

96 - D

No. Cod. 084708941

# *Universidad de Guadalajara*

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**"ESTUDIO DEL EFECTO DE TACTIVINA SOBRE  
LA LINFOPROLIFERACION Y SINTESIS DE  
INTERLEUCINA 2 in vitro EN PACIENTES  
CON ASMA BRONQUIAL EN REMISION"**

**MODALIDAD  
SEMINARIO DE INVESTIGACION**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA.**

**P R E S E N T A**

**MARTHA ELENA ROMERO PALACIOS**

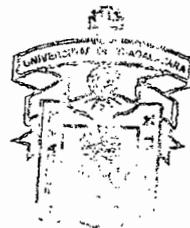
**ZAPOPAN, JAL. FEBRERO DE 1998.**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

CUCBA



**C. MARTHA ELENA ROMERO PALACIOS  
P R E S E N T E.**

**BIBLIOTECA CENTRAL**

Manifiestamos a ustedes que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de SEMINARIO DE INVESTIGACION con el título "ESTUDIO DEL EFECTO DE TACTIVINA SOBRE LA LINFOPROLIFERACION Y SINTESIS DE INTERLEUCINA 2 *IN VITRO* EN PACIENTES CON ASMA BRONQUIAL EN REMISION" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo les informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo a la **M.C. MARY FAFUTIS MORRIS** y como Asesora a la **DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA**.

**A T E N T A M E N T E**  
**" PIENSA Y TRABAJA "**  
**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., FEBRERO 18 DE 1998**

  
**M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO**  
**PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION**

**COMITE DE  
TITULACION**

  
**M. EN C. JOSE LUIS NAVARRETE HEREDIA**  
**SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION**



c.c.p. **M.C. MARY FAFUTIS MORRIS**.- Director del Trabajo.  
c.c.p. **DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA**.- Asesor del trabajo.  
c.c.p. El expediente del alumno.

**AOB/JLNH/memn\***

C. M.C. ARTURO OROZCO BAROCIO  
 PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION  
 DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
 DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
 P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación en la modalidad de SEMINARIO DE INVESTIGACION que realizó el (la) pasante:

MARTHA ELENA ROMERO PALACIOS

con el título:

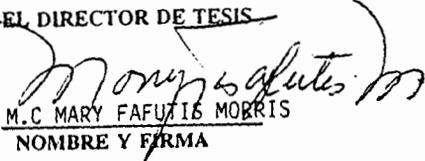
ESTUDIO DEL EFECTO DE T ACTIVINA SOBRE LA LINFOPROLIFERACION Y SINTESIS DE INTERLEUCINA 2 IN VITRO EN PACIENTES CON ASMA BRONQUIAL EN REMISION.

consideramos que ha quedado debidamente concluído, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
 LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, 18 DE FEBRERO 1998

~~EL DIRECTOR DE TESIS~~

  
 M.C. MARY FAFUTIS MORRIS  
 NOMBRE Y FIRMA

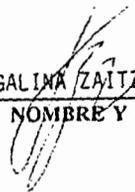
SINODALES

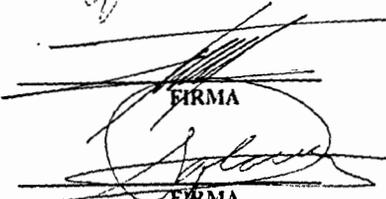
1.- DR. EDUARDO VAZQUEZ VALLS  
 NOMBRE COMPLETO

2.- M.C. OSWALDO PALACIOS RIVERA  
 NOMBRE COMPLETO

3.- BIOL. RICARDO SOLIS  
 NOMBRE COMPLETO

EL ASESOR

  
 DRA. GALINA ZAITZEVA PETROVNA  
 NOMBRE Y FIRMA

  
 FIRMA

  
 FIRMA

  
 FIRMA

## DEDICATORIA

*A mi mejor amigo que es buenísima onda  
y que siempre ha estado conmigo.. Dios.*

*A mi Madre, Lic. Martha Palacios  
por toda su ayuda  
incondicional  
y apoyarme  
siempre a pesar de  
ser taaan  
exigente.  
A mi Padre,  
Jésus por  
confianza.*

*A mis hermanos, Frank y Jesús  
por los años pasados que vivimos juntos.*

*Al Españolito  
más tierno de Gran  
Canaria, Jose J,  
por tu cariño y  
por animarme  
siempre.*

*A los niños enfermos de asma  
y a los otros que voluntariamente  
donaron su sangre.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al M en C Alfonso Islas, Director de la división de Cs. biológicas y ambientales.

Agradezco al M en C Arturo Orozco Barocio, Presidente del comité de titulación.

A la Dra. Mary Fafutis, por todo su apoyo, voluntad y atención que me brindó le agradezco de verdad, le admiro por su sencillez y amabilidad. gracias!

Agradezco a la Dra. Galina Zaitseva, por la dirección en este trabajo y sus atenciones.

Agradezco a mis sinodales, Dr. Eduardo Vazquez, M en C Oswaldo Palacios y Biol. Ricardo Solís.

A M en C, Ceci Guillen por todos sus consejos, su gran ayuda en el laboratorio y por ser tan buena onda, gracias!

A Rocio Godinez por animarme, y esperarme en todo momento muchas gracias.

A la Biol Celia, por sus consejos. gracias!

Al Instituto Mexicano del Seguro Social, por otorgarme siempre beca, y lograr así, combinar la universidad con el trabajo.

A todos los Médicos y enfermeras del hospital del ISSSTE.

Agradezco al Biol. Alejandro dominguez de la Torre por su ayuda en el diseño de las figuras, gracias por ser tan amable y buenísima onda!

Agradezco a mi amigocho, Lic. Adrian por su ayuda en la elaboración de las diapositivas

Agradezco a Martha y Angy por aguantarme tanto en el centro de cómputo y s por su gran ayuda de siempre.

A mis padres por toda su ayuda, difícilmente podría pagarles todo lo que han hecho por mi, gracias!!

Agradezco a la Universidad de Guadalajara, por haberme permitido avanzar en mi formación académica.

# INDICE

	Pág
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	2
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	13
DISCUSION.....	23
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	26

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Fig. 1 Indice de estimulación con Tactivina y PHA 1a, 1b y 1c.....	15
Fig. 2 Promedio del Indice de estimulación con Tactivina y PHA.....	16
Fig. 3 Indice de estimulación de los ensayos de linfoproliferación 1, 2, y 3.....	17
Fig. 4 Nivel de IL-2 en el sobrenadante de linfoproliferación 4a, 4b y 4c.....	18
Fig. 5 Promedio del nivel de IL-2 .....	19
Fig. 6 Nivel de IL-2 en los ensayos de linfoproliferación 1, 2, y 3.....	20
Tabla I Indice de estimulación de individuos sanos y enfermos.....	21
Tabla II Nivel de IL-2 en el sobrenadante de los ensayos de linfoproliferación.....	22

## INTRODUCCION

El asma bronquial, se caracteriza por un aumento en la resistencia al flujo de aire, y clínicamente se manifiesta por disnea, tos y sibilancias así como inflamación persistente en bronquios desarrollada por la presencia de células inflamatorias, principalmente eosinófilos y linfocitos (1).

