatoide, Enfermedad de Crohn, enfermedad de Lyme) se han asociado con producción excesiva "in vitro" de citocinas inflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , y otras enfermedades como el SIDA o el lupus eritematoso sistémico, se han asociado con una producción disminuída de citocinas TH1-like como la IL-2 y el INF- γ (40). El efecto que determinados fármacos como el metrotexate, ejercen como restauradores de este desequilibrio, se ha relacionado en determinados casos con una mejoría clínica de los pacientes (308). También hay estudios que demuestran que la disfunción que se produce en la liberación de citocinas durante la infección viral, puede ser la responsable de la supresión de la respuesta inmune que acompaña a determinadas infecciones virales (309).

Dado pues que las citocinas juegan un papel importante en la homeostasis inmunológica, la determinación de variaciones en sus niveles puede ser importante para una mejor comprensión de las alteraciones inmunológicas que acompañan a distintas enfermedades (76). Es por ello, por lo que basándonos en los diversos

estudios que apoyan un papel de Anapsos como potencial inmunomodulador, decidimos iniciar el presente trabajo.

Estudios previos (299) "in vitro" con PBMNc de controles sanos estimuladas con ConA demostraron una supresión dosis dependiente de la proliferación al añadir Anapsos al cultivo, así como una inhibición dosis dependiente en la secreción de IL-2. En ambos casos, la supresión fue máxima con las dosis de 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de Anapsos. La medición de citocinas como la IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo, demostró un incremento dosis dependiente en la secreción de dichas citocinas, cuando las PBMNc fueron estimuladas con Anapsos y ConA; este incremento resultó máximo con dosis de 500-1000 $\mu\text{g/ml}$. Cuando las células se estimularon con Anapsos solo (sin ConA) a razón de 1000 $\mu\text{g/ml}$, se produjo igualmente un incremento con respecto al control sin estimulación, en la secreción de dichas citocinas, aunque los niveles obtenidos fueron mucho más bajos.

En el presente trabajo hemos mostrado que Anapsos "in vitro" a dosis consideradas efectivas cuando se usan *in vivo* (<500 $\mu\text{g/ml}$), es capaz de estimular la proliferación de PBMNc de sujetos sanos en cultivo y de aumentar la secreción de IL-2 a lo largo de toda la cinética de la curva, con niveles máximos de citocina a las 72 horas de cultivo, que coinciden con el tiempo de máxima respuesta proliferativa. Un efecto de estimulación de la proliferación ya ha sido referido en estudios previos (296).

Por otro lado, Anapsos es capaz de reducir, al menos inicialmente, la liberación de IL-1 β al medio, y tiende a disminuir los niveles de TNF- α en las primeras 12 horas de cultivo.

La disparidad manifiesta entre los resultados de nuestro estudio y los obtenidos en el estudio citado previamente (299), creemos que se debe básicamente a las diferencias metodológicas entre ambos. El mitógeno utilizado para la estimulación y las dosis de Anapsos empleadas, son distintas. De hecho, cuando nosotros utilizamos dosis superiores del producto, en el caso de la proliferación también observamos una tendencia a la supresión, pero que en ningún caso llega a ser significativa. Por otro lado hay que tener en cuenta que el efecto de estimulación sobre la proliferación se hace evidente cuando las células son estimuladas solo con Anapsos, quedando dicho efecto enmascarado en la co-estimulación con los otros mitógenos utilizados; los autores del trabajo previo no midieron el efecto que Anapsos por sí solo podía ejercer sobre dicho parámetro (299).

En cuanto al efecto diferente del producto sobre los niveles obtenidos de citocinas inflamatorias como la IL-1 β o el TNF- α en ambos estudios, creemos que además puede haber sido decisivo el hecho de que los autores del mencionado estudio (299) han utilizado un solo punto en el tiempo, para comparar los niveles de una misma citocina en condiciones distintas de estimulación. Así por ejemplo, si nos fijamos en la cinética completa de la IL-1 β obtenida en el presente estudio (Fig.4), se comprueba que hay dos grupos de curvas diferentes. Uno de ellos corresponde a las dos curvas en las que la estimulación se ha hecho con LPS solo o con LPS+PHA;

el otro corresponde a estas mismas curvas pero añadiendo Anapsos al cultivo. Las dos curvas sin Anapsos obtienen un máximo de producción a las 12 horas, mientras que al añadir éste, se produce un enlentecimiento o retraso en la liberación de la IL-1 β al medio de cultivo, de modo que ambas curvas alcanzan dicho máximo a las 24 horas. Si analizamos un solo punto de corte para las 4 curvas, por ejemplo a las 24 horas, como los niveles obtenidos en las curvas con Anapsos son mayores, podríamos interpretar erróneamente que Anapsos está estimulando de algún modo la síntesis o la liberación de dicha citocina al medio, cuando en realidad está ocurriendo justo lo contrario.

Parte de los hallazgos observados con Anapsos sobre la IL-1 β en el presente estudio, concuerdan con los obtenidos en estudios experimentales en animales tratados con dicho producto por vía oral (300,301).

El hecho de que Anapsos "in vitro" pueda ser capaz de bloquear o retrasar, al menos inicialmente, la producción o la liberación de citocinas inflamatorias como la IL-1 β o el TNF- α , puede resultar de interés para explicar como podría estar actuando el producto desde un punto de vista inmunológico, al menos parcialmente, sobre determinadas patologías en las que un aumento en los niveles de dichas citocinas pudiera estar jugando un papel en la patogenia de las mismas. Así por ejemplo, la IL-1 media un importante número de procesos patológicos asociados a enfermedad, como puede ser el caso del psoriasis u otras enfermedades (310,311). En el caso del psoriasis, el efecto antiinflamatorio de extractos vegetales del género *Polypodium*, ya ha sido puesto de manifiesto por otros autores (312).

Por otro lado, es sabido que citocinas como la IL-1- α , la IL-1 β y el TNF- α , juegan un papel importante en la destrucción del tejido conectivo, al estimular la PGE2 y la colagenasa (71). En este sentido, los efectos referidos de Anapsos sobre la IL-1 β y el TNF- α , pueden justificar, también en parte y desde un punto de vista inmunológico, la ya descrita actividad colagenopoyética del producto (306,307).

Igualmente, se ha demostrado el papel que niveles aumentados de IL-1 β y/o TNF- α y subsecuentemente de PGE2, juegan en la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la Esclerosis Múltiple (313,314), así como el papel terapéutico de agentes antiinflamatorios no esteroideos en estas enfermedades (315). Desde este punto de vista, aquellos fármacos que como en el caso del Anapsos sean capaces de disminuir la producción o la liberación de dichas citocinas, pueden resultar de utilidad en el tratamiento de estas enfermedades (316). De hecho, diversos autores han podido comprobar en estudios experimentales realizados con Anapsos, que este compuesto actúa como potencial agente neurotrófico y neuroinmunoregulador (300), normalizando las alteraciones neuroinmunes cerebrales observadas en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, y revirtiendo la hiperactividad motora y el deterioro del aprendizaje típicos de esta enfermedad (301).

De cualquier forma, pensamos que para confirmar definitivamente la relevancia clínica de los datos anteriores, son necesarios nuevos estudios "in vivo" que permitan demostrar un efecto mantenido de la droga sobre dichas citocinas, a lo largo del tiempo.

En cuanto al INF- γ , los resultados obtenidos parecen más debidos a la acción de la PHA, que al propio Anapsos. De hecho, y tal como ocurre en el presente estudio, ya se ha demostrado que la estimulación conjunta de PBMNc con LPS+PHA, reduce la producción de IL-1 si se compara con LPS solo y aumenta la producción de INF- γ si se compara con PHA sola (317). No obstante, se observa que cuando a LPS+PHA se añade Anapsos, se produce un aumento en la significación estadística para el INF- γ cuando ambas curvas se comparan con LPS solo, que puede interpretarse como un papel potenciador del producto sobre la acción ejercida por la PHA en dicha citocina. Lo mismo ocurre con la IL-10.

Desde el punto de vista del INF- γ , su aumento puede resultar interesante para explicar en algún caso y desde un punto de vista inmunológico, las ya referidas acciones antitumoral y/o antivírica del producto (294,295,302-304), dado el efecto de estimulación que dicha citocina ejerce sobre la inmunidad celular. Este aspecto del producto se ve reforzado por su acción incrementadora sobre la IL-2.

El aumento de IL-10 puede resultar interesante, por su efecto coestimulador con otras citocinas (IL-2) en el crecimiento de timocitos, por su conocido efecto inhibitorio sobre las citocinas inflamatorias, así como por su efecto estimulante de la inmunidad humoral sobre los linfocitos B (100). El efecto de Anapsos en la producción de anticuerpos ya ha sido referido en estudios previos (296).

Anapsos no parece ejercer en principio ningún efecto apreciable sobre la producción de IL-4.

De todo lo expuesto en el presente estudio y fijándonos en las correlaciones obtenidas entre las citocinas para las diferentes condiciones de estimulación (Tablas VII), se observa que Anapsos no actúa del mismo modo sobre las diferentes citocinas medidas.

El efecto opuesto e independiente que Anapsos parece ejercer sobre la IL-1 β y la IL-2 es reforzado por una de las correlaciones del presente estudio que más llama la atención. Cuando nosotros estimulamos las células en cultivo con LPS+PHA, se observa una correlación positiva ($r=0'80$; $p=0'004$) que está indicando que la acción de LPS+PHA sobre ambas citocinas es idéntica. Sin embargo, cuando añadimos Anapsos a LPS+PHA, dicha correlación se hace negativa ($r=-0'80$; $p=0'005$). Lo mismo ocurre en el caso de la IL-1 β y el INF- γ o la IL-1 β e IL-10. Del mismo modo, correlaciones que resultan negativas cuando las células se estimulan sólo con mitógenos, se transforman en positivas al añadir Anapsos al medio de cultivo; éste es el caso de la IL-10 y el INF- γ .

