



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

Efecto de Ribovac® (Fracciones Ribosomales y proteoglicanos de membrana) en la
activación de subpoblaciones de células mononucleadas de sangre periférica

Que presenta

Texca Tatevari Méndez López

Para la obtención del grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Director de tesis

Doctor en Biomedicina Molecular
Alain Raimundo Rodríguez Orozco

2010

Este trabajo se realizó en el laboratorio de inmunología de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH y en el laboratorio de inmunología clínica de los laboratorios clínicos SERVIMED, Morelia, Michoacán.

Director de tesis, Doctor en Ciencias, Alain R. Rodríguez Orozco. Profesor Investigador Asociado “B” de tiempo completo. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH.

Responsable del Laboratorio de Inmunología.

Comité tutorial:

Maestro en Ciencias Víctor Manuel Farías Rodríguez

División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH.

Responsable del laboratorio de Hipertensión Arterial.

Doctora en Ciencias, Martha Eva Viveros Sandoval

División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH.

Responsable del Laboratorio de Hemostasia y Biología Vasculard.

Doctora en Ciencias, Anel Gómez García

Centro de Investigaciones Biomédicas del Instituto Mexicano del Seguro Social

La Maestría en Ciencias de la salud
de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de calidad
del CONACYT

El estudiante de posgrado Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio
Chávez” recibió beca de CONACYT durante
sus estudios de Maestría

A mis padres y, a todas las personas y científicos que todos los días trabajan por la salud y la trascendencia de todos los seres humanos.

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso

Louis Pasteur

RESUMEN

ANTECEDENTES

La población mexicana presenta una alta prevalencia de infecciones recurrentes de vías respiratorias altas (IRVRA). Sin aun conocerse el efecto de Ribovac® sobre la activación de varias células inmunocompetentes, ni se ha relacionado esto con la respuesta de citocinas proinflamatorias importantes para potenciar la acción citotóxica de estas células así como su activación.

OBJETIVOS

Caracterizar el efecto de Ribovac® en la activación de células mononucleadas, así como la expresión de interleucina-6 (IL-6) por estas células.

MATERIAL Y MÉTODOS

La expresión de IL-6 de células mononucleadas en cultivo, se midió a concentraciones y tiempos variables por la técnica de ELISA, mientras que el efecto de Ribovac® en poblaciones de células mononucleadas fue analizado mediante la medición de marcadores de activación temprana y tardía por citometría de flujo.

RESULTADOS

Ribovac® tiene un efecto dependiente de dosis y tiempo de exposición en la expresión de IL-6 por células mononucleadas, las concentraciones de IL-6 fueron máximas a las 6 horas de tratamiento con Ribovac®. Asimismo, Ribovac®, tiene efecto en la expresión de marcadores de activación tardíos, en células mononucleadas, no se encontraron cambios estadísticamente significativos en la expresión de marcadores de activación temprana como lo es CD25 y CD71; lo cual podría estar relacionado con el hecho de que las células no se encuentran en estado de proliferación. Por el contrario, se encontraron cambios a las 72 horas en la expresión de los marcadores CD3 y CD19 de células mononucleadas y en la coexpresión de CD3 y CD45 con 125 µg/ml de Ribovac®.

CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que Ribovac® induce la expansión de poblaciones de linfocitos, en particular células B a las 72 horas, no se apreció un aumento en la

coexpresión de CD45 y CD19. La expansión de células T es medible en término de incrementos de conteos celulares y en la población de células B parece ser más importante el cambio hacia fenotipos efectores con mayor capacidad para producir anticuerpos. IL-6 tuvo un pico de expresión a las 6 horas de tratamiento y disminuyó con el tiempo, lo cual apoya el hecho de una autoregulación dependiente de las concentraciones de IL-6

INDICE

CONTENIDO	Página
RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	14
RESPUESTA INMUNE INNATA.....	14
RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	15
CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	16
ALGUNAS CONSIDERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL MENOR DE 5 AÑOS.....	16
TRACTO RESPIRATORIO.....	17
INFECCIONES RECURRENTE DE VÍAS RESPIRATORIAS.....	18
PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS.....	20
INMUNOESTIMULACIÓN.....	21
RIBOVAC®.....	22
INMUNOTERAPIA.....	23
RIBOSOMAS BACTERIANOS.....	23
GENERALIDADES DE CITOCINAS.....	24
INTERLEUCINA-6.....	25
GRUPOS DE DIFERENCIACIÓN.....	26
CITOMETRÍA DE FLUJO.....	27
MARCADORES DE LINFOCITOS B.....	28
MARCADORES DE LINFOCITOS T.....	28
CÉLULAS CITÓTOXICAS NATURALES (NK).....	30
MARCADORES DE CÉLULAS NK.....	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31

JUSTIFICACIÓN.....	31
HIPOTESIS.....	31
MATERIALES Y METODOS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
PRUEBAS DE LABORATORIO.....	32
PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO CELULAR.....	32
OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS.....	33
DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS MONONUCLEADAS.....	33
OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS ACTIVADAS POR RIBOVAC® Y COMPONENTES DE LA PREPARACIÓN.....	34
DETERMINACIÓN DE LOS BLANCOS CELULARES DE LA ACCIÓN DE RIBOVAC®.....	34
DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PRESENTES EN SOBRENADANTES DE CULTIVO CELULAR	35
IDENTIFICAIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS POR RIBOVAC®.....	35
VARIABLES DEPENDIENTES.....	36
VARIABLES INDEPENDIENTES.....	36
PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO.....	37
RESULTADOS.....	37

DETERMINACIÓN DE IL-6 EN SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS TRATADAS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE RIBOVAC® A DISTINTOS TIEMPOS.....	37
EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD 3 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.....	39
EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD 19 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.....	42
EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD 16 CD56 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.....	47
EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD 45 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.....	49
COEXPRESIÓN DEL MARCADOR CD 45 Y DEL MARCADOR CD 3 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.....	51
COEXPRESIÓN DEL MARCADOR CD 45 Y DEL MARCADOR CD 19 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.....	53
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES.....	56
AGRADECIMIENTOS.....	57
ANEXO1 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	59