En condiciones normales la activación de células T induce la liberación de factores solubles llamados interleucinas, proteínas que intervienen especialmente en los señalamientos intercelulares para generar respuesta a una gran variedad de estímulos externos; particularmente la interleucina -2 (IL-2) tiene una gran variedad de funciones entre ellas la maduración y proliferación de células T (2).

Los pacientes durante una crisis asmática tienen niveles altos de esta interleucina en comparación con los individuos sanos (3, 4 y 5). Los medicamentos más utilizados en el tratamiento del asma son evidentemente los corticosteroides, ya que ejercen efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, que además tienen efectos secundarios (1), ya que los pacientes con asma bronquial los cuales son sometidos a una terapia con corticosteroides suelen tener niveles bajos de IL-2 (1, 6).

La Tactivina es un conjunto de polipéptidos de origen tímico con acción inmunomoduladora, principalmente sobre la diferenciación y maduración de linfocitos T. Los resultados obtenidos de un tratamiento *in vivo* con Tactivina, fue particularmente efectivo en pacientes con inflamación crónica en pulmones (neumonía) (7). Y en pacientes con asma extrínseca (18).

En este trabajo se realizaron una serie de experimentos *in vitro* con Tactivina, en el que se obtuvieron evidencias del efecto de éste polipéptido sobre linfocitos T y la síntesis de IL-2 en los pacientes con asma bronquial atópica.

## ANTECEDENTES

### Asma bronquial

El asma bronquial es una enfermedad multifactorial, caracterizada por un aumento en la resistencia al flujo de aire, ésta obstrucción de la espiración puede ser resultado del estrechamiento anatómico de las vías aéreas (1).

Clínicamente el asma se manifiesta por disnea, tos y sibilancias que son reversibles o con tratamiento. La enfermedad es crónica e incluye toda la vía respiratoria pero varía en gravedad desde episodios suaves ocasionales hasta obstrucción bronquial grave, que pone en peligro la vida. Existe eosinofilia tanto en sangre como en las secreciones respiratorias (1).

Ya que el asma es una enfermedad heterogénea, no existe una clasificación sencilla aceptada universalmente, sin embargo, por tradición y utilidad clínica a menudo se clasifican 2 categorías: asma intrínseca y extrínseca.

El asma intrínseca, en la cuál los mecanismos desencadenantes no son inmunitarios, es provocada por varios estímulos que pueden iniciar broncospasmo, como son: a) las infecciones pulmonares, especialmente causadas por virus b) la aspirina c) el estrés psicológico; d) el frío, aparecen por primera vez en la edad adulta habitualmente después de una infección respiratoria, aparentemente este tipo de asma prosigue un curso de obstrucción bronquial recurrente no relacionada con las estaciones de polinización ni con otros alérgenos; el nivel de Inmunoglobulina E (IgE) en suero es normal, las pruebas cutáneas a ciertos alérgenos atópicos habituales y los antecedentes familiares para otras enfermedades son negativos.

El asma extrínseca, conocida también como asma atópica o alérgica es el tipo más frecuente, la cual es desencadenada por antígenos ambientales como polvos, polen, caspa de animales y alimentos pudiendo estar implicado cualquier antígeno. Los ataques de asma ocurren durante la polinización, las pruebas cutáneas provocan roncha y eritema frente a los alérgenos causantes, la concentración total de IgE está elevada con frecuencia pero a veces es normal (1).

Aproximadamente el 50% de los asmáticos tiene evidencia de alergia atópica como grupo, su inicio ocurre generalmente en las primeras 2 décadas de la vida, habitualmente en la lactancia o la niñez y se acompaña comúnmente de otras manifestaciones alérgicas en el paciente así como en los miembros de la familia. El diagnóstico de asma bronquial esta basado en la historia clínica, exploración física y pruebas de la función pulmonar (8).

### Atopia y Alergia

La propensión heredada para responder inmunitariamente a muchos alergenos habituales de presencia natural inhalados e ingeridos, con la producción continua de anticuerpos IgE, se denomina atopia, a menudo se utilizan los términos hipersensibilidad y sensibilidad como sinónimos de alergia la cuál se refiere a ciertas enfermedades como es el asma bronquial, en la cual las respuestas inmunitarias a antígenos ambientales provocan inflamación tisular y disfunción orgánica (9).

### El Asma y la Respuesta Inmune

En condiciones normales las células T activadas induce la liberación de factores solubles llamados interleucinas proteínas que intervienen de gran forma en las indicaciones celulares requeridas para una respuesta integrada a una gran variedad de estímulos externos (10).

La interleucina (IL-2), es una glucoproteína producida por células T que tiene una gran variedad de funciones inmunes, la más notable es la estimulación de la proliferación y maduración de células T. Algunas de las propiedades atribuidas a IL-2 son: activación de células del sistema inmune, incluyendo células T cooperadoras (CD4+), células T citotóxicas/supresoras (CD8+), macrófagos, células NK (asesinas naturales), así como la estimulación de células B para la producción de anticuerpos (10).

El antígeno ingerido y presentado por las células accesorias (macrófagos o monocitos) activa las células T, y provoca así que secreten IL-2 (*in vivo* o *in vitro*) y sinteticen receptores para la propia IL-2. El receptor está compuesto por 3 cadenas proteicas (IL-2R $\alpha$  55kDa, IL-2R $\beta$  45 kDa e IL-2 $\lambda$  64kDa), cada una de las cuales se une en forma independiente a la molécula de IL-2, la interacción entre la IL-2 y la cadena larga constituye la señal que pondrá en marcha la proliferación de células T, intensificando de este modo el ataque específico del Sistema Inmune (SI) contra cualquier microorganismo (2).

Mediante pruebas de ELISA (enzymo-liked immunosorbent assay), se ha detectado que los niveles de sIL-2R (receptor para *interleucina* 2 soluble), en pacientes asmáticos han sido significativamente altos en comparación con sujetos normales (3,4 y 11).

Mientras individuos con asma durante el ataque han mostrado tener niveles más altos de IL-2 que en pacientes asmáticos en remisión, en tanto aquellos que han estado sometidos a terapia con corticosteroides suelen tener niveles bajos de esta interleucina comparado con aquellos que no lo han estado (4).

No obstante recientemente se ha comprobado que el uso continuo y prolongado de corticoides en niños con asma bronquial, no provoca la diferencia en la respuesta inmune celular en la comparación con aquellos pacientes que no los han usado y con sujetos normales (6).