Podemos pues concluir que el producto parece ejercer un efecto opuesto e independiente sobre la IL-1 β e IL-2, IL-1 β e INF- γ e IL-1 β e IL-10. Sin embargo, ejerce un efecto similar sobre la IL-10 e INF- γ ; algunas de estas correlaciones apoyan un posible efecto sinérgico de Anapsos y PHA sobre la IL-10 y el INF- γ . De este modo, aunque otros estímulos puedan estar envueltos en la autoregulación de la producción de citocinas, Anapsos también ejerce un papel importante en la misma.

Estos resultados, sugieren un efecto pleiotrópico "in vitro" de Anapsos para las diferentes citocinas analizadas, que puede deberse a un modo de acción diferente sobre distintas poblaciones del sistema inmune. Por un lado Anapsos está ejerciendo un efecto inhibitorio posiblemente sobre los monocitos, principales células secretoras de IL-1 β y TNF- α ; por otro está estimulando a diversos clones de linfocitos T (principalmente TH1), o tal vez TH0 (IL-2, INF- γ , IL-10), para que produzcan y/o secreten sus citocinas al medio de cultivo. Creemos que serán necesarios nuevos estudios en poblaciones celulares separadas, para poder confirmar definitivamente estos datos.

La citometría de flujo constituye un herramienta muy sensible de identificación y caracterización de poblaciones celulares. Una de sus aplicaciones más comunes en el campo de la Clínica, incluye el inmunofenotipado de antígenos de diferenciación de superficie celulares (318) . Además de determinar el número y la función de granulocitos, linfocitos y monocitos, han llegado a ser rutina en el diagnóstico y en la monitorización del tratamiento con posibles agentes inmunomoduladores. La inmunomodulación de la expresión de antígenos de superficie celulares, puede ser reconocida como un cambio, en el tiempo, del porcentaje de células positivas para dichos antígenos y/o un cambio en la densidad relativa de los mismos (318). El fenotipo, en ocasiones puede indicar una cierta función. Esta correlación puede resultar en parte del hecho que muchas de las moléculas de superficie celulares reconocidas por los anticuerpos monoclonales, juegan un papel específico en las funciones de los linfocitos, como es el reconocimiento del antígeno o la lisis de

células infectadas por virus. Otras de estas moléculas constituyen marcadores de línea celular. Otras reflejan madurez o activación celular o receptores para citocinas (32,34-37).

Estudios "in vivo" realizados en sujetos sanos, demuestran que Anapsos incrementa el porcentaje de células CD8+ sin alterar el porcentaje de células CD3+ ni el de células CD4+ (296). En un estudio preliminar en pacientes con Esclerosis Múltiple, otros autores demuestran también un aumento del porcentaje de células CD8+, así como una disminución del porcentaje de células CD4+CD45RO+ (298). Otros autores refieren un efecto del producto sobre células CD8+ en pacientes con otras patologías (297).

Nosotros demostramos que Anapsos "in vitro" a dosis terapéuticas incrementa el porcentaje de linfocitos T, tanto de su población cooperadora como especialmente de la supresora/citotóxica. El aumento en la coexpresión de células CD4+ y células CD8+ con antígenos de membrana como el CD25, CD38, y CD45RO, indica que Anapsos es capaz de inducir igualmente la expresión de marcadores de activación en dichas células.

La disminución en la expresión de marcadores típicos de linfocitos T observada en la estimulación con LPS+PHA, parece ser debida a una disminución relativa del porcentaje de los linfocitos CD4+ (no activados), a expensas sobre todo de un aumento en el porcentaje de células CD16+ y en menor grado de linfocitos B.

La mayor parte de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo está mediada por células NK y por una pequeña subpoblación de linfocitos T, que expresan CD16 (5). Este marcador se expresa en más del 95% de las PBMNC con actividad citotóxica para distintas líneas celulares (319). Aproximadamente, entre un 30-50% de las células NK también expresan el antígeno CD8 pero con una intensidad de fluorescencia baja (320). Los resultados de este estudio demuestran que Anapsos incrementa el porcentaje de células con expresión de dichos marcadores de membrana, caracterizadas como citotóxicas.

En resumen, Anapsos "in vitro" puede ejercer un efecto estimulante en la proliferación y activación de linfocitos T y de células NK. Ello permite explicar, desde un punto de vista inmunológico, los resultados obtenidos con el producto in vitro e in vivo de su actividad antitumoral y antivírica (294,295,302-304), y apoya en parte, los obtenidos en el estudio sobre citocinas, donde se demuestra un efecto predominante del producto sobre la inmunidad celular, potenciando la producción de IL-2 e INF- γ (321). Otros autores también encuentran este efecto predominante del producto sobre la inmunidad celular (322).

No obstante, serán necesarios nuevos estudios para elucidar definitivamente la relación existente entre los cambios fenotípicos observados y su función.

Las hormonas esteroideas glucocorticoideas son ampliamente usadas para suprimir de modo eficaz las manifestaciones de numerosas reacciones inflamatorias e inmunes. El número total de linfocitos T circulantes disminuye marcadamente; el

número de células CD4⁺ se reduce en un mayor grado que el número de células CD8⁺. Inhiben la respuesta linfoproliferativa *in vitro*, en parte debido a una lesión en la síntesis y secreción de interleucina-2, que más probablemente es el resultado indirecto de una producción suprimida de la IL-1 β por los monocitos. El efecto de los corticosteroides sobre los linfocitos B es menor. La terapia con esteroides no altera ni la actividad de las células NK, ni la ADCC. Anapsos, al igual que los esteroides es capaz de frenar, al menos inicialmente, la producción y/o liberación de IL-1 β ; pero a diferencia de los esteroides y la ciclosporina, es capaz de estimular la producción de IL-2 y la proliferación linfocitaria, o lo que es lo mismo, de ejercer un efecto opuesto e independiente sobre dicha citocina y la IL-1 β . Al contrario que los esteroides y otras drogas con actividad sobre el Sistema Inmune (Ciclofosfamida, Azatioprina, Ciclosporina), Anapsos no actúa disminuyendo, sino incrementando el porcentaje de linfocitos T (*in vitro*), tanto de CD4⁺, como sobre todo de células CD8⁺. Del mismo modo parece actuar sobre células con potencial actividad ADCC (CD16⁺), incrementando su porcentaje. La ciclosporina, por el contrario, parece centrar su acción exclusivamente sobre los linfocitos T CD4⁺.

En resumen, el efecto estimulante ejercido por Anapsos "in vivo" e "in vitro" sobre células del Sistema Inmune con expresión de antígenos de membrana característicos de linfocitos T (especialmente de la población CD8⁺) y de células Natural Killer, su efecto incrementador del índice supresor (296) y el efecto pleiotrópico ejercido sobre diferentes citocinas, confieren al producto una interesante capacidad inmunomoduladora.

Las diferencias que a priori parecen existir entre Anapsos y otras drogas inmunomoduladoras, así como la ausencia de toxicidad demostrada del producto a las dosis utilizadas en este estudio, abren enormemente el abanico de posibilidades terapéuticas del producto en ensayos clínicos.

Concluimos que su buena tolerancia clínica, la ausencia de efectos adversos demostrada en los diferentes ensayos clínicos y avalada por la ausencia de notificaciones de los mismos al Sistema Nacional de Farmacovigilancia durante los últimos 15 años, y los hallazgos descritos en este trabajo de investigación, confieren al producto un potencial interesante para evaluar su efecto en determinadas enfermedades autoinmunes sistémicas, o infecciosas, especialmente víricas, en las que exista un exceso de producción de citocinas inflamatorias o un desbalance TH1/TH2, que pueda estar jugando un papel importante en su patogenia, y sobre todo teniendo en cuenta que el tratamiento de dicha alteración inmune con determinados fármacos, se traduce en muchos casos en una mejoría clínica de la enfermedad.

Por tanto, los resultados del presente estudio, constituyen una puerta abierta para futuras investigaciones "in vitro" y a ser posible "in vivo", que permitan establecer de un modo definitivo el mecanismo o mecanismos de acción del producto sobre el sistema inmune.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

VI.- CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

- 1.- Anapsos ejerce un efecto pleiotrópico "in vitro", para diferentes citocinas.
- 2.- Anapsos ejerce un efecto inhibitorio sobre los monocitos, principales células secretoras de IL-1 β y TNF- α .
- 3.- El efecto inhibidor ejercido por Anapsos sobre citocinas de la inflamación como la IL-1 β o el TNF- α , justifica su actividad colagenopoyética sobre aquellos tejidos afectados por procesos patológicos, como el psoriasis o la dermatitis atópica.
- 4.- Anapsos ejerce un efecto estimulante sobre diversos clones de linfocitos T, principalmente TH1 o TH0, incrementando la producción de las citocinas IL-2, INF- γ e IL-10.
- 5.- Anapsos ejerce un efecto estimulante sobre la proliferación y activación de linfocitos T CD4+.
- 6.- Anapsos ejerce un efecto estimulante sobre la proliferación y activación de las poblaciones celulares CD8+ y CD16+ (linfocitos T y células NK).

- 7.- El efecto de estimulación ejercido por Anapsos sobre citocinas TH1-like como el IL-2 o el INF- γ , junto con su efecto estimulante de la proliferación y activación de linfocitos T y células NK, indica una acción predominante del producto sobre la inmunidad celular.