ABREVIATURAS

SI.-Sistema inmunológico

CD-Grupo de diferenciación antigénico

IRVRA.-Infecciones recurrentes de vías respiratorias altas

Fc.- Fracción constante

IL.- Interleucina

INF.- Interferón

Ig.-Inmunoglobulina

APC.-Células presentadora de antígeno

RII.-Respuesta inmune innata

RIA.-Respuesta inmune adaptativa

PAMP's.-Patrones moleculares asociados a patógenos

LPS.- Lipopolisacarido

PNG.-Péptidoglicanos

CpG.- Dinucleotidos no metilados de Citocina-Guanina

GM-CSF- Factor estimulante de Monocitos/Macrófagos

M-CSF- Factor estimulante de Macrófagos

CFU-GM- Unidad formadora de colonias granulocitos/macrófagos

MIP- Potenciador ineficiente de Macrófagos

RANTES-Regulación de la activación, secreción y expresión de células T

MCP-1-Proteína quimiotactico de monocitos

MHC-Complejo Mayor de Histocompatibilidad

ICAM-Molécula de adhesión Leucocitaria

TNF-Factor de necrosis tumoral

IFN-Intérferon

ADCC-Citotoxicidad mediada por anticuerpos

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Correlación de los valores de la curva de calibración de IL-6.

Figura 2.- Curva de correlación de la expresión de IL-6 a CONTROL vs [31.25 $\mu\text{g/mL}$] 72hs.

Figura 3.- Conteo de células con expresión de CD3 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 4.- Curva de correlación de la expresión de células con fenotipo CD3 que presentó valor de significancia estadística.

Figura 5.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD3 que presentó significancia estadística de CD3 [125] 6h Vs CD3 [125] 72h.

Figura 6.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presentó significancia estadística de CD19 BASAL vs CD19 [62.5 $\mu\text{g/mL}$] 72h.

Figura 7.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presentó significancia estadística de CD19 BASAL vs CD19 [62.5 $\mu\text{g/mL}$] 6h.

Figura 8.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presentó significancia estadística de CD19 [62.5 $\mu\text{g/mL}$] 6h vs CD19 [125 $\mu\text{g/mL}$] 6h.

Figura 9.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presentó significancia estadística de CD19 [62.5 $\mu\text{g/mL}$] 72h vs CD19 [125 $\mu\text{g/mL}$] 72h.

Figura 10.- Conteo de células con expresión de CD19 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 11.- Expresión de IMF de células con expresión de CD19 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 12.- Conteo de células con expresión de CD16 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 13.-Conteo de IMF en células con expresión de CD16 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 14.- Conteo de células con expresión de CD45 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 15.- Conteo de IMF en células con expresión de CD45 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 16.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD45CD3 [125µg/mL] 6h vs CD45CD3 [125 µg/mL] 72h.

Figura 17.- Conteo de células con expresión de CD45CD3 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Figura 18.- Coexpresión del marcador CD45 CD19 por células mononucleadas estimuladas con Ribovac® a diferentes concentraciones y tiempos.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación de los grupos de diferenciación (CD) antigénica de las células hematopoyéticas humanas.

Tabla 2.- Diseño de los paneles de lectura, grupo de diferenciación, fluorocromo y fotomultiplicador de lectura.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones recurrentes de vías respiratorias altas (IRVRA), representan un importante problema de salud con una alta prevalencia en México y el mundo. Una de las estrategias que permiten abordar este problema es el uso de inmunoestimulantes como una opción muy efectiva ante la creciente tasa de resistencia a antibióticos o para aquellos que no responden a este tipo de tratamientos, todo esto con la intención de reducir la cantidad de infecciones recurrentes de vías respiratorias altas.

Los Ribosomas bacterianos, son acarreadores naturales de inmunogenicidad celular al ser vectores de epítomos que corresponderían a antígenos encontrados en la superficie de las bacterias, Youmans y Youmans (1965), demostraron que la antigenicidad de los ribosomas es equivalente a la producida directamente en contra de la superficie bacteriana, protegiendo al cuerpo contra bacterias casi 1000 veces más que la bacteria completa.

El uso de Ribovac® ha demostrado en estudios de metanálisis su capacidad de reducir las IRVRA por medio de la inmunoterapia ribosomal, que consiste en administrar un acarreador natural, el ribosoma, que es un vector de epítomos que corresponde también al de la superficie bacteriana, para estimular a la respuesta inmune adaptativa.

Ribovac® se compone de, un adjuvante natural que consiste de proteoglicanos de membrana (LPG) aislados de *Klebsiella pneumoniae* y fracciones ribosomales provenientes de cuatro cepas comúnmente encontradas en las vías respiratorias altas; *Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophyllus influenzae*.

ANTECEDENTES

RESPUESTA INMUNOLÓGICA

Los mecanismos de defensa que posee el organismo para controlar la agresión y la invasión de agentes infecciosos se han agrupado en tres niveles de complejidad creciente: barreras anatómicas, respuesta inmune innata (RII) y respuesta inmune adquirida (RIA). En los mamíferos se encuentran estas tres formas de defensa contra antígenos. La respuesta del hospedero a patógenos depende del sistema inmune (SI). El SI de los vertebrados superiores está compuesto por una variedad de células morfológica y funcionalmente diferentes, que se diferencian partiendo de células primordiales pluripotenciales. Todos estos tipos celulares ejercen funciones diferentes, interaccionando constantemente entre sí. Estas relaciones pueden estar mediadas por contacto físico o a través de moléculas solubles que ejercen su función en células con receptores específicos (Abbas 2007, Roitt 2001).

RESPUESTA INMUNE INNATA

La RII es un mecanismo inmunológico que se encuentra desde el nacimiento en los seres humanos y se presenta aun cuando los patógenos son reconocidos por primera vez sin una exposición previa y sin cambiar de intensidad respecto a las exposiciones posteriores. Además, desempeña funciones importantes en la inducción de la respuesta inmune adquirida (Roitt 2001).