Además, se ha observado que los efectos de una provocación bronquial mediante la exposición al alérgeno acaros del polvo casero (HDM) a individuos con asma constante y reacción cutánea positiva muestran una Inmediata Reacción Asmática (IAR) (4). En tanto aquellos pacientes que no han sido sometidos a hiposensibilización (HS), tienden a mostrar un elevado índice de estimulación (IE) con respecto a los que estuvieron bajo HS. Sin embargo no hay diferencia estadísticamente significativa entre IE en estos grupos. En estudios más recientes, se ha observado que los niños con asma bronquial sometidos a HS muestran un número significativamente bajo de proliferación de linfocitos *in vitro* así como niveles bajos de sIL-2R (5).

Por otro lado se ha estudiado estos niveles de linfoproliferación a los niños con asma bronquial alérgica e infecciosa que residen en condiciones ambientales diferentes, y se ha demostrado que pacientes los cuales residen en un medio desfavorable muestran una disminución de linfocitos T en sangre periférica, disminuyendo su actividad funcional, así como en la actividad de interleucinas, comparados con aquellos que viven en condiciones favorables (12). La reacción entre el sistema inmunocompetente y un antígeno con el que se ha tenido contacto previo condicionan un aumento de la reactividad del árbol traqueobronquial que provoca la obstrucción de las vías aéreas y se manifiesta por presentar broncospasma, edema de mucosa bronquial e hipersecreción de moco bronquial en pacientes con asma (8).

## Tactivina

Tactivina representa una mezcla heterogénea de polipéptidos, los cuáles ejercen influencias reguladoras sobre la diferenciación, migración y maduración de linfocitos T en el timo, bazo, nódulos linfoides y sangre periférica, Además Tactivina es capaz de regular algunos procesos bioquímicos en células no linfoides. Los estudios muestran que la heterogeneidad de Tactivina principalmente resulta de la diversidad funcional de los constituyentes moleculares más que de la separación de las moléculas en el proceso de extracción de Tactivina, aunque tal degradación puede contribuir a la heterogeneidad molecular (7).

## Efectos de Tactivina

Se ha observado que Tactivina puede inhibir o estimular las células NK *in vitro*, otros estudios demuestran incremento de actividad de NK *in vivo* si éstas son relativamente bajas, Tactivina también ha sido utilizada en pacientes por *Herpes keratitis* en remisión subcutáneamente con dosis de 20 a 50µg/ml (dependiendo del estado clínico e inmunológico del paciente). Este tratamiento no solo normalizó los parámetros inmunológicos si no también mejoró su estado clínico. En casos mas severos sin respuesta a un tratamiento con drogas convencionales, ha ejercido efectos terapéuticos muy marcados ya que pacientes tratados con Tactivina toleraron terapias con radiación y quimioterapia mucho mejor (7).

Una propiedad importante de Tactivina es su habilidad de mejorar la hematopoyesis en médula ósea la cual es dañada por radiaciones y agentes quimioterapéuticos. Pacientes con esclerosis múltiple en quienes persisten anomalías de función tímica y niveles reducidos de Factor Tímico Sérico (FST), han sido tratados durante 5 días con Tactivina, la cual restituyó la función de células T y mejoró los niveles de FST. Los ensayos clínicos con Tactivina han demostrado su alto potencial terapéutico (7).

Tactivina ha sido probada en combinación con un tratamiento en pacientes con tuberculosis pulmonar y lesiones gastrointestinales, demostrando que incrementa la cantidad de linfocitos T y mejora la proporción de sus subpoblaciones en un breve periodo de tiempo (13). El efecto de un tratamiento incluyendo a Tactivina ha sido evaluado sobre los parámetros clínicos e inmunológicos en niños con apendicitis aguda, la combinación del tratamiento garantizó una mayor rapidez de la mejoría sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad (14).

En otros estudios Tactivina ha sido utilizada como inmunomodulador auxiliar en pacientes con leucemia mieloide crónica, demostrando que corrige la inmunidad celular y reduce los sucesos a una complicación por infección (15).

En pacientes con hepatitis crónica, los cuales presentan actividad tímica del suero baja, Tactivina demostró que genera una buena respuesta clínica (16).

Experimentos realizados a un grupo de pacientes que padecen colitis los cuales fueron tratados con métodos convencionales y otro grupo de pacientes fue tratado nuevamente con un tratamiento incluyendo a Tactivina, se demostró que la droga con este inmunomodulador produjo efectos positivos sobre el estado inmunológico de los pacientes (17).

Desde 1989 Arion, V. Ya. publicó resultados donde el tratamiento *in vivo* con Tactivina fue particularmente efectivo en pacientes con inflamación crónica en pulmones (neumonía), 7 de 12 pacientes con asma infecciosa-alérgica se beneficiaron con este tratamiento y ninguno con asma bronquial atópica (7).

En estudios realizados en niños con asma bronquial severa o moderada, se demostró un desbalance en las subpoblaciones de linfocitos T(CD4+, CD8+) así como disminución de actividad tímica del suero. Después del tratamiento *in vivo* con Tactivina se normalizan los parámetros inmunológicos modificados, esto permite usar este medicamento como un inmunomodulador (18).

## **HIPOTESIS**

Tactivina es un inmunomodulador que normaliza la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA y la síntesis de IL-2 in vitro en pacientes con asma bronquial.

## • OBEJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de Tactivina sobre la linfoproliferación y síntesis de IL-2 *in vitro* en pacientes con asma bronquial en remisión.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar la respuesta de transformación blastoide de linfocitos tratados con Tactivina en presencia de PHA *in vitro* de individuos sanos y enfermos de asma bronquial.
- 2.- Comparar el nivel de IL-2 en sobrenadante de cultivo de linfocitos de pacientes con asma bronquial e individuos sanos.
- 3.- Determinar el efecto de Tactivina sobre la producción de IL-2 *in vitro* en los linfocitos de pacientes con asma bronquial.

## MATERIAL Y METODOS

### Sujetos de Estudio:

Se estudiaron 6 pacientes (6-12 años) con asma bronquial (atópica), provenientes del Servicio de Inmunoalérgias del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de Trabajadores del Estado (ISSSTE). La severidad de la condición fué asma constante, en remisión, no dependiente a corticosteroides.

El grupo testigo consistió en 3 individuos sanos, similares en edad y sexo y sin ninguna relación familiar con los pacientes de asma bronquial.

### Curva dosis-respuesta

Se realizó una curva-dosis respuesta con el fin de conocer la concentración óptima de Tactivina. Las cantidades probadas fueron 20µg, 10µg y 5µg/ml diluidas en medio de cultivo RPMI-1640 + 5% Suero Fetal de Ternera (SFT).

### Obtención de Células:

A partir de 5ml de sangre periférica heparinizada, obtenida de los sujetos por punción venosa, y diluida en solución salina balanceada de Hank's (HBSS) v/v, se obtuvieron las células mononucleares mediante la separación por gradientes de densidad Ficoll-Hypaque por la técnica de Boyüm (19). Se obtuvo el anillo blanco rico en linfocitos después de centrifugar a 1200r.p.m. durante 20 minutos el cual se colectó y se lavó en (HBSS) 2 veces a 1500 r.p.m. durante 10 minutos cada una. Posteriormente el botón celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% (SFT) (20).