- 8.- El incremento de IL-10 observado con Anapsos, resulta interesante por su efecto coestimulador con otras citocinas (IL-2), como por su conocido efecto inhibitorio sobre las citocinas inflamatorias.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

VII.- BIBLIOGRAFIA

VII. BIBIOGRAFIA

- 1.- **Stites DP, and Terr AI.** Cells of the immune response: lymphocytes and mononuclear phagocytes. Chap 5, pp61-72, en: Basic and clinical immunology, 7^a ed. Appleton and Lange (Editores). Lange Medical publications, 1991.
- 2.- **Allison JP, and Lanier LL.** Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. Annu Rev Immunol 1987;5: 503-507.
- 3.- **Kishimoto T, and Hirano T.** Molecular regulation of B lymphocyte response. Annu Rev Immunol 1988;6: 485-487.
- 4.- **Clevers H.** The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. Annu Rev Immunol 1988;6: 629-633.
- 5.- **Trinchieri G.** Biology of natural Killer cells. Adv Immunol 1989;47: 187-323.
- 6.- **Johnston RB Jr.** Current concepts in immunology: Monocytes and macrophages. N Engl J Med 1988;318: 747-752.
- 7.- **Roska AK, and Lipsky PE.** Monocytes and macrophages. Chap 20, pp346-366, en: Textbook of Rheumatology, 3^a ed. Kelley WN et al (editores). Saunders, 1989.
- 8.- **Unanue ER, and Allen PM.** The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. Science 1987; 236: 551-556.
- 9.- **Goetzl EJ, and Goldstein IM.** Granulocytes. Chap 19, pp 322-345, en: Textbook of Rheumatology, 3rd. ed. Kelley WN et al (editores). Saunders, 1989.
- 10.- **Lehrer RI.** Neutrophils and host defense. Ann intern Med 1988;109: 127-129.
- 11.- **Gleich GJ.** Current understanding of eosinophil function. Hosp Pract 1988;23: 137-140.
- 12.- **Gleich GJ, and Adolphson CR.** The Eosinophil leukocyte: Structure and function. Adv Immunol 1986;39: 177-185.
- 13.- **Serafin WE, and Austen KF.** Mediators of immediate hypersensitivity reactions. N Engl J Med 1987;317: 31-35.
- 14.- **Stevens RL, and Austen KF.** Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. Immunol Today 1989;10: 381-386.

- 15.- Yoshikai A.** Organization and sequences of the variable, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor α chain. *Nature* 1985;316: 837-840.
- 16.- Toyonaga B.** Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor β chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 8624-8630.
- 17.- Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman JG, Ip, S, Rosen F, and Krangel MS.** Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 1986;322: 145-149.
- 18.- Bank I, DePinho RA, Brenner MB, Cassimeris J, Alt, FW, and Chess, LA.** Functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 1986;322: 179-181.
- 19.- Cantrell DA, Davies AA, and Crumpton MJ.** Activators of protein Kinase C down-regulate and phosphorylate the T3/T-cell antigen receptor complex of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 8185-8190.
- 20.- Doyle C, and Strominger JL.** Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1985;330: 256-259.
- 21.- Norment A, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, and Littman DR.** Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 1988;336: 79-81.
- 22.- Blue ML, Craig KA, Anderson P, Branton KR, and Schlossman SF.** Evidence for specific association between class I major histocompatibility antigens and the CD8 molecules of human suppressor/cytotoxic cells. *Cell* 1988;54: 413-421.
- 23.- Bushkin Y, Demaria S, Le J, and Schwab R.** Physical association between the CD8 and HLA class I molecules on the surface of activated human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 3985-3989.
- 24.- Rivas A, Takada S, Koide J, Sonderstrup-Mcdevitt G, and Engleman E.** CD4 molecules are associated with the antigen receptor complex on activated but not resting T cells. *J Immunol* 1988;140: 2912-2928.
- 25.- Acres RB, Conlon PJ, Mochizuki DY, and Gallis B.** Phosphorylation of the CD8 antigen on cytotoxic human T cells in response to phorbol myristate acetate or antigen presenting B cells. *J Immunol* 1987;139: 2268-2274.
- 26.- Blue ML, Hafler DA, Craig K, Levine H, and Schlossman SF.** Phosphorylation of CD4 and CD8 molecules following T cell triggering. *J Immunol* 1987;139: 3949-3954.

- 27.- **Miyajima A.** Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T cell-derived lymphokines. *FASEB* 1988;2: 2642-2645.
- 28.- **White RAH, Mason DW, Williams AF, Galfre G, and Milstein C.** T-lymphocyte heterogeneity in the rat: Separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1978;148: 664-673.
- 29.- **Rheinherz EL, Kung PC, Goldstein G, and Schlossman SF.** Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76: 4061-4065.
- 30.- **Ledbetter JA, Evans RL, Lipinsky M, Cunningham-Rundles C, and Herzenberg LA.** Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med* 1981;153: 310-323.
- 31.- **Swain S.** T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 1983;74: 129-142.
- 32.- **Knapp W, Dorken B, Rieber EP, Stein H, Gilks WR, Schmidt RE, and von dem Borne, AERG (ed.).** Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens, Oxford University Press, Oxford 1989: 139-350.
- 33.- **Hayakawa K, and Hardy R.R.** Normal, autoimmune and malignant CD5+ B cells: the Ly-1 B lineage. *Annu Rev. Immunol.* 1988;6: 197-218.
- 34.- **Knapp W, Dorken B, Rieber EP, Stein H, Gilks WR, Schmidt RE, and von dem Borne, AERG (ed.).** Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens, Oxford University Press, Oxford 1989: 34-188.
- 35.- **Knapp W, Dorken B, Rieber EP, Stein H, Gilks WR, Schmidt RE, and von dem Borne, AERG (ed.).** Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens, Oxford University Press, Oxford 1989: 270-714.
- 36.- **Knapp W, Dorken B, Rieber EP, Stein H, Gilks WR, Schmidt RE, and von dem Borne, AERG (ed.).** Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens, Oxford University Press, Oxford 1989: 566-818.
- 37.- **Knapp W, Dorken B, Rieber EP, Stein H, Gilks WR, Schmidt RE, and von dem Borne, AERG (ed.).** Leucocyte typing IV. White cell differentiation antigens, Oxford University Press, Oxford 1989: 86-634.
- 38.- **Paul WE.** The immune system. The major histocompatibility complex. T-cell derived lymphokines. Macrophage-derived mediators. Chap 1st, pp.3-20; Chap 16-18, pp.445-570; Chap 21st, pp.621-638; Chap 22nd, pp.639-662, en: *Fundamental Immunology* (second edition). Paul WE (Ed) New York. Raven press, 1989.

- 39.- **Dinarello Ca, and Mier JW.** Lymphokines. *N Engl J Med* 1987;317: 940-945.
- 40.- **Whicher JT, and Evans SW.** Cytokines in disease. *Clin Chem* 1990;36: 1269-1281.
- 41.- **Old LJ.** Tumor Necrosis Factor. *Science* 1985;230: 630-632.
- 42.- **Dinarello CA, Cannon JG, Wolf SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladine MA, and O'Connor JV.** Tumor Necrosis Factor is an endogenous pyrogen and induces production of Interleukin 1. *J Exp Med* 1986;163: 1433-1450.
- 43.- **Le J, and Vilcek J.** Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987;56: 234-239.
- 44.- **LoMedico PT, Gubler U, Hellmann CP, Dukowich M, Giri JG, Pan, YCE, Collier K, Semonow R, Chua AO, and Mizel SB.** Cloning and expression of murine interleukin-1 precursor cDNA; *Escherichia coli*. *Nature* 1984;312:458-462.
- 45.- **Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM and Dinarello CA.** Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81: 7907-7911.
- 46.- **Webb AC, Collins KL, Auron PE, Eddy RL, Nakay J, Byers MG, Haley LL, Henry WM, and Shows TB.** Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res.* 1986;5: 77-83.
- 47.- **Brody DT, and Durum SK.** A plasma membrane anchoring mechanism for IL1, en: *Monokines and Other Nonlymphocytic Cytokines*, ed. JJ Oppenheim, Kluger and M Powanda. Alan R Liss, New York 1988.
- 48.- **Koyabashi Y, Appella E, Yamada M, Copeland T, Oppenheim JJ, and Matsushima K.** Phosphorylation of intracellular precursors of human IL1. *J. Immunol* 1988;140: 2279-2285.
- 49.- **Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, and Unanue ER.** Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 1204-1208.
- 50.- **Durum SK, Schmidt JA, and Oppenheim JJ.** Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol* 1986;3: 263-287.
- 51.- **Gery I, Gershon RK, and Waksman BH.** Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med* 1972;136: 128-138.