La RII presenta elementos esenciales como:

- 1) Barreras físicas y químicas: epitelios y sustancias antimicrobianas como los péptidos naturales antimicrobianos (PNA) producidos en la superficie epitelial.
- 2) Proteínas sanguíneas: entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y mediadores de la inflamación.
- 3) Células fagocíticas y otros leucocitos tales como las células asesinas naturales (NK) y las células T no restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Lo anterior representa la primera línea de defensa para responder a la invasión de microorganismos en el cuerpo, por lo que la patogenicidad de estos últimos se relaciona en parte a la capacidad de resistir a los mecanismos de la inmunidad innata (Abbas 2002). La inmunidad innata tiene la capacidad de discriminar un microorganismo de otro, aunque su función poco específica, no genera memoria inmunológica frente a la mayoría de los agentes infecciosos (Abbas 2002).

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla cuando los agentes infecciosos no son eliminados por los mecanismos innatos de defensa y se induce debido a la presencia excesiva de antígenos y es efectiva después de varios días, tiempo que es requerido para que los linfocitos T y B reconozcan a dichos antígenos, se diferencien y se conviertan en células efectoras. (Roitt 2001, Abbas 2002).

La RIA presenta varias características distintivas como son: en comparación con la RII, la RIA representa una resistencia mucho más evolucionada, es estimulada después de la exposición a agentes infecciosos, cuya intensidad y capacidad defensiva aumenta después del último encuentro con un microorganismo en particular. Para ello la RIA consta de linfocitos B, T y sus productos entre ellos los anticuerpos, con las siguientes características:

- 1) Especificidad.
- 2) Especialización, que les permite responder de forma singular a distintos tipos de microorganismos (complejidad) a través de reconocimiento de receptores y ligandos específicos.
- 3) Su capacidad para recordar y responder con más fuerza, a los encuentros siguientes con el mismo microorganismo (memoria).
- 4) Su multifactorialidad; la respuesta inmune depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del hospedero que responde, el tipo, virulencia, cantidad o dosis del agente agresor y su vía de penetración pueden generar varios tipos de respuestas; pero también la edad y la conformación genética del hospedero pueden ser elementos determinantes.

5) Su autolimitación; todas las respuestas inmunitarias normalmente disminuyen con el tiempo después de la estimulación con el antígeno.

6) Discriminación entre lo propio y lo no propio, la falta de respuesta inmunológica también se llama tolerancia. La tolerancia frente a los antígenos propios (autotolerancia) es mantenida en parte mediante la eliminación de linfocitos que expresan receptores específicos para estos antígenos propios y en parte por inactivación de los linfocitos que han sido estimulados después de contactar con antígenos propios (Roitt 2001).

CÉLULAS DE LA RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA

Existen dos grandes tipos celulares involucrados en la inmunidad adquirida y se requieren una serie de interacciones entre ellas para que se establezcan las respuestas inmunes. Las células provienen de una célula precursora linfoide que se diferencia en distintas líneas de desarrollo. Una línea se desarrolla en el timo y se conoce como linfocito T; La otra se desarrolla en el bazo y se conoce como linfocito B. Estos dos tipos celulares se originan en la médula ósea. Las células linfocíticas T y B difieren en muchos aspectos funcionales pero comparten una propiedad importante de la RIA, son antígeno específicas (Roitt 2001).

Todos estos componentes en conjunto forman los dos tipos de RIA que se conocen como la RIA celular y la RIA humoral y que interactúan en un sentido de retroalimentación.

ALGUNAS CONSIDERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL MENOR DE 5 AÑOS

El desarrollo del sistema inmune es un proceso progresivo desde el período del nacimiento hasta la maduración aproximadamente a los 7 años. Durante los primeros años de vida los niños pueden presentar infecciones bacterianas ocasionales y hasta 6 episodios anuales de infecciones respiratorias altas de etiología viral. Estas pueden incrementarse aún más por la asistencia al círculo infantil y por la presencia de hermanos mayores que asisten a instituciones infantiles o a la escuela. Los niños al nacer presentan una protección que le brinda la madre

por la inmuno globulina G (IgG) materna que atraviesa la placenta. Esta IgG materna disminuye sus valores entre los 3 y 5 meses, lo cual se conoce como hipogammaglobulinemia transitoria del lactante (Maródi L.2006). Al año de edad, la inmunoglobulina A (IgA) alcanza solo el 20 % del valor que alcanzan los adultos, mientras que la inmunoglobulina M (IgM) a esta edad tiene los mismos valores que en la adultez (Robaina 2003). Un aspecto importante es que entre los 18 y 24 meses se alcanza la respuesta inmune con capacidad de memoria a antígenos polisacáridos, como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b (Maródi 2006). Es por esto que las vacunas conjugadas con proteínas permiten obtener una respuesta inmune adecuada desde los primeros meses de vida y conferir protección para estas infecciones (Robaina 2003).

Por la alta frecuencia de infecciones respiratorias altas en los primeros años de vida este subgrupo de niños pueden beneficiarse mucho con el uso de inmunoestimulantes.

TRACTO RESPIRATORIO

El sistema respiratorio está constituido por las vías respiratorias altas o superiores -la nariz y la faringe- y las vías respiratorias bajas o inferiores, constituidas por la laringe, la tráquea, los bronquios y los pulmones.

Las vías aéreas superiores juegan un papel crucial en la fisiología respiratoria. Ellas filtran las partículas inhaladas en función de su tamaño, densidad y características físicas. Se plantea, en teoría, que las partículas menores a 10 μm (como la mayoría de los gérmenes patógenos) pueden pasar esta defensa física, lo cual no suele ocurrir en condiciones fisiológicas adecuadas. La nasofaringe presenta formaciones, como las amígdalas y las adenoides, con capacidad para activar mecanismos inmunológicos de defensa. Ellas son parte del sistema linfoide defensivo del organismo. Existen otros mecanismos reflejos como el estornudo y la tos, que permiten la eliminación de gran cantidad de secreciones y microorganismos que se depositan en la nasofaringe. Otro mecanismo de defensa importante lo constituye el sistema mucociliar, formado por el epitelio ciliar, que tapiza la vía aérea desde la nariz hasta los bronquiolos; y por el moco, que recubre a los cilios y que es

secretado por las células caliciformes y las sub-mucosas del epitelio de la vía aérea. Los cilios transportan al moco que contiene las partículas inertes o biológicas atrapadas hacia la laringe para su deglución, exhalación o expectoración (Tortora 2002).