### Ensayo de linfoproliferación:

Finalmente la suspensión celular se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo, por cuatriplicado bajo las siguientes condiciones:

a) sin estímulo; b) bajo estímulo mitogénico con (PHA) 10µg/ml; c) con Tactivina 5µg/ml; d) con Tactivina 5µg/ml + PHA. Las células fueron incubadas en caja de microcultivos con medio RPMI-1640 durante 48h en atmósfera húmeda, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Al término de éste tiempo los pocillos se dividieron en duplicados, de cada 2 de estos se colectó el sobrenadante y se guardó en viales a temperatura -70°C para ser posteriormente analizados los niveles de IL-2 por ELISA (15).

En los otros 2 pozos de cada condición se aplicó un pulso de timidina tritiada, 10 $\mu$ Ci. Después de 24 hrs las células se colectaron de forma manual, la timidina incorporada por los linfocitos T se midió en un contador de radiaciones beta, los datos sobre linfoproliferación se obtuvieron en cuentas por minuto (cpm), los índices de estimulación se obtuvieron bajo la siguiente formula: (20).

$$IE = \frac{\text{cpm. células estimuladas}}{\text{cpm. células no estimuladas}}$$

En humanos el índice de estimulación normal es superior a 5

La prueba estadística consistió en un análisis de varianza.

## Cuantificación del nivel de IL-2 en sobrenadante de cultivos de linfocitos T por la técnica de Elisa.

Los sobrenadantes colectados y congelados se analizaron por ELISA, bajo la siguiente metodología :

Los sobrenadantes se pusieron en contacto con el anticuerpo monoclonal anti-IL-2 previamente adherido a cada pozo de una placa ELISA (Quantikine human IL-2 R& D) y fueron incubados por 2hr. A temperatura ambiente. Después se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) 3 veces. Posteriormente se adicionó 200µl del segundo anticuerpo anti-IL-2 conjugado con peroxidasa, incubandose 2hr a temperatura ambiente , se lavó nuevamente y se agregaron 200µl de solución de sustrato conteniendo peróxido de hidrogeno y tetrametilbencidina, incubados por 20 minutos a temperatura ambiente para desarrollar color, se detuvo la reacción agregando a cada pozo 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .

Posteriormente se determinó la densidad óptica en cada pozo utilizando un espectrofotómetro con una longitud de onda de 450nm (21).

## RESULTADOS

En las gráficas 1 a, b y c se muestran los índices de estimulación (IE) obtenidos de la respuesta de linfocitos T a: PHA, Tactivina, y la combinación PHA + Tactivina de individuos sanos y de pacientes con asma bronquial. En éstas se observa que los IE de los pacientes son más elevados que de los sanos ante el estímulo de PHA. Además, los linfocitos no tuvieron respuesta proliferativa cuando se incubaron con Tactivina sola.

La gráfica 2 muestra los cultivos de las células estimuladas con PHA, de los pacientes con asma bronquial el  $\bar{X}$  de los IE fué  $25.38 \pm 3.705$  Error Estándar (Err Esd) para la combinación PHA + Tactivina el  $\bar{X}$  de los IE fué  $23.21 \pm 3.157$  Err Esd, en estos grupos se obtuvo una  $p > 0.01$  no significativa.

En los cultivos de las células estimuladas con PHA, de los controles sanos el  $\bar{X}$  de los IE fué  $14.30 \pm 0.7$  Err Esd y bajo el estímulo de la combinación PHA + Tactivina el  $\bar{X}$  de los IE fué  $13.30 \pm 0.953$  Err Esd, obteniéndose una  $p > 0.01$  no significativa.

En la gráfica 3 se muestra los resultados del IE de los ensayos de linfocitos T, estimulados con PHA y la combinación PHA + Tactivina de los pacientes con asma bronquial e individuos sanos, la prueba estadística demostró que existe diferencia significativa en estos grupos con una  $P < 0.01$

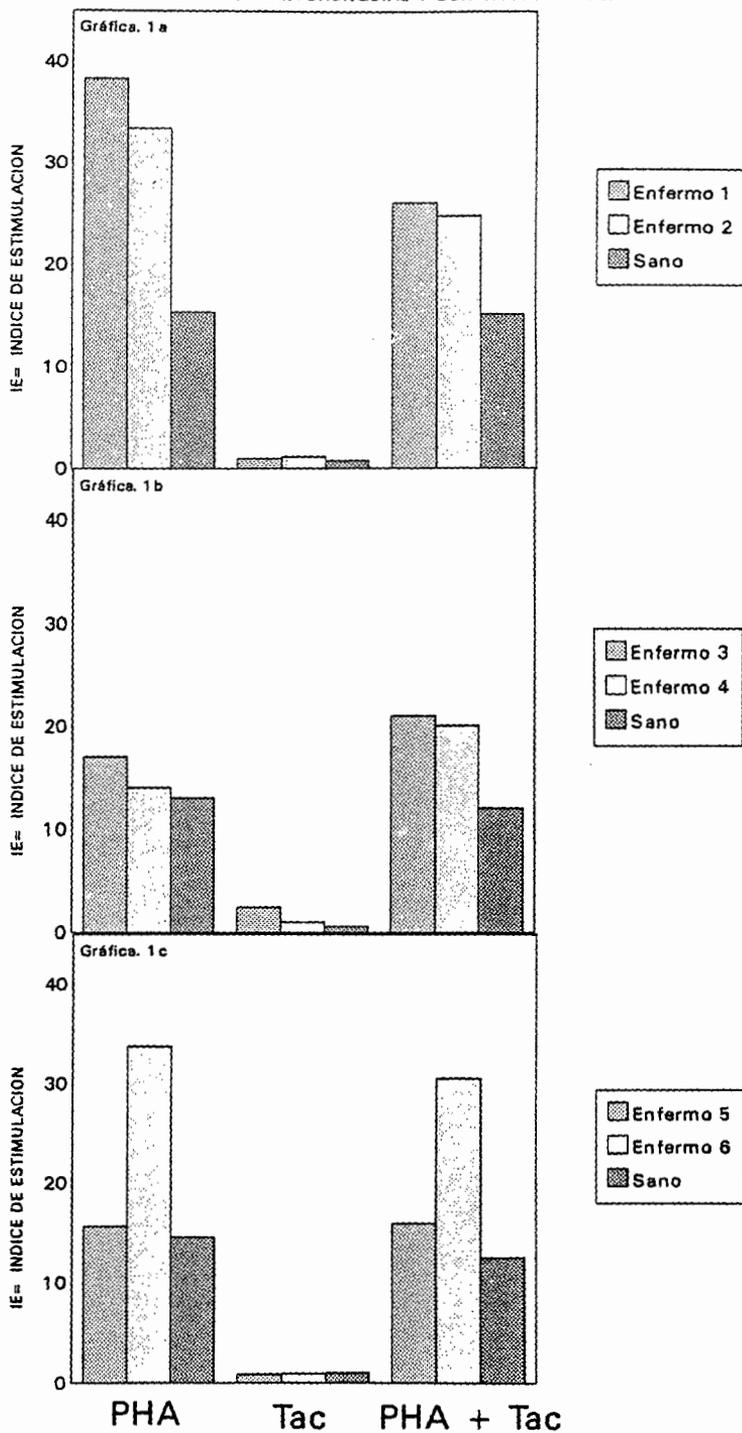
Las gráficas 4 a, b y c muestran los resultados de los niveles de IL-2 en sobrenadante de cultivos de linfocitos T de cada individuo activados con PHA, PHA + Tactivina. Encontrándose que los niveles de IL-2 de los enfermos, estuvieron más elevados cuando las células se incubaron con la combinación PHA + Tactivina, en cambio en los individuos sanos, los resultados obtenidos tanto con PHA como con la combinación PHA + Tactivina, concuerdan con los obtenidos en la proliferación.