- 52.- Luger TA, Stadler BM, Matieson TJ, Mage M, and Oppenheim JJ.** Biological and biochemical similarities of murine epidermal cell derived thymocyte activating factor and interleukin 1. *J Immunol* 1982;128: 2147-2150.
- 53.-Kupper TS, Ballard DW, Chua AP, McGuire JS, Flood PM, Horowitz MC, Langdon R, Lightfoot L, and Gubler U.** Human Keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1-alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activation factor is identical to interleukin 1. *J Exp Med* 1986;164: 2095-2101.
- 54.-De Giovine F, Malawista SE, Nuki G, and Duff GW.** Interleukin 1 as a mediator of crystal arthritis. *J Immunol* 1987;138: 3213-3217.
- 55.- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladine MA, and O'Connor Jv.** Tumor Necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986;163: 1433-1439.
- 56.- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, and Sporn MB.** Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 5788-5792.
- 57.-Mannel DN, Mizel SB, Diamanstein T and Falk W.** Induction of interleukin 2 responsiveness in thymocytes by synergistic action of interleukin 1 and interleukin 2. *J Immunol* 1985;134: 3108-3113.
- 58.- Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, and Libby P.** Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 1987;138: 2124-2131.
- 59.- Brody DT, Romero RJ, and Durum SK.** IL1 in normal human amniotic fluid. *Lymphokine Res* 1987; 6:abstract # 1217.
- 60.- Kimball ES, Pickeral SF, Oppenheim JJ, and Rossio JL.** Interleukin 1 activity in normal human urine. *J Immunol* 1984;133: 256-260.
- 61.- Gahring LC, Buckley A, and Daynes RA.** Presence of epidermal-derived thymocyte activating factor/interleukin 1 in normal human stratum corneum. *J Clin Invest* 1985;76: 1585-1588.
- 62.- Giulian D, Baker TJ, Young DG, Shih L, Brown DC, and Lachman LB.** Interleukin 1 as a mediator of brain cell growth, p.133. en: *Physiologic, Metabolic and Immunologic Actions of Interleukin 1*. MJ Kluger JJ, Oppenheim and MC Powands (Ed.). Alan R. Liss. New York 1985.

- 63.- Farrar WL, Jill JM, Harel-bellan A, and Vinocour M.** The immune logical brain. *Immunol Rev* 1987;100: 325-332.
- 64.- Dinarello CA.** Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 1988;2: 108-112.
- 65.- Greebaum LA, Horowitz JB, Woods A, Pasqualini T, Reich EP, and Bottomly K.** Autocrine growth of CD4+ T cells: Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *J Immunol* 1988;140: 1555-1559.
- 66.- Gillis S, and Mizel SB.** T cell lymphoma model for the analysis of interleukin 1-mediated T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78: 1133-1137.
- 67.- Giri JG, Kincade PW, and Mizel SB.** Interleukin 1-mediated induction of kappa-light chain synthesis and surface immunoglobulin expression on pre-B cells. *J Immunol* 1984;132: 223-226.
- 68.- Hoffman MK, Gilbert KM, Hirst JA, and Scheid M.** An essential role for interleukin 1 and a dual function for interleukin 2 in the immune response of murine B lymphocytes to sheep erythrocytes. *J Moll Cell Immunol* 1987;3: 29-34.
- 69.- Scala G, and Oppenheim JJ.** Antigen presentation by human monocytes: Evidence for stimulant processing and requirement for interleukin 1. *J Immunol* 1985;134: 1676-1680.
- 70.- De Freitas EC, Chesnut RW, Grey HM, and Chiller JM.** Macrophage-dependent activation of antigen-specific T cells requires antigen and a soluble monokyne. *J Immunol* 1983;131: 23-27.
- 71.- Hauptmann B, Van-Damme J, and Dayer JM.** Modulation of IL-1-inflammatory and immunomodulatory properties by IL-6. *Eur Cytokine Netw* 1991;2(1): 39-46.
- 72.- Dinarello CA, and Mier JW.** Lymphokynes. *N Engl J Med* 1987;317: 940-945.
- 73.- Mantovani A, and Dejana E.** Cytokines as communication signals between leucocytes and endothelial cells. *Immunol Today* 1989;10: 370-375.
- 74.- Braquet P, and Rola-Pleszynsky M.** Platelet-activating factor and cellular immune responses. *Immunol Today* 1977;8: 345-352.
- 75.- Dinarello CA.** The biology of interleukyn 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol Lett* 1987;16: 227-232.
- 76.- Elmslie RE, Dow SW, and Ogilvie GK.** Interleukins: biological properties and therapeutic potential. *J Vet Intern Med* 1991;5(5): 283-293.

- 77.- **Hofman FM.** Cytokines in central nervous system disease, pp 65-71, en: Neuroimmune networks: Physiology and diseases. Goetzl EJ, Spector NH (Eds.). Alan R Liss, New York 1989.
- 78.- **Takao T, Tracey DE, Mitchell WM, and De Souza EB.** Interleulin-1 receptors in mouse brain: Characterization and neuronal localization. *Endocrinology* 1990;127: 283-300.
- 79.- **Hori T, Nakashima T, Take S, Kaizuka Y, Mori T, and Katafuchi T.** Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. *Brain Res Bull* 1991;27: 309-313.
- 80.- **Obal F, Opp M, Cady AB, Johannsen L, Postlethwaite AE, Poppleton HM, Seyer JM, and Krueger JM.** Interleukin-1 alpha and an Interleukin 1 β fragment are somnogenic. *Amer J Physiol* 1990;28: R439-R446.
- 81.- **Plata-Salaman CR.** Food intake supression by immunomodulators. *Neurosci Res Commun* 1988;44: 216-218.
- 82.- **Plata-Salaman CR, Oomura Y, and Kai Y.** Tumor necrosis factor and Interleukin-1 β : supression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res* 1988;44. 106-114.
- 83.- **Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, and Vale W.** Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 1987;238: 522-526.
- 84.- **Suda T, Tozawa F, Ushiyama T, Sumimoto T, Yamada M, and Demura H.** Interleukin-1 stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in rat hypothalamus. *Endocrinology* 1990;126: 1223-1228.
- 85.- **Gwosdow AR, Kumar MSA, and Bode HH.** Interleukin 1 stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Amer J Physiol* 1990;21: E65-E70.
- 86.- **Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, and Fein HG.** Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 1987;232: 517-521.
- 87.- **Cacabelos R.** Neuroimmune function in mental disorders. *Ann Psiquiat* 1991;2: 135-154.
- 88.- **Piquet-Pellorce C, Homo-Delarche F, and Dy M.** Interleukin-1 and/or tumor necrosis factor alpha synergize with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to enhance histamine synthesis in hematopoietic cells: Role of prostaglandin E2. *Eur J Immunol* 1989;19: 1990-2003.

- 89.- Philip R, and Epstein LB.** Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma interferon and interleukin 1. *Nature* 1986;323: 86-89.
- 90.- Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, and Dinarello CA.** Human recombinant interleukyn-1 stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells. *J Clin Invest* 1986;77: 645-648.
- 91.- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, and Springer TA.** Induction by IL1 and interferon gamma: Tissue distribution, biochemistry, and a function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986;137: 245-249.
- 92.- Dayer JM, Bréard J, Chess L, and Krane SM.** Participation of monocyte-macrophages and lymphocytes in the production of a factor that stimulates collagenase and prostaglandin release by rheumatoid synovial cells. *J Clin Invest* 1979;64: 1386-1390.
- 93.- Andus T, Geiger T, Hirano T, Kishimoto T, and Heinrich PC.** Action of recombinant human interleukin-6, interleukin-1B and tumor necrosis factor alfa on the mRNA induction of acute-phase proteins. *Eur J Immunol* 1988;18: 739-743.
- 94.- Meuleman J, and Katz P.** The immunologic effects, kinetics and use of glucocorticosteroids. *Med Clin N Am* 1985;69: 805-810.
- 95.- Seckinger P, and Dayer JM.** Interleukyn-1 inhibitors. *Ann Pasteur Inst* 1987;138: 486-491.
- 96.- Lew W, Oppenheim JJ, and Matsushima K.** Analysis of the supression of IL-1 alpha and IL-1 beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. *J Immunol* 1988;140: 1895-1898.
- 97.- Kern JA, Lamb RJ, Reed JC, Daniele RP, and Nowell PC.** Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. *J Clin Invest* 1988;81: 237-239.
- 98.- Knudsen PJ, Dinarello CA, and Strom TB.** Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol* 1986;137: 3189-3192.
- 99.- Tate G, Mandell B, and Kerolus G.** Supression of experimental acute and chronic inflammation by diets enriched in gamma-linolenic acid. *Arthritis Rheum* 1987;30: 566-571.
- 100.- Howard M, O'Garra A, Ishida H, De Waal Malefyt R, and De Vries J.** Biological properties of IL-10. *J Clin Immunol* 1992;12(4): 239-247.

- 101.- **Kehrl J, Wakefield L, Roberts A, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn M, and Fauci A.** Production of TGF- β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986;163: 1037-1041.
- 102.- **Arend W, Joslin FG, and Massoni RJ.** Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *J Immunol* 1985;134: 3868-3872.
- 103.- **Sims JE, March CJ, Cosman D, Widemer MB, Mc Donald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, Friend D, Alpert AR, Billis S, Urdal DL, and Dower SK.** cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 1988;241: 585-589.
- 104.- **Lowenthal JW, and McDonald HR.** Binding and internalization of interleukin 1 by T cells. *J Exp Med* 1986;164: 1060-1074.
- 105.- **Dower SK, Kronheim SR, March CJ, Conlon PJ, Hopp TP, Gillis S, and Urdal DL.** Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med* 1985;162: 501-515.
- 106.- **Rosoff PM, Savage N, and Dinarello CA.** Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* 1988;54: 73-81.
- 107.- **Scheurich P, Ucer U, Wrann M, and Pfizenmaier K.** Early events during primary activation of T cells: Antigen receptor cross-linking and interleukin 1 initiate proliferative response of human T cells. *Eur J Immunol* 1985;15: 1091-1095.
- 108.- **Manger B, Weiss A, Imboden J, Laing T, and Stobo J.** The role of protein kinase C in transmembrane signaling by the T cell receptor complex: Effects of stimulation with soluble or immobilized T3 antibodies. *J Immunol* 1987;139: 395-407.
- 109.- **Nedwin GW, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarret-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, and Gray PW.** Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: Structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985;13: 6361-6366.
- 110.- **Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, and Strominger JL.** Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 8699-8703.
- 111.- **Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, and Cerami A.** Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232: 977-980.