La disfunción de algún componentes del sistema respiratorio, origina una disminución del aclaramiento del moco y permite que las bacterias que en él se encuentran, prolonguen el tiempo de contacto con el epitelio respiratorio, creándose condiciones favorables para la colonización bacteriana de las vías aéreas (Tortora, 2002).

INFECCIONES RECURRENTE DE VIAS RESPIRATORIAS

Las infecciones respiratorias agudas constituyen la primera causa de consultas médicas y de morbilidad, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Los niños menores de 5 años tienen algunas características fisiológicas e inmunológicas que los hacen más susceptibles para presentar estas infecciones (Álvarez Castelló *et al.* 2008). A pesar que las infecciones agudas de las vías respiratorias bajas concentran habitualmente la atención por su mayor complejidad, costo del tratamiento y complicaciones, son las infecciones de las vías respiratorias altas las que se presentan en mayor número en la consulta ambulatoria. Estas últimas representan un importante problema de salud por la frecuente asistencia a la consulta médica y emergencias que generan, así como por la carga de ansiedad que se genera en los familiares de los niños con infecciones respiratorias recurrentes (Robaina-Suárez y Campillo-Molieva 2003).

De forma habitual, la superficie del epitelio de la orofaringe es colonizado por un número limitado de especies bacterianas. Solo las bacterias que poseen sistemas específicos de adhesión al epitelio pueden establecer una colonización duradera (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*). Otras especies bacterianas como *Pseudomona aeruginosa*, precisan que el epitelio esté previamente dañado para poder adherirse a él (Townen 2005, Alvarez MC *et al.* 2008, Span *et al.* 2008). El daño al epitelio de las

vías respiratorias es favorecido por situaciones como el empleo de antibióticos, las enfermedades crónicas debilitantes, la desnutrición, las inmunodeficiencias, la exposición a irritantes como el humo del tabaco, así como la deficiencia o inmadurez del sistema inmunológico, la deficiencia de hierro, la contaminación ambiental, la atopia, entre otros, que suponen una agresión a las defensas de las vías superiores y facilitan la colonización crónica, (Broide et al. 2008, Span et al. 2008).

Las estadísticas del Sector Salud en México muestran que para 2005, las Infecciones Recurrentes de vías Respiratorias (IRVRA) representaron la octava causa de muerte en niños menores de un año, mientras que en poblaciones de niños de 1 a 4 años se encuentra en el lugar 17 de las 20 principales causantes de muerte (Hernández-Cadena et al. 2007, Maródi, 2006). Aunque en las estadísticas de morbilidad del Sector Salud las infecciones de vías respiratorias altas no son la principal causa de mortalidad, si lo son en la atención primaria de salud. En los umbrales del siglo XXI, los niños de América aún mueren en proporciones alarmantes por causas prevenibles con medidas relativamente simples. Más de 140, 000 niños menores de 5 años mueren anualmente por neumonía en nuestra región; cada 8 segundos fallece un niño por infecciones recurrentes de vías respiratorias altas (IRVRA) y esto constituye la primera causa de consulta y hospitalización en edades pediátricas. Estas cifras por sí solas hacen comprender la necesidad de programas para el control de las IRVRA (Robaina-Suárez y Campillo-Molieva 2003).

Las IRVRA en su mayoría tienen evolución favorable y ayudan a desarrollar el sistema inmunológico de los niños, aunque para la familia representan motivo de preocupación y ansiedad (Robaina-Suárez y Campillo-Molieva 2003, Álvares Castelló et al. 2008). Un paciente tiene infecciones recurrentes cuando presenta una mayor frecuencia de infecciones que las correspondientes para su edad y medio ambiente. El número de infecciones no establece diferencias entre el desarrollo inmune normal y las causas predisponentes o inmunodeficiencias, de modo que es fundamental la historia clínica y el examen físico completo que orienten el diagnóstico y estudio de cada paciente (Karevold et al. 2006). En muchos niños, la repetición de estos procesos no es más que una manifestación de la atopia. Para algunos autores, los niños presentan entre 7 y 10 episodios de IRVRA por año, que

son en su mayoría, leves y auto limitadas, pero representan un trabajo enorme para los servicios de salud (Álvares Castelló et al. 2008, Schilder GM. 2005).

Un grupo de niños, especialmente los que poseen factores de riesgo, pueden cursar hacia una neumonía o una enfermedad más grave, la cual aumenta la posibilidad de muerte y requiere atención hospitalaria. Dentro del grupo nosológico de IRVRA se pueden enlistar: la otitis media aguda, la amigdalitis y faringoamigdalitis, la rinosinusitis adenoiditis y la sinusitis. Uno de los representantes de este tipo de enfermedades es el resfriado común o nasofaringitis (rinosinusitis aguda), que se caracteriza por ser una infección viral de la mucosa de las vías respiratorias altas (West 2006).

Los microorganismos vinculados con más frecuencia con las infecciones respiratorias son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pyogenes* (Townen 2005, Span et al. 2008). El tratamiento que suele administrarse para combatir a estas bacterias es sintomático y de corta duración. El resfriado es habitualmente auto diagnosticado y auto atendido. Sin embargo, también las IRVRA son mal diagnosticadas por el profesional de la salud y en su caso atendidas con antibióticos sin necesidad de estos por lo que el fenómeno de resistencia a antibióticos es común (Townen 2005). En los Estados Unidos de Norte América se estima una incidencia de 1000 millones de casos de infecciones recurrentes de vías respiratorias altas y un gasto total en mil millones de dólares (West 2006, Schilder 2005).

PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS

Los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP's) se definen como productos moleculares altamente conservados de los microorganismos patógenos y no patógenos que forman partes esenciales en la supervivencia de estos (Jenaway 1989, Bianchi MB 2007). Los PAMP's han mostrado ser importantes activadores de la Respuesta inmune Innata (RII) y la Respuesta Inmune Adaptativa (RIA) y están involucrados en trastornos sistémicos inmunológicos.

Algunos tipos de PAMP's son moléculas como el lipopolisacárido (LPS, producto de bacterias gram-negativas), peptidoglicanos (PGN) y zimosan (productos de bacterias gram-positivas y levaduras respectivamente), dinúcleotidos de DNA no metilados de citosina y guanina (DNA CpG, originario de bacterias y virus) (Banerjee *et al.* 2004), RNA de cadena doble (producto viral), flagelina (una proteína bacteriana (Uthaisangsook *et al.* 2002)), entre otros. Se ha descubierto que ciertos receptores de la respuesta inmune innata están íntimamente involucrados en el reconocimiento de partes de bacteria o de la bacteria completa (Hoffmann *et al.* 1999). El sistema inmune a través del reconocimiento de los PAMPs distingue microorganismos propios de los potencialmente infecciosos (Metzhitov *et al.* 2000). Las mutaciones o la pérdida de función de estas moléculas pueden ser letales para los microorganismos, por lo tanto es esencial mantener una tasa de mutación baja, y es difícil que alteren su conformación básica; por último estos patrones moleculares son invariables entre microorganismos de la misma clase (Janssen 2003). Sin embargo, para evitar la detección de estos PAMPs por los macrófagos, algunas bacterias modifican su superficie; es el caso de las bacterias gram-negativas que alteran su estructura de LPS durante una infección y evitan su reconocimiento por receptores (Rossenberg 2003). Gracias a la caracterización de los mecanismos de interacción de los microorganismos y las moléculas y células del sistema inmune, es que se han comenzado a utilizar los PAMP's y otros productos microbianos con la intención de modular la respuesta inmune del humano contra enfermedades, tales como las infecciones respiratorias (Bianchi MB 2007).

INMUNOESTIMULACIÓN

En el año de 1965 se inició el estudio del efecto de las fracciones ribosomales en la estimulación inmunológica, con el trabajo de Yumans y Yumans (Yumans 1965). En la década de los noventa se registró el mayor número de estudios sobre extractos de algunas bacterias y su repercusión en la salud de diferentes grupos de población (Kim *et al.* 1996, Bellanti *et al.* 2003).

La inmunoestimulación es una opción de inmunoterapia antiinfecciosa (Michel FB *et al.* 1978, Bellanti J. *et al.* 2003, Casale T *et al.* 2008). Un ejemplo de inmunoestimulantes de origen bacteriano son los dinucleotidos no metilados de

citocina guanina (CpG) que han sido utilizados como probióticos y que dentro de algunos de sus efectos, han mostrado reducción en el número de eventos de enfermedad respiratoria en pacientes (Banerjee B *et al.* 2004, Kllne,*et al.* 2007).

RIBOVAC®

El Ribovac® es un inmunoestimulante ribosomal compuesto de extractos ribosomales de cuatro bacterias (*Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophyllus influenzae*) (Varela *et al.* 2004) y de una cubierta de proteoglicanos (Donnelly *et al.*1990). Se ha considerado también que son adyuvantes naturales los proteoglicanos de membrana, aislados de *Klebsiella pneumoniae*, que están presentes en Ribovac® y que potencian la inmunogenicidad de las fracciones ribosomales. Además, los proteoglicanos poseen incluso muchas propiedades inmunoestimulantes (Donnelly JJ.1990). Ribovac® está diseñado para proteger al organismo de infecciones del oído, nariz, garganta o broncopulmonares.

Ribovac® se basa en las propiedades inmunogénicas de los ribosomas bacterianos (Faure *et al.* 1990) y las propiedades inmunoestimulantes de las fracciones membranales (Michel *et al.* 1978). Los ribosomas bacterianos son la sede principal del poder inmunógeno de la bacteria. (Pauper 1990, Vautel *et al.* 1993). A la fecha, se cuenta con reportes de estudios doble ciego en metanálisis (de la Torre *et al.* 2005), que demuestran la reducción en número y gravedad de infecciones respiratorias en pacientes que reciben inmunoterapia ribosomal en el control de enfermedades de vías respiratorias altas (de la Torre *et al.* 2005, Bousquet *et al.*2006, Bousquet y Fiocchi 2006).

INMUNOTERAPIA

Algunos de los tratamientos potenciales o estrategias para reducir el número y costo de las IRVRA se basa en el uso de bacterias y extractos de bacterias para la inmunoterapia (Nelson *et al.* 2005, Akdis 2007), que está teniendo un desarrollo importante gracias a descubrimientos en los cuales, las moléculas originarias de los

microorganismos pueden ser reconocidas por receptores muy específicos expresados en diferentes estirpes celulares (Clot. 1997, Bocaccio, *et al.* 2002), lo que activa rutas de señalización involucradas en la respuesta celular. Esto ha generado una nueva era de inmunoterapia, en la que se usan moléculas miméticas de sus originales en bacterias (Bocaccio, *et al.* 2002, Arthur 2003) o se utilizan fracciones inmunogénicas derivadas de microorganismos.

RIBOSOMAS BACTERIANOS

Los ribosomas bacterianos, con ayuda de los proteoglicanos de membrana, tienen un efecto inmunoestimulante específico y no específico; actúan en forma simultánea sobre diversos sistemas inmunológicos del cuerpo movilizándolo todas las defensas y combatiendo la infección (Michel *et al.* 1978, Bellanti *et al.* 2003). Los ribosomas son productores naturales de inmunogenicidad celular y son vectores de epítomos que corresponderían a antígenos encontrados en la superficie de las bacterias (Bellanti *et al.* 2003). Los ribosomas son altamente conservados a través de las especies de microorganismos y por lo tanto es posible que se presente una protección cruzada entre diferentes serotipos.