En la gráfica 5 se muestran los resultados de los niveles de IL-2 obtenidos del sobrenadante del cultivo de linfocitos de los pacientes con asma bronquial estimulados con PHA, el  $\bar{X}$  de los niveles de IL-2 fue  $556 \pm 51.81$  Err Esd y cuando las células fueron estimuladas con la combinación PHA + Tactivina el  $\bar{X}$  del nivel de IL-2 fue  $901 \pm 244.17$  Err Esd, obteniéndose en estos grupos una  $p < 0.01$  significativa.

Los resultados de los niveles de IL-2 en el sobrenadante del ensayo de linfoproliferación de los individuos sanos estimulados con PHA, el  $\bar{X}$  de los niveles de IL-2 fue  $660 \pm 117.89$  Err Esd y cuando las células fueron estimuladas con la combinación PHA + Tactivina el  $\bar{X}$  del nivel de IL-2 fue  $520 \pm 36.04$  Err Esd, en estos grupos se obtuvo una  $P > 0.01$  no significativa.

Los datos presentados en la gráfica 6, muestran los resultados de los niveles de IL-2 obtenidos del sobrenadante de los ensayos de linfoproliferación de los pacientes con asma e individuos sanos estimulados con PHA y la combinación PHA + Tactivina en estos grupos no existe diferencia estadística significativa.

RESULTADOS DE LINFOPROLIFERACION CON TACTIVINA EN SANGRE PERIFERICA DE NIÑOS CON ASMA BRONQUIAL Y CONTROLES SANOS.

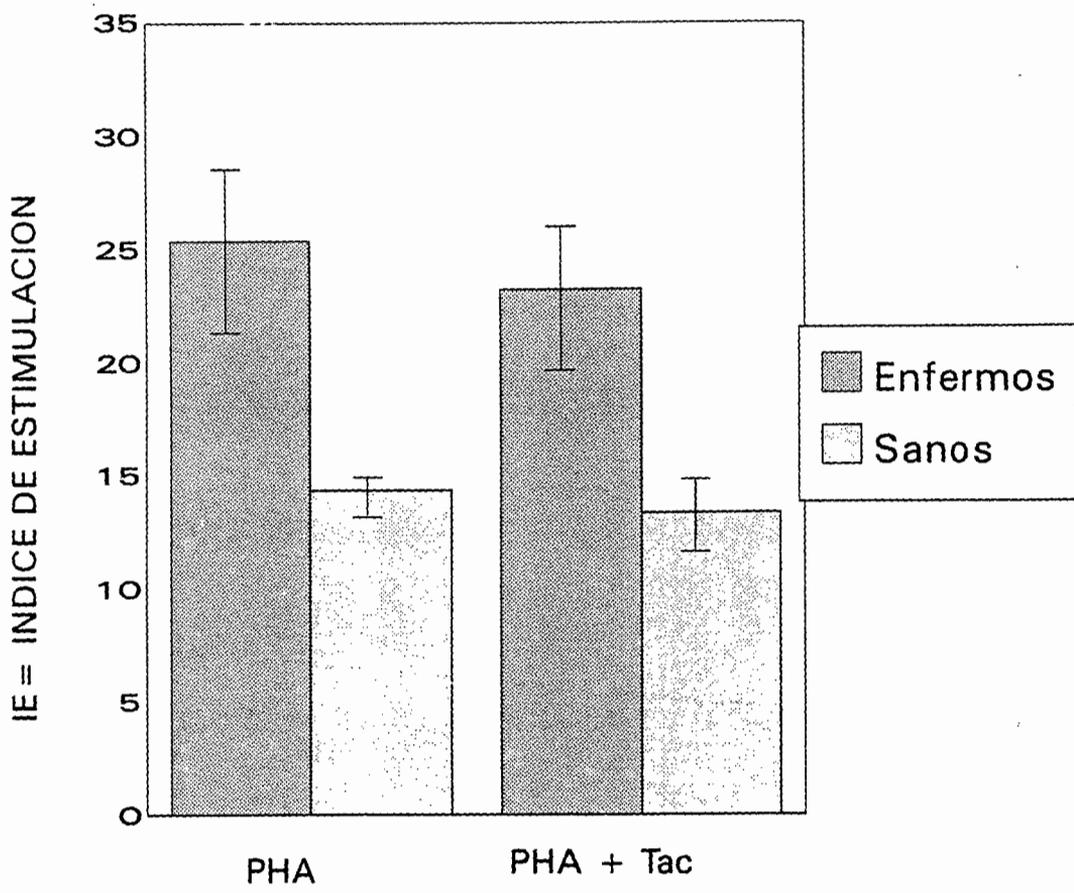




## Gráfica. 2

BIBLIOTECA CENTRAL

PROMEDIO DEL IE ENTRE LOS PACIENTES DE ASMA BRONQUIAL E INDIVIDUOS SANOS.