- 112.- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, and Cerami A.** Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 1670-1674.
- 113.- Jones EY, Stuart DI, and Walker N.** Structure of tumor necrosis factor. *Nature (London)* 1989;338: 225-228.
- 114.- Paul NL, and Ruddle NH.** Lymphotoxin. *Ann Rev Immunol* 1988;6: 407-413.
- 115.- Decker T, Lohmann-Matthes ML, and Gifford GE.** Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* 1987;138: 957-960.
- 116.- Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LJ, Gamble JR, Agosti JM, and Waltersdorff AM.** Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986;36: 4220-4224.
- 117.- Sung S-SJ, Jung LKL, Walters JA, Chen W, Wang CY, and Fu SM.** Production of tumor necrosis factor/cachectin by human B cells clones and tonsillar B cells. *J Exp Med* 1988;168: 1539-1551.
- 118.- Steffen M, Ottman OG, and Moore MAS.** Simultaneous production of tumor necrosis factor- α and lymphotoxin by normal T cells after induction with IL-2 and anti-T3. *J Immunol* 1988;140: 2621-2624.
- 119.- Paya CV, Kenmotsu N, Schoon RA, and Leibson PJ.** Tumor necrosis factor and lymphotoxin secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J Immunol* 1988;141: 1989-1995.
- 120.- Rubin BY, Anderson SL, Sullivan SA, Williamson BD, Carswell EA, and Old LJ.** Nonhemopoietic selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986;164: 1350-1359.
- 121.- Beutler B, and Cerami A.** Cachectin, more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987;316: 379-385.
- 122.- Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, and Baines MG.** Expression of tumor necrosis factor alpha in the developing nervous system. *Intern J Neuroscience* 1991;60: 129-136.
- 123.- Jadus MR, Schmunk G, Djeu JY, and Parkman R.** Morphology and lytic mechanisms of interleukin-3 dependent natural cytotoxic cells: tumor necrosis factor as a possible mediator. *J Immunol* 1986;137: 2774-2778.

- 124.- **Cannistra SA, Rambaldi A, Spriggs DR, Herrmann F, Kufe S, and Griffin JD.** Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U937 cell line and by normal human monocytes, *J Clin Invest* 1987;79: 1720-1725.
- 125.- **Waage A, and Bakke O.** Glucocorticoids suppress the production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology* 1988;63: 299-302.
- 126.- **Beutler B, Tkacenko V, Milsark I, Krochin N, and Cerami A.** Effect of γ -interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. Reversal of the LPS (endotoxin resistance) phenotype. *J Exp Med* 1986;166: 786-791.
- 127.- **Gifford GE, and Lohmann-Matthes ML.** Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J Natl Cancer Inst* 1987;78: 121-124.
- 128.- **Henter J.I, Soder O, and Andersson U.** Identification of individual tumor necrosis factor/cachectin-producing cells after lipopolysaccharide induction. *Eur J Immunol* 1988;18: 983-988.
- 129.- **Hotez PJ, LeTrang N, Fairlamb AH, and Cerami A.** Lipoprotein lipase suppression in 3T3 Li cells by a hematoprotzoan induced mediator from peritoneal exudate cells. *Parasite Immunol* 1984;6: 203-209.
- 130.- **Wong GHW, and Goeddel DV.** Tumor necrosis factors α and β inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* 1986;323: 819-822.
- 131.- **Izumi S, Hirai O, and Hayashi Y.** Induction of a tumor necrosis factor-like activity by *Nocardia Rubra* cell wall skeleton. *Cancer Res* 1987;47: 1785-1792.
- 132.- **Piguet PF, Grau GE, Allet B, and Vassali P.** Tumor necrosis factor/cachectin in an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs-host disease. *J Exp Med* 1987;166: 1280-1289.
- 133.- **Maury CPJ, and Tepp AM.** Raised serum levels of cachectin/tumor necrosis factor α in renal allograft rejection. *J Exp Med* 1987;166: 1132-1137.
- 134.- **Tsujimoto M, Yip YK, and Vilcek J.** Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 7626-7630.
- 135.- **Kajikawa T, Inagawa, and Shimada Y.** Endogenous production of cytotoxic factor in mice induced by a combination of interferon- γ and heterologous fibrinogen. *J Biol Response Mod* 1987;6: 205-214.

- 136.- Satoh M, Oshima H, Abe S, Yamazaky M, and Mizuho D.** Role of in vivo scavenger function of macrophages in priming for endogenous production of tumor necrosis factor. *J Biol Response Mod* 1987;6: 499-511.
- 137.- Cuturi MC, Murphy M, Costagiomi MP, Weinmann R, Perussia B, and Trinchieri G.** Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987;165: 1581-1594.
- 138.- Hession C, Decker JM, and Sherbolon AP.** Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines. *Science* 1987;237: 1479-1485.
- 139.- Leist TP, Frei L, Kam-Hansen S, Zinkernagel RM, and Fontana A.** Tumor necrosis factor α in cerebrospinal fluid during bacterial but not viral meningitis. Evaluation in murine model infections and in patients. *J Exp Med* 1988;167: 1743-1748.
- 140.- Waage A, Halstensen A, and Espevik T.** Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987;1: 355-357.
- 141.- Ranges GE, Zlotnik A, and Espevik T.** Tumor necrosis factor α is a growth factor for thymocyte. *J Exp Med* 1988;167: 1472-1478.
- 142.- Scheurich P, Thoma B, Ucer U, and Pfizenmaier K.** Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF-alpha): Induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987;138: 1786-1790.
- 143.- Yokota S, Geppert TD, and Lipsky PE.** Enhancement of antigen and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1988;140: 531-534.
- 144.- Kehrl JH, Miller A, and Fauci AS.** Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen-activated human B cells. *J Exp Med* 1987;166: 781-785.
- 145.- Zola H, and Nikoloutsopoulos A.** Effect of recombinant human tumor necrosis factor beta on activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes. *Immunology* 1989;67: 231-236.
- 146.- Gambles JR, Harlan JN, Klebanoff SJ, and Vadas MA.** Stimulation of adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 8667-8671.
- 147.- Shalaby MR, Aggarwall BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, and Palladino MA.** Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon γ and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1985;135: 2069-2073.

- 148.- Ming WJ, Bersani L, and Mantovani A.** Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987;138: 1469-1474.
- 149.- Chen L, Suzuki Y, and Wheelock EF.** Interferon- γ synergizes with tumor necrosis factor and interleukin-1 and requires the presence of both monokines to induce antitumor cytotoxic activity in macrophages. *J Immunol* 1987;139: 4096-4101.
- 150.- Ostensen ME, Thiele DL, and Lipsky PE.** Tumor necrosis factor α enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J Immunol* 1987;138: 4185-4190.
- 151.- Alonso JL.** La compleja fisiología del factor de necrosis tumoral. *Immunología* 1989;8(3): 73-95.
- 152.- Pelus LM, Ottman OG, and Nocka KH.** Synergistic inhibition of human marrow granulocyte-macrophage progenitor cells by prostaglandin E and recombinant interferon- α , β and γ and an effect mediated by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1988;140: 840-844.
- 153.- Piacibello W, Sansavio F, and Severino A.** Opposite effects of TNF- α on G-CSF and GM-CSF-dependent growth of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Cancer res* 1990;50: 5065-5071.
- 154.- Le J, and Vilcek J.** Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987;56: 234-239.
- 155.- Dayer JM, Beutler B, and Cerami A.** Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985;162: 2163-2168.
- 156.- Solis-Herruzo J, Brenner DA, and Choukier M.** Tumor necrosis factor- α inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1988;263: 5841-5845.
- 157.- Watanabe N, Niitsu Y, and Umeno H.** Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. *Cancer Res* 1988;48: 2179-2183.
- 158.- Saton N, and Goto T.** Effect of tumor necrosis factor on angiogenesis. *Immunobiol* 1987;175: 15-18.
- 159.- Tracey KJ, Lowry SF, and Fahey T.** Cachectin tumour necrosis factor induces lethal septic shock and stress hormone responses in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 1987;164: 415-422.
- 160.- Silverstein DS, and David JR.** Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 1055-1059.

- 161.- **Mortensen RF, Shapiro J, Lin BF, Douches S, and Neta R.** Interaction of recombinant IL-1 and recombinant tumor necrosis factor in the induction of mouse acute phase proteins. *J Immunol* 1988;140: 2260-2266.
- 162.- **Lee MD, Zentella A, Vine W, Pekala PH, and Cerami A.** Effect of endotoxin induced monokines on glucose metabolism in the muscle cells line L 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 2590-2594.
- 163.- **Nophar Y, Kemper O, and Brakebusch C.** Molecular cloning and expression of the human 55 Kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990;61: 351-359.
- 164.- **Lesslauer W, Tabuchi H, Gentz R, Brockhaus M, Schalaeger EJ, Grau G, Piguet PF, Pintaure P, Vassali P, and Loetscher H.** Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide-induced lethality. *Eur J Immunol* 1991;21: 2883-2886.
- 165.- **Suffys P, Beyaert T, Van Roy F, and Fiers W.** Reduced tumour necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149: 735-743.
- 166.- **Gautam SC, Chikkala NF, and Hamilton TA.** Anti-inflammatory action of IL-4. *J Immunol* 1992;148: 1411-1415.
- 167.- **De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennet B, Figdor C, and de Vries JE.** IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174: 1209-1220.
- 168.- **Tartagliata LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino-MA JR, and Goeddel DV.** The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 9292-9296.
- 169.- **Smith CA, Davis T, Anderson D, and Solam L, Beckman MP, Jerzy R, Dower SK, Cosman D, and Goodwing AG.** A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 1990;248: 1019-1022.
- 170.- **Robb RJ, and Smith KA.** Heterogeneity of human T-cell growth factor due to variable glycosylation. *Molec Immunol* 1981;18: 1087-1094.
- 171.- **Bazan JF.** Unraveling the structure of IL-2. *Science* 1992;257: 410-413.
- 172.- **Taniguchi T, Matsui H, Fujita, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, and Hamuro J.** Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 1983;302: 305-310.
- 173.- **Greene WC, Böhnlein E, and Ballard DW.** HIV-1, HTLV-1 and normal T-cell growth: transcriptional strategies and surprises. *Immunol Today* 1989;10: 272-278.