La antigenicidad de los ribosomas es equivalente a los producidos directamente en la superficie bacteriana, protegiendo al cuerpo contra bacterias. Sin embargo, su administración ha sido más empírica, ya que sus bases inmunológicas y clínicas no han sido muy difundidas. La prevención es decisiva en virtud de la importancia de romper los ciclos de contagio en las poblaciones; esto es particularmente útil contra microorganismos con altos índices de mutaciones como el virus de la influenza; (Quezada 1999).

En un metaanálisis reciente se calculó el efecto en la reducción del número de infecciones respiratorias agudas respecto al grupo con placebo. Sólo D53 (Ribovac®, Ribomunyl) y OM-85, en México, demostraron tener efecto significativo en la reducción del número de infecciones respiratorias agudas (de la Torre *et al.* 2005, Paupe 1991, Fioochi *et al.* 2009). Es deseable que las preparaciones terapéuticas basadas en ribosomas bacterianos sean acarreadores de epítomos

específicos para estimular la producción de anticuerpos específicos, y sean adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad.

GENERALIDADES DE CITOCINAS

Las citocinas son proteínas conocidas como factores solubles no antígeno específicos que son producidos por células inmunocompetentes e intervienen en la regulación de las funciones de las células del sistema inmune y en los procesos inflamatorios. Estas moléculas están implicadas en las respuestas frente a agentes infecciosos, pero en ocasiones pueden ser responsables de procesos patológicos, como la inflamación crónica, la coagulación intravascular diseminada y el shock. Las citocinas se han agrupado en familias según su estructura, funciones y células que las producen. Algunas de las familias más estudiadas son, las interleucinas (IL), las linfoquinas, los interferones, las monocinas y las quimiocinas. Las citocinas ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y la recirculación de los leucocitos. Las citocinas originariamente se definieron por las actividades biológicas que eran capaces de promover en distintos ensayos *in vitro*. Posteriormente estas diversas actividades se fueron asociando a una determinada citocina a medida que fue conociéndose su secuencia de aminoácidos.

Las citocinas factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interferón alfa ($IFN\alpha$) e interferón beta ($IFN\beta$) son mediadoras de la inmunidad natural y del reclutamiento linfocitario necesario para la respuesta inmune específica. Las respuestas inmunes específicas requieren de la activación y proliferación de los linfocitos T que son estimuladas por la IL-2 y la IL-15. Las respuestas inmunes específicas se han dividido clásicamente en función de los mecanismos efectores implicados en respuestas mediadas por células y en respuestas humorales. Las citocinas participan en la determinación de estos dos tipos de respuesta inmune. Las respuestas mediadas por células requieren que los linfocitos CD4 proinflamatorios estimulen el crecimiento y la diferenciación de linfocitos T citotóxicos, así como la activación de los macrófagos. La acción proinflamatoria de estos linfocitos es estimulada por la producción de las citocinas IL-12, IL-16, $IFN\gamma$ y

TNF β . En las respuestas mediadas por anticuerpos, los linfocitos T CD4 cooperan con los linfocitos B estimulando su proliferación y diferenciación hacia células productoras de inmunoglobulinas. La acción cooperadora de los linfocitos CD4 para promover en células B la producción de anticuerpos es estimulada por las citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y IL-14. Se han reportado resultados en los que se involucra a la administración de Ribovac[®] y a la estimulación y producción de estas citocinas (Pujol et al. 1991, Bystron et al. 2004).

INTERLEUCINA 6

La IL-6 es una citocina pleiotrópica producida por una grandísima variedad de células, tiene funciones tan diversas desde la diferenciación de células T y B (Walter et al. 1996) hasta formar parte muy importante en el proceso inflamatorio (Gabay 2006). La expresión de IL-6, depende de secuencias de genes localizados en el cromosoma 7p21 y consta de cinco 5 exones y cuatro intrones (Walter et al. 1996). En el proceso de traducción sufre modificaciones que son tejido específicas tales como fosforilaciones y glicosilaciones, las cuales influyen fuertemente en su actividad biológica. La molécula de IL-6 es secretada como una secuencia heterogénea de proteínas, que varían de 19 a 70 kD, las formas más comunes son las de 23 a 30 kD (Walter et al. 1996).

La expresión del mRNA de IL-6 es constitutiva en muchos subtipos celulares unos fluyendo en la sangre periférica en los leucocitos, y otros en células de tejidos tales como bazo, hígado, y los intestinos, aunque realmente la IL-6 es expresada por prácticamente todos las poblaciones y subpoblaciones de células inmuno competentes de un individuo sano, entre las que destacan células T, B, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células endoteliales, enterocitos, astrocitos, etc (Henrich et al. 1990). La expresión basal de IL-6 aumenta debido a muchos estímulos, siendo algunos, la presencia de LPS, IL-1, TNF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el interferón, el factor de crecimiento transformante- β , así como la proteína cinasa C (PKC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y otros virus (Henrich et al. 1990).

La IL-6 es muy importante durante la hematopoyesis al ser producida por tejidos específicos o dañados. En el momento en que la IL-6 es reconocida por un receptor, se comienza una ruta de señalización específica que termina por afectar a la célula en la expresión de moléculas específicas (Simon 2005).

GRUPOS DE DIFERENCIACIÓN

Los grupos de diferenciación son moléculas dispuestas en la superficie de las células que ayudan a caracterizar su inmunofenotipo, a reconocer estirpes celulares, grado de activación y nivel de la ontogenia en que se encuentran (Sampola-Lainz y, López 1992). Los antígenos de diferenciación, permiten ubicar a la célula en: estados de diferenciación tales como, virgen (no estimulada), células de memoria y células activadas. Algunos de los marcadores de activación más frecuentes se muestran en la tabla 1.