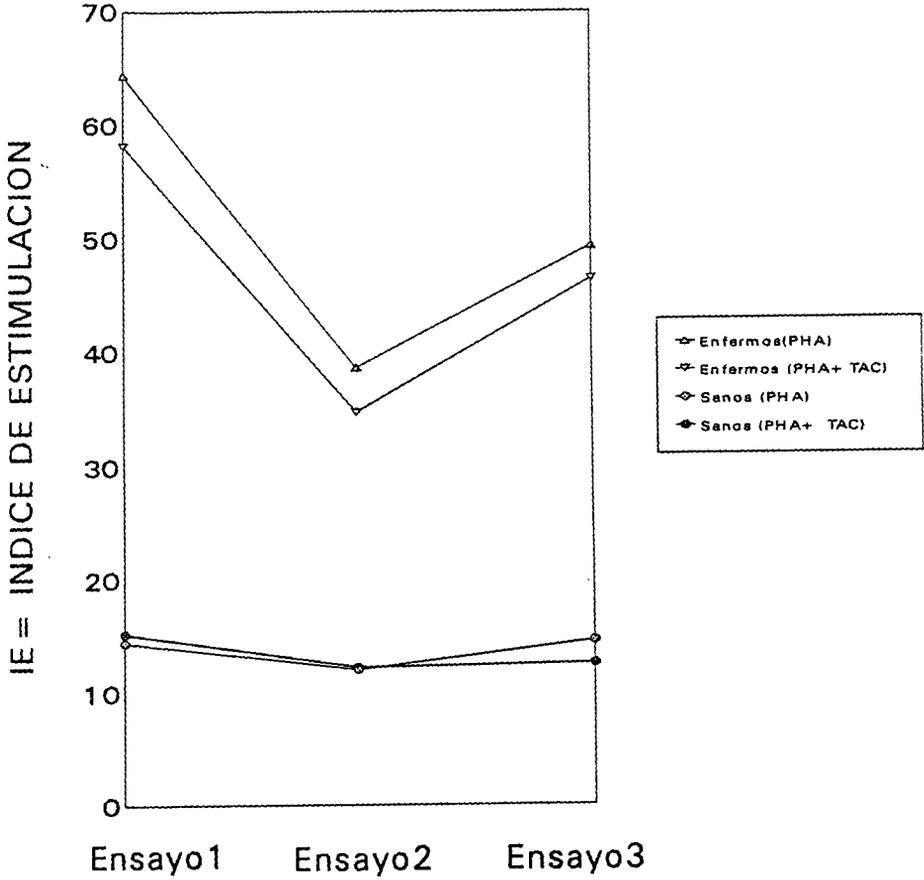


E (PHA) vs E (PHA + Tac)  
S (PHA) vs S (PHA + Tac)  $P > 0.01$

E vs S (PHA)  
E vs S (PHA + Tac)  $P < 0.01$

Gráfica. 3

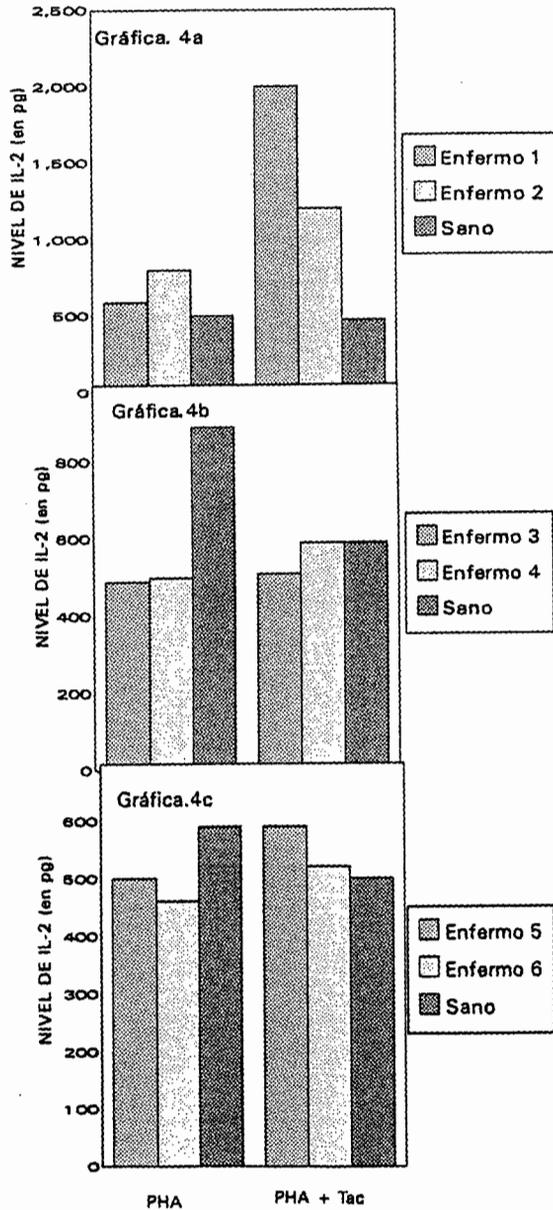
RESULTADOS DE IE DE LOS ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACION EN PACIENTES CON ASMA E INDIVIDUOS SANOS.



E vs S (PHA)  
P<0.01

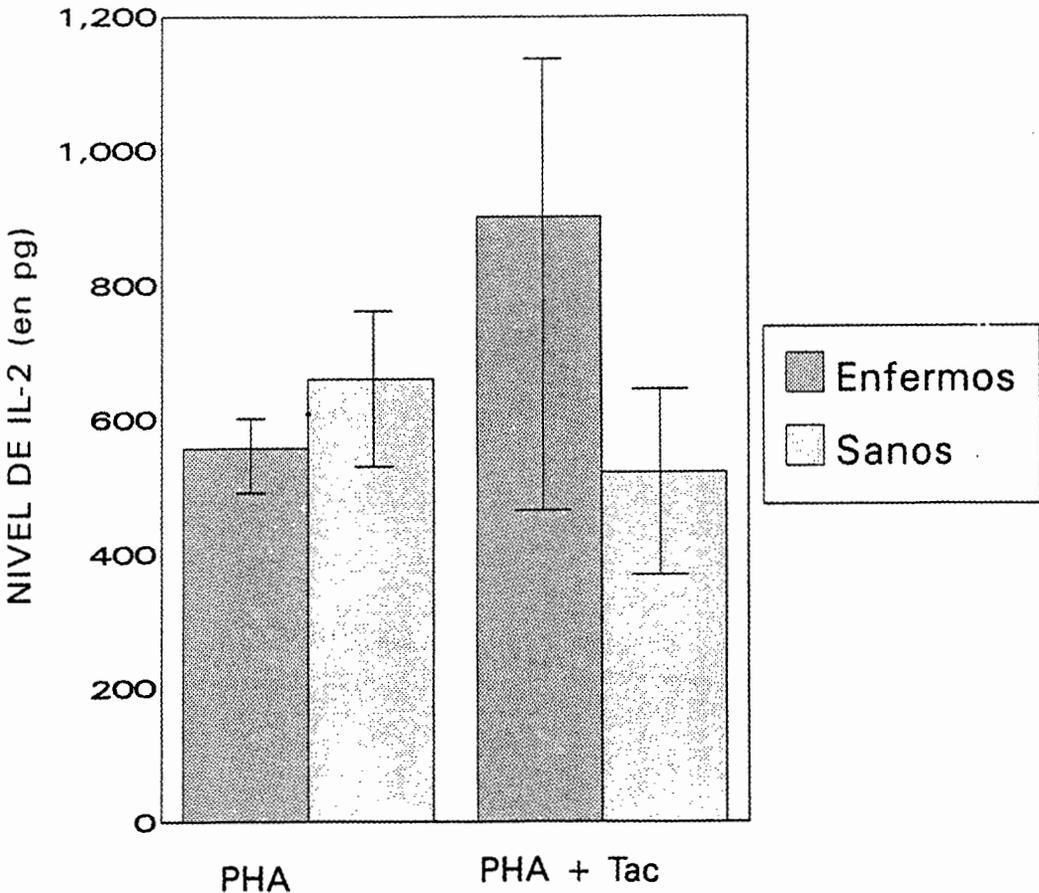
E vs S (PHA + Tac)  
P<0.01

NIVEL DE IL-2 EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO DE LINFOPROLIFERACION BAJO ESTIMULO DE PHA Y PHA + Tac EN NIÑOS CON ASMA BRONQUIAL Y CONTROL SANO.