- 174.- Caligiuri MA, Zinuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, and Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. *J Exp Med* 1990;171: 1509-1526.
- 175.- Weiss A, Shields R, Newton M, Manger B, and Imboden J. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. *J Immunol* 1987;304: 445-447.
- 176.- Yang SY, Chouaib S, and Dupont B. A common pathway for T Lymphocyte activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 erythrocyte receptor determinants. *J Immunol* 1986;137: 1097-1100.
- 177.- Susuki R, Handa K, Itoh K, and Kumagi K. Natural Killer (NK) cells as responder to interleukin 2 (IL-2). *J Immunol* 1983;130: 981-992.
- 178.- Hatakeyama M, Doi T, Kono T, Maruyama M, Minamoto S, Mori H, Kobayashi M, Uchiyama T, and Taniguchi T. Transmembrane signaling of interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1987;166: 362-375.
- 179.- Hatakeyama M, Mori H, Doi T, and Taniguchi T. A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor β chain in essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell* 1989;59: 837-845.
- 180.- LeGrue SJ. Does interleukin 2 stimulus-response coupling result in generation of intracellular second messengers?. *Lymph Res* 1988;7: 187-200.
- 181.- Malek TR, Chan C, Glimcher LH, Germain RN, and Shevach EM. Influence of accessory cell and T cell surface antigens on mitogen-induced IL-2 receptor expression. *J Immunol* 1985;135: 1826-1833.
- 182.- Morgan DA, Ruscetti FW, and Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193: 1007-1008.
- 183.- Jelinek DF, and Lipsky PE. Regulation of human B lymphocyte activation and differentiation. *Adv Immunol* 1987;40: 837-845.
- 184.- Malkovsky M, Loveland B, North M, Asherson GL, Ward P, and Fiers W. Recombinant interleukin 2 directly augments cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 1987;325: 362-364.
- 185.- Mossman TR, and Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretions lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989;237: 145-173.
- 186.- Whicher JT, and Evans SW. Cytokines in disease. *Clin Chem* 1990;317: 940-945.

- 187.- **Bennet WM, and Norman DJ.** Action and toxicity of cyclosporine. *Annu Rev Med* 1986;37: 215-221.
- 188.- **Noelle R, and Snow C.** T helper Cells. *Curr Opin Immunol* 1992;4: 333-337.
- 189.- **Banchereau J, and Roussel F.** Human B lymphocytes: phenotype, proliferation and differentiation. *Adv Immunol* 1992;52: 125-251.
- 190.- **Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M, and Taniguchi T.** Interleukin 2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNA'S. *Science* 1989;244: 551-555.
- 191.- **Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Munakata H, Nakamura M, and Sugamura K.** Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992;257: 379-382.
- 192.- **Robb RJ, Rusk CM, and Neepser MP.** Structure function relationships for the interleukin 2 receptor: location of ligand and antibody binding sites on the Tac receptor chain by mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 5654-5658.
- 193.- **Sauve K, Nachman M, Spence C, Bailon P, Campbell E, Tsien W, Kondas JA, and Hakim JG.** Localization in human interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 4636-4640.
- 194.- **Collins L, Tsien WH, Seals C, Hakimi J, Weber D, Bailon P, Hoskings J, Greene WC, and Toome V.** Identification of specific residues of human interleukin 2 that affect binding to the 70-Kd subunit (p70) of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 7709-7713.
- 195.- **Gnarra JR, Otani H, Ge Wang M, McBride OW, Sharon M, and Leonard WJ.** Human interleukin 2 receptor β -chain gene: Chromosomal localization and identification of 5 regulatory sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 3440-3444.
- 196.- **Lowenthal JW, and Greene WC.** Contrasting interleukin 2 binding properties of the α (P55) and β (p70) protein subunits of the human affinity interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1987;166: 1156-1161.
- 197.- **Zoon KC.** Human interferons: structure and function interferon 9. Gresser Ed. Academic Press, 1987.
- 198.- **Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhusan TL, Trotta PP, and Bugg CE.** Three dimensional structure of recombinant human interferon γ . *Science* 1991;252: 698-702.

- 199.- Lefevre F.** le systeme interferon: structure, biologie, applications. *Ann Rech Vet* 1989;20: 17-19.
- 200.-Young HA, and Hardy KJ.** Interferon γ : producer cells, activation stimuli, and molecular genetic regulation. *Pharmac Ther* 1990;45: 137-151.
- 201.- Lamont AG, and Adorini L.** Interleukin-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today* 1996;17 (5): 214-217.
- 202.- Lefevre F, Martina-Botte F, Guillomot M, Zouari K, Charley B, and La Bonnardiere G.** Interferon-gamma gene and protein are spontaneously expressed by the porcine trophectoderm early in gestation. *Eur J Immunol* 1990;20: 2485-2490.
- 203.- Romagnani S.** Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991;12(8): 256-257.
- 204.- Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccini MP, Ruggi FS, De Carli M, Ricci M, and Romagnani S.** Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the invitro development of human TH1 and TH2 clones. *J Immunol* 1992;148: 2124-2147.
- 205.- De Maeyer E, and De Maeyer-Guignard J.** Interferon- γ . *Current Opinion in immunology* 1992;4: 321-326.
- 206.- De Maeyer E, and De Maeyer-Guignard J.** Interferons and other regulatory cytokines. *J Whiley Ed.* 1988.
- 207.- Lewis DB, and Wilson CB:** Gamma interferon: an immunoregulatory lymphokine with immunotherapeutic potential. *Pediatr Infect dis J* 1990;9 642-651.
- 208.- Dianzani F, Antonelli G, and Capobianchi MR.** Biological activity of gamma interferon. *Ann Ist Super Sanita* 1990;26: 255-262.
- 209.- Trinchieri G, and Perussia B.** Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 1985;6: 131-136.
- 210.- Rink L, Kruse A, Niklas W, Hoyer J, and Kirchner H.** Induction of cytokines in human peripheral blood and spleen cells by the mycoplasma arthritidis-derived superantigen. *Lymphok Cytok Res* 1992;11: 105-108.
- 211.-Morikawa K, Knbazawa H, Suzuki T, and Cooper MD.** Recombinant interferon α , β and γ enhance the proliferative response of human B cells. *J Immunol* 1987;139: 761-764.

- 212.- **Murray HW**. Gamma interferon, cytokine-induced macrophage activation and antimicrobial host defense in vitro, in animal models and in humans. *Diagn Microbiol infect Dis* 1990;13: 411-421.
- 213.- **Murray HW**. Interferon- γ therapy in AIDS for mononuclear phagocyte activation. *Biotherapy* 1990;2: 149-159.
- 214.- **Billiau A, and Dijkmans R**. Interferon- γ : mechanism of action and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 1990;40: 1433-1439.
- 215.- **Heremans H, Dijkmans R, Sobis H, Vandekerckhove F, and Bilkan A**. Regulation by interferons of the local inflammatory response to bacterial lipopolysaccharide, *J Immunol* 1987;138: 4175-4179.
- 216.- **Sher A, Fiorentino D, Caspar P, Pearce E, and Mosmann T**. Production of IL-10 by CD4 T lymphocytes correlates with down-regulation of TH1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol* 1992;147: 2713-2716.
- 217.- **Fertsch D, Schoenberg DR, Germain RN, Tore JYL, and Vogel SN**. Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN-gamma and down regulation by IFN alpha/beta and dexamethasone are mediated by changes in steady state levels of Ia mRNA. *J Immunol* 1987;139: 244-248.
- 218.- **Bazan JF**. Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell* 1990;61: 753-754.
- 219.- **Aguet M**. The interferon-gamma receptor: a comparison with other cytokine receptors. *J Interferon Res* 1990;10: 551-558.
- 220.- **Aguet M, Dembic Z, and Merlin G**. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* 1988;55: 273-280.
- 221.- **Tepper RI, Burstein HJ, Leder P, and Abbas AK**. Immunologic effects of interleukin-4 in vivo: studies with transgenic mice, pp.205-220. En: *IL-4; structure and function*, Spits (Ed.). London: CRC press, 1992.
- 222.- **Powers R, Garret DS, March CJ, Frieden EA, Gronenborn AM, and Clore GM**. Three-dimensional solution structure of human interleukin-4 by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 1992;256: 1673-1677.
- 223.- **Kruse N, Tony HP, and Sebald W**. Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement. *EMBO J* 1992;11: 3273-3274.
- 224.- **Piccini MP, Macchia D, and Parronchi P**. Human bone marrow non-B non-T cells, produce interleukin-4 in response to cross-linkage of FcE and FcG receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 8656-8660.