ESPECIFICIDAD CELULAR	NÚMERO DE GRUPOS DE DIFERENCIACIÓN DESCRITOS	CD-CORRESPONDIENTE
Linfocitos T	12 CD	CD1-CD3-CD8,CD25 CD27- CD29,CDw60
Linfocitos B	17 CD	CD19-CD24,CD37-CD40 CD72-CDw78
Células NK y linaje no específico	20 CD	CD11a-CD11b-CD11c CD16-CD18-CD32-CD43- CDw50-CDw52-CD56-CD59

Tabla 1, Clasificación de los grupos de diferenciación (CD) antigénica de las células hematopoyéticas humanas; modificado de: (Sampola-Lainz A 1992).

CITOMETRIA DE FLUJO

Es la técnica que más información brinda sobre poblaciones y sub poblaciones celulares. La suspensión celular se hace circular en forma de gotas microscópicas, las cuales pasan por un campo de detección atravesado por un potente rayo láser que produce la dispersión de la luz y la activación de la fluorescencia. Mediante sensores específicos se analizan y cuantifican las poblaciones en estudio en función de sus propiedades fisicoquímicas y del marcaje efectuado. Para la separación celular, este aparato lleva acoplado un sistema que carga eléctricamente las células y con placas deflectoras se realiza su separación por inmunofluorescencia (Brown 2000).

Además de basarse en la detección de la fluorescencia emitida por las células marcadas, también lo hace en otras propiedades diferenciales de las células en estudio como tamaño (FSC) y complejidad (SSC), lo que incluye el estudio de sus gránulos. Las moléculas expresadas por la célula pueden ser reconocidas por anticuerpos monoclonales los cuales son llamados grupos de diferenciación del inglés (CD), al cual se le asigna un número único para un tipo de molécula. Todas las células expresan CD's, esto depende de su grado de activación o estado de diferenciación. La señal producida como consecuencia de la excitación del fluorocromo, permite conocer el porcentaje de células reconocido por el anticuerpo monoclonal empleado. Como consecuencia, se observan imágenes en dos dimensiones (Dot-Plot) o en una dimensión (Histograma), en las que se distinguen las diferentes poblaciones celulares marcadas (Brown y Wittwer 2000).

La puesta a punto de las técnicas de citofluorimetría, en las que se conjuga los avances de informática, rayos láser y anticuerpos monoclonales permite el análisis fenotípico y funcional de las células T, B y de todas aquellas células de las que se disponga de un anticuerpo que las identifique.

MARCADORES DE LINFOCITOS B.

Para cuantificar los linfocitos B totales se utiliza el marcador CD19. Por otro lado, en los linfocitos B activados se pierde la expresión de las moléculas CD21, CD22 y CD24, hay un incremento en la expresión de moléculas HLA-DR y de receptores de linfocinas (por ejemplo el receptor de la IL-2) y aparecen marcadores nuevos, como el CD23, ausente en linfocitos B en reposo.

El marcador CD19 es una proteína de 90 kD. expresada por todas las células B. Su función principal radica en la activación de células B, las cuales tienen su origen en células progenitoras de médula ósea. En estadios de diferenciación temprana se caracterizan por la presencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) y CD19 (Stamenkovic 1988, Shinichi *et al.* 1995). Este desarrollo celular está específicamente regulado por las señales de transducción generadas por el complejo de superficie CD19-CD21. CD19 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, importante regulador en la diferenciación de las células B en células plasmáticas, caracterizándose por ser un dominio citoplasmático de aproximadamente de 240 amino ácidos. Su función es como proteína adaptadora específica en la amplificación de la familia Src cinasa así como molécula de interacción para múltiples rutas de señalización cruciales al modular las señales producidas por antígenos (Hasegawa *et al.* 2001).

MARCADORES DE LINFOCITOS T

Los marcadores CD3, CD4 y CD8 están presentes en linfocitos T totales y en las subpoblaciones de células T colaboradoras y citotóxicas/supresoras, respectivamente. En el proceso de activación de células T se expresan nuevas moléculas de superficie, son principalmente receptores para factores de crecimiento y proliferación celular.

Durante la activación de linfocitos T, tanto *in vivo* como *in vitro* se induce la expresión de CD69. Esta molécula, es una glicoproteína inducible en la superficie celular que aparece temprano durante la activación linfocitaria, y está involucrada en la proliferación de linfocitos, es un receptor de transducción de señales en linfocitos, células NK y plaquetas.

Entre los antígenos de activación expresados en la superficie celular se incluyen: a) *receptores de interleucinas* (como la molécula CD25 que corresponde a la cadena p55 del receptor de la IL-2); b) *receptores de la insulina y de la transferrina* (CD71); c) *antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II*, que no están presentes en linfocitos T en reposo; y d) una gran variedad de moléculas de superficie, cuya función no es totalmente conocida (por ejemplo, CD26, CD29, VLA-2, CD69).

El marcador CD3 se caracteriza por poseer un peso molecular de γ : 25-28 kDa; δ : 20 kDa, ϵ :20 kDa. Su naturaleza bioquímica lo encuadra dentro de la familia de las inmunoglobulinas (Weissman et al. 1988). Su función biológica en la célula es intervenir en la transducción de señales, en la expresión del TCR en la superficie de la célula y en la asociación a este último receptor. Se expresa específicamente en timocitos y células T (Hayes et al.2002, Gharehbaghian et al. 2006).

El marcador CD25 es la cadena alfa del receptor de IL-2, de 55 kD. El marcador TAC es una proteína transmembranal de tipo 1. Está presente en células T, B y macrófagos activados. Forma complejos con el receptor de IL-2R $\beta\gamma\epsilon$ de alta afinidad. Está involucrado en la expansión de células T (Shevach 2002, Kuniyasu et al. 2000, Toda y Piccirillo 2006) Los linfocitos T CD25+, son reguladores de las células NK(Ralainirina et al. 2007).

El marcador CD71 es una glicoproteína de 95 kDa con un dominio terminal de unión a hierro. Es expresado principalmente por células T y B activadas, tanto como por macrófagos y células en proliferación (Brekelmans et al. 1994). Su función principal lo involucra en el metabolismo del hierro, así como en la proliferación celular (Brekelmans et al. 1994, Moura et al. 2001).