Gráfica. 5

PROMEDIO DEL NIVEL DE IL-2 DE LOS PACIENTES DE ASMA E INDIVIDUOS SANOS



E (PHA) vs E (PHA + Tac)  $P < 0.01$

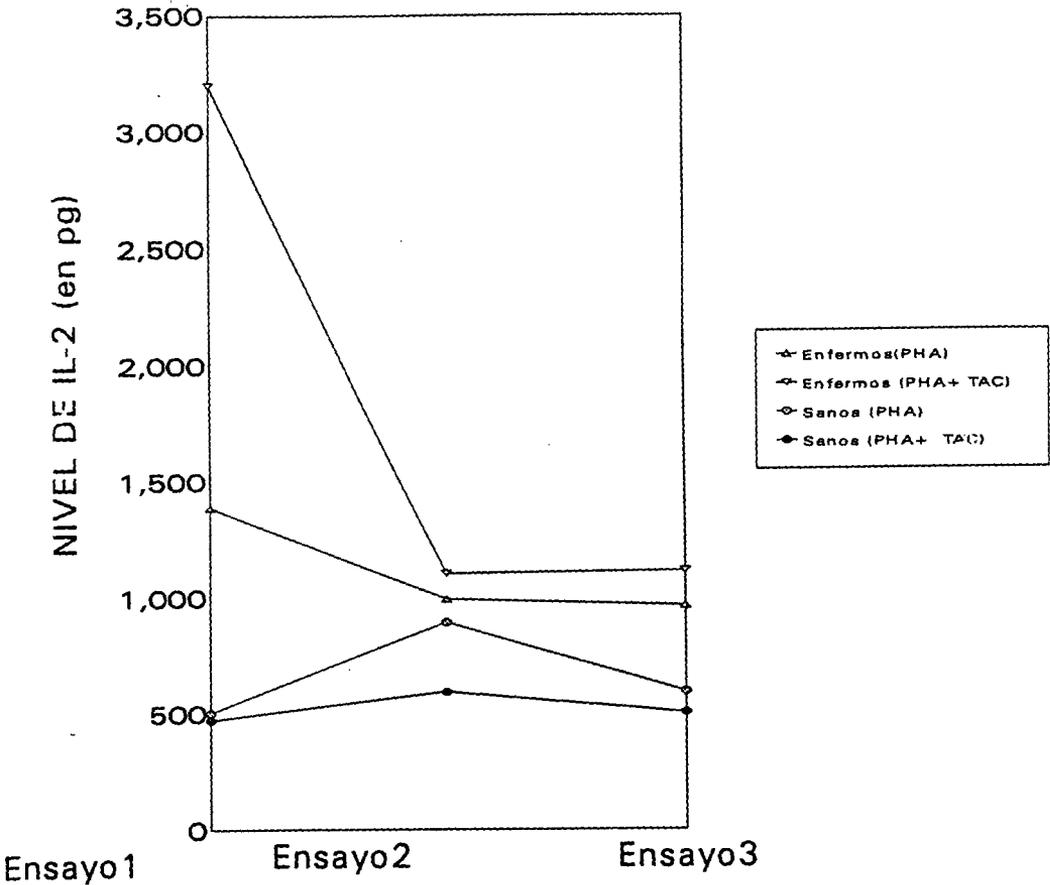
S (PHA) vs S (PHA + Tac)  $P > 0.01$

E vs S (PHA)  $P > 0.01$

E vs S (PHA + Tac)  $P < 0.01$

Gráfica. 6

NIVELES DE IL-2 EN PACIENTES CON ASMA E INDIVIDUOS SANOS.



E vs S (PHA)  
P > 0.01

E vs S (PHA + Tac)  
P < 0.01

**TABLA 1. IE DE SUJETOS ENFERMOS Y SANOS**

ENFERMOS	PHA	Tac	PHA + Tac
1	38.3	0.99	33.4
2	26.1	1.17	24.8
3	17.6	2.45	14.4
4	21.0	1.0	20.3
5	15.6	0.86	15.9
6	33.7	0.95	30.5
Media	25.38	1.2367	23.21
Desv Estándard	9.077	0.602	7.733
Err Estándard	3.705	0.246	3.157

SANOS	PHA	Tac	PHA + Tac
1	15.4	0.7785	15.2
2	13	0.6	12.2
3	14.5	1.0	12.5
Media	14.30	0.7928	13.30
Desv Estándard	1.212	0.200	1.652
Err Estándard	0.7	0.115	0.953

IE = Índice de estimulación

PHA = Fitohemaglutinina

TAC= Tactivina

**CUCBA**



**BIBLIOTECA CENTRAL**

**Tabla 2 .** El nivel de IL-2 en el sobrenadante de los ensayos de linfoproliferación de PHA y PHA + Tactivina en niños con asma bronquial e individuos sanos.

<b>ENFERMOS</b>	<b>PHA</b>	<b>PHA + Tac</b>
1	590	2000
2	800	1200
3	490	510
4	500	590
5	500	590
6	460	520
Media	556.66	901.66
Desv estándar	126.9	598.11
Err estándar	51.81	244.17

PHA = Fitohemaglutinina

Tac = Tactivina

<b>SANOS</b>	<b>PHA</b>	<b>PHA + Tac</b>
1	500	490
2	890	590
3	590	480
Media	600	520
Desv estándar	204.20	60.82
Err estándar	117.89	35.11

## DISCUSION

El objetivo de éste estudio fué evaluar el efecto inmunomodulador de Tactivina sobre la linfoproliferación *in vitro* en los pacientes con asma bronquial.

Los resultados obtenidos de linfocitos T de los pacientes con asma bronquial, cuyo mayor IE se obtuvo bajo el efecto de PHA se debió a la hiperactividad celular que estos presentan. Además, los resultados indican que Tactivina no influyó en la proliferación de linfocitos T *in vitro* de pacientes con asma bronquial e individuos sanos, ya que no modifica los parámetros normales (7).

En los linfocitos tratados solo con Tactivina no se observó respuesta proliferativa, ya que Tactivina no actúa como un mitógeno sino como un coestimulador.

Nuestros resultados no son del todo concluyentes debido a la n (número de pacientes) tan pequeña, sin embargo, se pueden observar 2 cinéticas encontradas, una en cuanto al IE que disminuyó ante la presencia de Tactivina y la opuesta en los niveles de IL-2 que se incremento ante la presencia de esta misma.