- 225.- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin R, and Bloom BR.** Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254: 279-282.
- 226.- Peltz G.** A role of CD4+ T-cell subsets producing a selective pattern of lymphokines in the pathogenesis of human chronic inflammatory and allergic diseases. *Immunol Rev* 1991;123: 23-35.
- 227.- Paul WE.** Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77: 1859-1870.
- 228.- Spits H.** IL-4: structure and function, pp.276-279. London CRC press, 1992.
- 229.- Chatelain R, Varkila K, and Coffman RL.** IL-4 induces a TH2 response in *Leishmania major* infected mice. *J Immunol* 1992;148: 1182-1187.
- 230.- Golumbek PT, Lazenby AJ, and Levitsky HI.** Tumors engineered to secrete Interleukin-4 generate antigen-specific T cell-mediated immunity. *Science* 1991;254: 713-716.
- 231.- Defrance T, Fluckiger AC, and Rossi JF.** Anti-proliferative effects of IL-4 on freshly isolated non Hodgkin malignant B lymphoma cells. *Blood* 1992;79: 990-996.
- 232.- De Vries JE, Gauchat JF, and Aversa GG.** Regulation of IgE synthesis by cytokines. *Curr Opin Immunol* 1991;3: 851-858.
- 233.- Finkelman FD, Holmes J, Katona JM, Urban-JF JR, Beckman MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mossman TR, and Paul WE.** Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990;8: 303-333.
- 234.- Tepper RI, Coffman RL, and Leder P.** An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992;257: 548-551.
- 235.- Kühn R, Rajewsky K, and Muller W.** Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991;254: 707-710.
- 236.- Vannier E, Miller LC, and Dinarello CA.** Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin-4 suppresses interleukin-1 production by up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89: 4076-4080.
- 237.- Miossec P, Briolay J, and Dechanett J.** Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid synovitis. *Arthritis and Rheum* 1992;35: 874-883.

- 238.- Miyajima A, Kitamura T, and Harada N. Cytokine receptors and signal transduction. *Ann Rev Immunol* 1992;10: 295-331.
- 239.- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, and Mossman TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. *Science* 1990;248: 1230-1234.
- 240.- Suda T, O'Garra A, MacNeil I, Fisher M, Bond M, and Zlotnik A. Identification of a novel thymocyte growth promoting factor derived from B cell lymphomas. *Cell Immunol* 1990;129: 228-240.
- 241.- Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mossman TR, Moore KW, and Rennick D. Interleukin-10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 1991;173: 507-510.
- 242.- Vieira P, De Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastgelein R, Fiorentino DF, DeVries JE, Roncarolo MG, Mossman TR, and Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88: 1172-1176.
- 243.- Fiorentino DF, Bond MW, and Mossman TR. Two types of mouse helper T cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989;170: 2081-2095.
- 244.- O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, Barbis D, Stall A, Cupp J, Moore K, Viera P, Mossman T, Whitemore A, Arnold L, Haughton G, and Howard M. Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin-10. *Int Immunol* 1990;2: 821-832.
- 245.- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mossman TR, Howard M, and O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147: 3815-3822.
- 246.- Kipps TJ. The CD5 B cell. *Adv Immunol* 1989;47: 117-185.
- 247.- Fiorentino DF, Zlotnik A, Viera P, Mossman TR, Howard M, Moore KW, and O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by TH1 cells. *J Immunol* 1991;146: 3444-3451.
- 248.- De Waal Malefyt R, Haanen J, Issel H, Roncarolo MG, Tevelde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Spits H, and De Vries JE. IL-10 and v-IL-10 strongly reduce antigen specific human T cell responses by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II MHC expression. *J Exp Med* 1991;174: 915-924.

- 249.- Hsu DH, Moore KW, and Spits H.** Differential effects of interleukin-4 and interleukin-10 on interleukin-2-induced interferon-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol* 1992;4: 563-569.
- 250.- Taga K, and Tosato G.** IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992;148: 1143-1148.
- 251.- Ho AS, and Moore KW.** Interleukin-10 and its receptor. *Ther Immunol* 1994;1 (3): 173-185.
- 252.- Go NF, Castle BE, Barret R, Kastelein R, Dang W, Mossman TR, Moore KW, and Howard M.** Interleukin-10 (IL-10), a novel B cell stimulatory factor: Unresponsiveness of X-chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 1990;172: 1625-1631.
- 253.- Rousset F, García E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, and Bancherau J.** IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89: 1890-1893.
- 254.- Bancherau J, De Paoli P, Valle A, García E, and Rousset F.** Long-term human B cell lines dependent on IL-4 and antibody to CD40. *Science* 1991;251: 70-72.
- 255.- Mac Neil I, Suda T, Moore KW, Mossman TR, and Zlotnik A.** IL-10: a novel cytokine growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* 1990;145: 4167-4173.
- 256.- Chen WF, and Zlotnik A.** A novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1990;147: 528-534.
- 257.- Ishida H, Hastings R, Kearney J, and Howard M.** Continuous anti-IL-10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 1992;175: 1213-1220.
- 258.- Silva JS, Morrisey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, and Reed SG.** Interleukin 10 and interferon regulation of experimental trypanosoma cruzi infection. *J Exp Med* 1992;175: 169-174.
- 259.- Williams AF, and Barclay AN.** The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988;6: 381-405.
- 260.- Steinmetz M, Stephan D, and Lindahl KF.** Gene organization and recombinational hot spots in the murine major histocompatibility complex. *Cell* 1986;44: 895-898.

- 261.- **Cher DJ, and Mossman TR.** Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987;138: 3688-3694.
- 262.- **Brown JH, Jardetsky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, and Wiley DC.** A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988;332: 845-850.
- 263.- **Nathan CF.** Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987;79: 319-326.
- 264.- **Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, and Willey DC.** The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329: 512-518.
- 265.- **Paul WE, and Ohara J.** B-cell stimulatory-1/interleukin 4. *Annu Rev Immunol* 1987;5: 429-434.
- 266.- **Kishimoto T.** Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu Rev Immunol* 1985;3: 133-138.
- 267.- **Hirano T, Yusukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatu Y, Tsunasawa S, and Sakiyama F.** Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324: 73-76.
- 268.- **Defrance T, Vanbervliet B, Aubry JP, Takebe Y, Arai N, Miyajima A, Yokota T, Lee F, Arai K, De Vries JE, and Banchereau J.** B-cell growth-promoting activity of recombinant human interleukin 4. *J Immunol* 1987;139: 1135-1140.
- 269.- **Takatsu K, Tominaga A, Harada N, Mita S, Matsumoto M, Takahashi T, Kikuchi Y, and Yamaguchi N.** T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): Molecular and functional properties. *Immunol Rev* 1988;102: 108-112.
- 270.- **Takatsuki F, Okano nF, Suzuki C, Chieda R, Takahara Y, Hirano T, Kishimoto T, Hamuro J, and Akiyama Y.** Human recombinant interleukin 6/B cell stimulatory factor 2 (IL-6/BSF-2) augments murine antigen-specific antibody responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 1988;141: 3072-3076.
- 271.- **Singer A, and Hodes RJ.** Mechanisms of T cell-B cell interaction. *Ann Rev Immunol* 1983; 1: 211-215.
- 272.- **Ben-Yehuda O, Tomer Y, and Shoenfeld Y.** Advances in therapy of autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1988;17: 206-208.

- 273.- **Florez J, Armijo JA, y Mediavila A.** Farmacología humana, pp.809-823 y 921-971. Ed. Científica y Tecnicas SA. Salvat, 1992.
- 274.- **Behrens TW, and Goodwind JS.** Glucocorticoids, pp.604-621, en: Arthritis and allied conditions. Mc Carty DJ (Ed.). Leda and Fabiger, 1989.
- 275.- **Claman HN.** Glucocorticosteroids. I. Anti-inflammatory mechanisms.II. The clinical response. Hosp Pract 1983;18: 123-143.
- 276.- **Zweiman B.** Corticosteroid effects on circulating lymphocyte subset levels in normal humans. J Clin Immunol 1984;4: 151-155.
- 277.- **Schleimer RP, Claman HN, Oronsky A, eds..** Antiinflammatory steroid action: Basic and clinical aspects. Nueva York: Academic Press 1989.
- 278.- **Caldwell JR, and Furst DE.** The efficacy and safety of low-dose corticosteroids for rheumatoid arthritis. Sem Arth Rheum 1991;21: 1-11.
- 279.- **Baylink DJ.** Glucocorticoid-induced osteoporosis. N Eng J Med 1983;309: 306-308.
- 280.- **Christy NP.** Pituitary-adrenal function during corticosteroid therapy. Learning to live with uncertainty. N Eng J Med 1992;326: 266-267.
- 281.- **Black DJ, and Livingston RB.** Antineoplastic drugs in 1990: a review. Drugs 1990;39: 489-501 y 652-673.
- 282.- **Balis FM.** Pharmacokinetic drug interactions of commonly used anticancer drugs. Clin Pharmacokin 1986;11: 223-235.
- 283.- **Clements PJ, and Davis J.** Cytotoxic drugs: Their clinical application to the rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum 1986;15: 231-234.
- 284.- **Cupps TR, Edgar LC, and Fauci AS.** Suppression of human B lymphocytes function by cyclophosphamide. J Immunol 1982;128: 2453-2456.
- 285.- **Fraiser LH, Kanekal S, and Kehrler JP.** Cyclophosphamide toxicity: Characterising and avoiding the problem. Drugs 1991;42: 781-795.
- 286.- **Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendenin NJ, and Chabner BA.** The pharmacology and clinical use of methotrexate. N Eng J Med 1983;309: 1094-1104.
- 287.- **Shevach EM.** The effects of cyclosporin A on the immune system. Ann Rev Immunol 1985;3: 397-423.