Es difícil tratar de explicar estos resultados, sin embargo, Kroemer (22), señala que las células T de individuos con enfermedades autoinmunes, cuando éstas son fuertemente activadas *in vitro*, sintetizan grandes cantidades de receptor para IL-2 que posteriormente se desprende de la membrana linfocitaria capturando a la IL-2 soluble, por lo que no se puede así medir los niveles reales de ésta citocina mediante el método de ELISA.

En nuestro trabajo pudiera estar pasando algo similar, sin embargo existen otros autores que señalan que la IL-2 solo se une su receptor cuando este se encuentra unido a la membrana externa del linfocito T (6).

Los niveles de IL-2 en el sobrenadante de linfocitos estimulados con PHA de los pacientes con asma bronquial aumentaron con la presencia de Tactivina probablemente debido a su influencia en el incremento de la expresión de IL-2, sin modificar la expresión de IL-2R cuyo nivel en los pacientes atópicos puede resultar bajo. Además, Tactivina no modificó significativamente los niveles de IL-2 en los cultivos linfocitarios de individuos sanos, podemos suponer que esto se debe a la expresión suficiente de IL-2R.

Como mencionamos al inicio de la discusión, nuestra *n* fué muy pequeña por lo que no se puede concluir mucho al respecto, sin embargo en base a las tendencias que mostraron los resultados, esto nos alienta a continuar trabajando en ésta línea de investigación aumentando por un lado la *n* y agregando la evaluación del receptor, tanto el que se encuentra unido a la membrana, como el soluble.

# CUCBA



## BIBLIOTECA CENTRAL

## CONCLUSIONES

- 1.- El estímulo de PHA indujo la mayor respuesta proliferativa en los linfocitos T de niños con asma bronquial.
- 2.- Tactivina no modificó los parámetros normales del IE de los linfocitos estimulados con PHA tanto en los pacientes con asma como en los individuos sanos.
- 3.- Los linfocitos estimulados solo con Tactivina no tuvieron respuesta proliferativa.
- 4.- Los niveles de IL-2 presentes en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos estimulados con PHA , en pacientes con asma bronquial no fueron significativamente mayores que de los controles.
- 5.- La presencia de Tactivina incrementó de manera significativa el nivel de IL-2 en el sobrenadante del cultivo de linfocitos estimulados con PHA de pacientes con asma bronquial, sin modificar significativamente los niveles de IL-2 en individuos sanos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Robbins-Angelle "Patología Estructural y funcional" Ed. Interamericana. 1984 págs. 778-79.
- 2.--Kendall A. Smith. "Interleukin-2 Receptor" Annual Review of cell Biology vol. 5. 1989 Págs. 14-21
- 3.-Shiota-Y; Sato-T; Ono-T "Serum levels of soluble CD25 (soluble interleukin receptor in asthmatic patients ) Arerugi-japanese Journal of allergology; 1993 aug. 42(8): 914-9
- 4.-Van-Bever-Hp; Moens-Mm; Brits-CH; De-Clerck-Ls; Mertens-Av; Bosmans-E; Stevens-Wh. "Effect of a bronchial provocation test with house-dust mite on blood eosinofilia, eosinophil cation protein, soluble interleukin-2 receptor, and interlukin 6 in asthmatic children". Allergy. 19993 Aug; 48(6): 443-9
- 5.-Moens-Mm; Van-Bever-Hp; Stevens-Wj; Mertenenes-Av; Bridtsch, De-Clerk "Influence of hyposensitization soluble interleukin-2 receptor, in vitro lymphocyte adhesion, and lymphocyte childhood asthma. Allergy. 1994 sep 49(8):653-8
- 6.-Levy-J; Zalkinder-I; Kuperman-o; Skibin-A Apte-R Bearman-JE. "Effect of prolonged use of inhaled steroids on the cellular immunity J-Allergy-Clin-Immunol. 1995 Apr 95(4): 806-12
- 7.-Arion, V. Ya. "Thymic peptides as immunoregulators, with special reference to T-activin "Sov. Med. Rev. B. Physicochem. Asp. Med. vol. 2 1989 págs. 1-51.
- 8.-P.Stites-Daniel;-J. Vivian-Weel; Stobo John. "Inmunología Básica Clínica" Manual Moderno. 1988 págs. 443-446.

9.-Margni, A Ricardo "Inmunobiología e Inmunoquímica" Ed. Panamericana. 1990 págs. 570-584.

10.-William W. Paul. md. "Fundamental Immunology" Ed. Raven press. New York 1993 pág. 767.

11.-Van-Bever-Hp; Bridts-Ch; Moens-Mm; De-Rijk-Te; Mertens-Ar; De-Clerck-Ls; Stevens-Wj. "Lymphocyte transformation test with house dust mite" Clin-Exp-Allergy. 1993 Aug 23(8):661-8

12.-Trishina-Sv; Zorin-Vn; Babin-Luf; Trishin-Sv; Ruban-Av; Ruban-Vv; "A comparative evaluation of the efficacy of immunocorrection in children living in ecologically contrasted regions ". Lik-Sprava 1995 Jul -Aug (7-8):59-61

13.- Zhukova-EM. "Tactivin in combined treatment of patients with pulmonary tuberculosis associated with gastrointestinal diseases" Probl-Tuberk. 1995(3): 25-7

14.- Bulanova-AA; Akhanzaripov-ZA. " Immunotherapy for the treatment of acute appendicitis in children" Khirurgiia-Mosk. 1994 Aug(8): 34-6

15.- Abdulladyutov-KM; Guseva-SA. "Clinico-immunologic effect of tactivin in chronic myeloid leukemia". Gematol-Transfuziol. 1994 sep-oct; 39(5): 19-22

16.- Sarkisian-SV. "Chronic liver diseases: secondary thymic insufficiency and immunocorrection with T-activin". Klin-Med-Mosk. 1994; 72(6): 45-8

17.- Volozhin-AI; Arion-VIa; Zyrianov-GV; Krotova-SB; Sysoeva-OB. "Experimental rationale for the use of T-activin for correction of immunodeficiency in the treatment of periapical inflammation" Patol-Fiziol Fksp-Ter 1994-Apr-Jun (2): 19-20

18.- Tiurin N. A, Pushko L. V; Kusmenko L. G; Zaitseva G.P. et. al. "Uso de Tactivina en el tratamiento de asma bronquial infantil" Rev. Pediatrica 1996 (4) 46-49

19.-Boyum, A "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by combining centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation, and sedimentation at is, Sacand. J. Clin. Lab. Invest. 21 suppl. 97 (1968) 77-89

20.-Morgan-Sara J. "Cultivo de células animales " Acribia 1993 págs. 57-87

21.- Noel R. Rose; Hernan Friedman-John Fabey "Manual of clinical laboratory Immunology 1996 págs. 99-101.

22.-M. Elizabeth Davis-John T. Dingle "Inmunopharmacology of joints and conective tissue" Ed. Academe Press San Diego Ca 1994 págs.