- 288.- **Keown PA.** Emerging indications for the use of cyclosporin in organ transplantation and immunity. *Drugs* 1990;40: 315-325.
- 289.- **Pinsky CM.** Biological Response Modifiers. *Semin Oncol* 1986;13: 131-254.
- 290.- **Kosmas C, Kalafonos H, and Epenetos AP.** Monoclonal antibodies: future potential in cancer chemotherapy. *Drugs* 1989;38: 645-657.
- 291.- **Piñeiro Alvarez, B.** Dos años de experiencia personal en el tratamiento con anapsos del psoriasis, en diferentes formas clínicas (495 casos). *Antolog Dermatog* 1982;11: 45-51.
- 292.- **Jimenez D, Doblare E, Naranjo R, Muñoz C, and Vargas J.** Anapsos modifies immunological parameters and improves the clinical course in atopic dermatitis. *Dermatologica* 1986;173: 154-156.
- 293.- **Jiménez D, Naranjo R, Doblare E, Muñoz C, and Vargas J.F.** Anapsos an antipsoriatic drug, in atopic dermatitis. *Allergol Immunopathol* 1987;15: 185-189.
- 294.- **Horvath A, Alvarado F, Szöcs J, De Alvarado Zn, and Padilla G.** Metabolic effects of Calagualine, an antitumoral saponine of *Polypodium Leucotomos*. *Nature* 1967;214: 1256-1258.
- 295.- **Vargas J, García E, Gutiérrez F, y Osorio C.** Síntesis de ácidos nucleicos y niveles de AMP cíclico en tumores murinos después del tratamiento in vitro con anapsos. *Arch Fac Med Madrid* 1981;40: 39-46.
- 296.- **Vargas J, Muñoz C, Osorio C, and García-Olivares E.** Anapsos, an antipsoriatic drug which increases the proportion of suppressor cells in human peripheal blood. *Ann Immunol (Inst Pasteur)* 1983;134 C.: 393-400.
- 297.- **Mohammad A.** Vitiligo Repigmentation with Anapsos, *Polypodium Leucotomos*. *Int J Dermatol* 1989;28: 479.
- 298.- **Carreño MM, De Castro P.** Fenotipo inmunológico y tratamiento con *Polypodium leucotomos* en pacientes con esclerosis múltiple. *Neurología* 1994;10: 509 (abstract)
- 299.- **Bernd A, Ramirez-Bosca A, Huber H, Diaz Alperi J, Thaci D, Sewell A, Quintanilla E, and Holzmann H.** Immunomodulating effects of *Polypodium leucotomos* extract on human leucocytes in vitro. *Drug Research* 1995;45(2) 8: 901-904.
- 300.- **Alvarez XA, Franco-Maside A, Fernández-Novoa L, and Cacabelos R.** Effect of Anapsos on behaviour and brain cytokines in rats. *Ann Psych* 1993;3: 329-341.

- 301.- Alvarez XA, Zas R, Lagares R, Franco A, Maneiro E, Miguel-Hidalgo JJ, Fernández-Novoa L, Diaz J, and Cacabelos R. Neuroimmunomodulatory and neurotrophic activity of anapsos: studies with laboratory animals. *Annals of Psychiatry* 1995;5: 267-280.
- 302.- Casas Tineo M, Alonso G, y Casas Marín M.. Observaciones al tratamiento del herpes zoster, con anapsos como única medicación. *Antol Dermatol* 1988;10: 24-27.
- 303.- Bagan JV, Milian A, Sanchís M, Peñarrocha M, y Moragón M.. Tratamiento de la estomatitis aftosa recidivante en anapsos. *Acta Estomatológica* 1989;4: 123-127.
- 304.- Monclús F, y Vargas J. Anapsos en queratitis víricas. *An Inst Barraquer* 1985;18: 145-148.
- 305.- Suero Gonzalez JA. Observaciones sobre el uso de anapsos en afecciones oculares primarias o secundarias a enfermedades sistémicas. *An Inst Barraquer* 1991,22: 112-121.
- 306.- Horvath A, and Tabora E.. Alterations of collagen in psoriatic skin. *Dermatologica* 1972;144: 83-91.
- 307.- Perez de las Casas O, Rodriguez R, and Gonzalez AP. Aloinjertos cutáneos tras la administración de extractos de *Polypodium Leucotomos* (Estudio Experimental). *Quirúrgica* 6 1987;30: 303-311.
- 308.- Segal R, Dayan M, Zinger H, and Mozes E.. Methotrexate treatment in murine experimental systemic lupus erythematosus (SLE); clinical benefits associated with cytokine manipulation. *Clin Exp Immunol* 1995;101: 66-72.
- 309.- Larricki JW, and Wright SC. Cytokine Modulation of Viral Infections, pp.181-195. In: Kunkel SL, Remick DG, ed. *Cytokines in health and disease*. New York: Marcel Dekker Inc, 1992.
- 310.- Fong Ky, Boey ML, Koh WH, and Feng PG.. Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12(1): 55-58.
- 311.- Dinarello CA.. Interleukin-1 in disease. *Keio J Med* 1994;43(3): 131-136.
- 312.- Vasange-Tuominen M, Perera-Ivarsson P, Shen J, Bohlin L, and Rolfsen W. The fern *Polypodium Decumanum*, used in the treatment of psoriasis, and its fatty acid constituents as inhibitors of leukotriene B4 formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (SCOTLAND)* 1994;50(5): 279-284.

- 313.- Cacabelos R, Barquero M, García P, Alvarez XA, and Varela de Seijas E.** Cerebrospinal Fluid Interleukin-1B in Alzheimer disease and Neurological Disorders. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1991;13(7): 455-458.
- 314.- Chofflon M, Juillard C, Juillard P, Gauthier G, and Grau GE.** Tumor necrosis factor alfa production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis. *Eur Cytokine Netw* 1992;3(6): 523-531.
- 315.- Mc Geer PL, and Rogers J.** Antinflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology* 1992;42: 447-449.
- 316.- Cacabelos R.** New strategies for Alzheimer's disease treatment: pleiotropic drugs and multifactorial intervention. In. *Alzheimer's Disease: Therapeutic Strategies*, ed by E. Giacobini and R. Becker, Birkäusser Boston, 1994: 493-498.
- 317.- De Groot D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I, Igot D, Baudrihay M, Delacroix D, and Franchimon P.** Direct Stimulation of Cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, INF- γ and GM-CSF) in Whole Blood.I.Comparison with Isolated PBMNc Stimulation. *Cytokine* 1992;4(3): 239-248.
- 318.- Ault KA.** Applications in immunology and lymphocyte analysis, pp.685-696. In M. R. Melamed, T. Lindmo, and M.L Mendelson (Ed.), *Flow cytometry and sorting.*, 2nd ed. Wiley-Liss, Inc., New York 1990.
- 319.- Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, and Trinchieri G..** Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol* 1983;130: 2133-2137.
- 320.- Perussia B, Fanning V, and Trinchieri G..** A human NK and K cell subset shares with cytotoxic T cell, expression of the antigen recognized by antibody OKT8. *J Immunol* 1983;131: 223-227.
- 321.- Sempere JM, Rodrigo C, Campos A, Villalba JF, and Diaz J..** Effect of Anapsos (*Polypodium leucotomos* extract) on in vitro production of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Clin Pharmacol*. In press.
- 322.- Cuellar del Hoyo C, Rodero M, Bolás F, and Martinez A:** The effects of *Polypodium leucotomos* extract on the specific antibody production patterns in Balb/c mice immunized with third stage larvae antigens of *Anisakis Simplex*. *Int J Pharmacognosy*. In press.



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proliferación linfocitaria en cuentas por minuto, de células estimuladas solo con Anapsos.

Figura 2: Proliferación linfocitaria en cuentas por minuto, de células estimuladas con PHA (0'5 $\mu\text{g/ml}$) mas Anapsos.

Figura 3: Proliferación linfocitaria en cuentas por minuto, de células estimuladas con PWM (4 $\mu\text{g/ml}$) mas Anapsos.

Figura 4: Secreción de IL-1 β para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Figura 5: Secreción de TNF- α para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Figura 6: Secreción de IL-2 para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Figura 7: Secreción de INF- γ para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Figura 8: Secreción de IL-10 para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).



Figura 9: Secreción de IL-4 para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Figura 10: Porcentaje de células expresando los antígenos de membrana CD5, CD3, CD4, CD8 o CD19, para las diferentes condiciones de estimulación: F0 (células sin estimular a tiempo inicial), LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos.

Figura 11: Porcentaje de células CD4+ con expresión simultánea de CD25, CD38, CD45RA o CD45RO, para las diferentes condiciones de estimulación: F0 (células sin estimular a tiempo inicial), LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos.

Figura 12: Porcentaje de células CD16+, CD8+CD25+, y expresión de CD8 con alta (bright) o baja (dim) intensidad de fluorescencia, para las diferentes condiciones de estimulación: F0 (células sin estimular a tiempo inicial), LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos.



INDICE DE TABLAS

Tabla I: Cinética de producción de IL-1 β para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Tabla II: Cinética de producción de TNF- α para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Tabla III: Cinética de producción de IL-2 para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Tabla IV: Cinética de producción de IL-4 para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Tabla V: Cinética de producción de INF- γ para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Tabla VI: Cinética de producción de IL-10 para las diferentes condiciones de estimulación (LPS, LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos).

Tabla VII: Correlaciones lineales entre citocinas, que revierten cuando se añade Anapsos al cultivo.

Tabla VIII: Porcentaje de células expresando los antígenos de membrana CD5, CD3, CD4, CD8 o CD19, para las diferentes condiciones de estimulación: F0 (células sin estimular a tiempo inicial), LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos.

Tabla IX: Porcentaje de células CD4+ con expresión simultánea de CD25, CD38, CD45RA o CD45RO, para las diferentes condiciones de estimulación: F0 (células sin estimular a tiempo inicial), LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos.

Tabla X: Porcentaje de células CD16+, CD8+CD25+, y expresión de CD8 con alta (bright) o baja (dim) intensidad de fluorescencia, para las diferentes condiciones de estimulación: F0 (células sin estimular a tiempo inicial), LPS+PHA, LPS+Anapsos, LPS+PHA+Anapsos.