El marcador CD45 es una glicoproteína transmembranal mejor conocida como “antígeno común leucocitario” (Charbonneau et al.1988). Presenta múltiples isoformas que van de 180 a 220 kDa. Al activarse inicia la transducción de señales por la vía de la tirosina fosfatasa (Ledbetter et al. 1988, Alexander 2000). Cubre el 10% de la superficie celular y es esencial en el correcto desarrollo de células B y T (Huntington y Tarlinton 2000).

CÉLULAS CITÓTOXICAS NATURALES (NK)

Las células NK o asesinas naturales, se desarrollan en la médula ósea a partir de una célula progenitora común de origen linfoide y circulan por la sangre. Son más grandes que los linfocitos B y T, tienen gránulos citoplasmáticos distintivos, se identifican por su habilidad de matar *in vitro* a ciertas líneas celulares linfoides que son tumorales, todo esto previo a la inmunización o la activación. Las células NK son activadas como respuesta a interferones o citocinas producidas por macrófagos. En la fase temprana de la infección protegen al huésped de una gran variedad de patógenos intracelulares. Las células NK tienen un mecanismo de reconocimiento para distinguir entre células infectadas y no infectadas, se cree que un mecanismo probable es que reconocen alteraciones en la expresión del HCM I. Otro mecanismo podría ser los cambios en las glucoproteínas de la superficie celular inducidas por bacterias o virus en la infección; sin embargo, aún no está claro su sistema de reconocimiento entre lo propio y lo no propio (Abbas 2002, Roitt 2001).

MARCADORES DE CELULAS NK

Las células NK constituyen la tercera estirpe de células de tipo linfoide. Carecen de TCR y de Ig y en su mayoría, expresan en superficie las moléculas FcγR-III (CD16) y CD56, que junto con otros marcadores, definen a este grupo celular (Andre.*et al.* 2001) La detección de algunos de estos marcadores puede ser variable, definiéndose varias subpoblaciones NK, tales como células muy positivas para CD56 (CD56 bright), muy poco positivas para este marcador (CD56^{dim}), o células CD16⁺ CD56⁺ o CD16⁻CD56⁺, etc. Las células NK se encuentran en sangre, bazo y médula ósea y en muy baja proporción en ganglios linfáticos.

El marcador CD16 es una proteína transmembranal perteneciente a la super familia de las Ig. y tiene un peso de 50-70 KDa. Es producida por las células NK y macrófagos. Su sitio de unión es la porción Fc de la IgG de baja afinidad. Es importante en la fagocitosis y en la ADCC y algunas sub poblaciones que son CD16⁺-CD3⁻ pueden ser caracterizadas en sus funciones particulares (Moretta *et al.*1990).

El marcador CD56 es un heterodímero de cadenas de 135 y 220 kDa, producido por las células NK. Esta proteína está involucrada en la adhesión homotípica y es una isoforma de la molécula de adhesión celular neural (N-CAM). Se ha demostrado que la sub-población de células NK CD3⁻ CD56⁺ se expande y prolifera al recibir estímulos como el del LPS (Goodier y Londei 2000, Campbell *et al.* 2001).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones respiratorias son la principal causa de consulta en edades pediátricas. Dentro de esta población, existe un grupo de niños que no responden al tratamiento con antibióticos y las infecciones recurren en periodos cortos. En estos niños es necesario usar inmunoestimulantes como Ribovac® para reducir el número de infecciones así como reducir los costos de la terapia y disminuir el número de visitas a los servicios de urgencias. Sin embargo, aun no se conoce el efecto de Ribovac® sobre la activación de varias células inmunocompetentes, ni se ha relacionado esto con la respuesta de citocinas proinflamatorias importantes para potenciar la acción citotóxica de estas células.

JUSTIFICACIÓN

Resulta importante desde el punto de vista clínico-farmacológico evaluar los mecanismos de la respuesta inmune celular inducidos luego de la administración de Ribovac® a fin de identificar los blancos celulares de esta respuesta y su impacto sobre la actividad efectora de células inmunocompetentes.

HIPÓTESIS

Ribovac® induce el aumento en la expresión de IL-6 por células mononucleadas en cultivo, la cual está asociada a la proliferación y/o activación de poblaciones de linfocitos T, B y NK.

MATERIALES Y METODOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta celular inducida por Ribovac® en células mononucleadas de sangre periférica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estandarizar el ensayo de estimulación de células mononucleadas con concentraciones variables de Ribovac® para obtener sobrenadantes de los cultivos.
- Estudiar el efecto de Ribovac® sobre la síntesis de IL-6
- Evaluar el efecto de Ribovac® sobre la activación de células inmunocompetentes.

PRUEBAS DE LABORATORIO

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO CELULAR.

- Medio RPMI 1640 (producido por Roswell Park Memorial Institute) con L-glutamina.

Modo de preparación: Se adquirió el medio de cultivo RPMI1640 en un contenedor de 5L de la marca comercial Invitrogen, adicionado con L-Glutamina Se agregó antibiótico en solución al medio (200 µL de Gentamicina [160 mg/2 mL]/Litro). El medio se guardo a 4 °C en un recipiente estéril. La preparación de este medio se realizó en campana de Bioseguridad Clase II.

- Suero Fetal de Bovino Inactivado.

Se inactivó el suero de bovino previamente filtrado (filtros milipore de 0.22) en baño maría a 55 °C/30 minutos, para desnaturalizar las proteínas del complemento.

- Solución de RPMI + SFBI 10%.

En un tubo cónico estéril de 50 mL se depositaron 45 mL de medio RPMI 1640 y se agregarán 5 mL de SFBI inactivado, esta mezcla se agitó en un agitador vortex. Para su uso en cultivos celulares se esterilizaron por medio de filtros milipore de 0.22 µc.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS

El aislamiento de células mononucleadas (MN) se realizó por el método de separación en gradiente con Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), con gradiente de densidad de 1.077. Las células totales obtenidas de 10 mL de sangre periférica de donantes se depositaron en tubos con anticoagulante (EDTA), se mezclaron cuidadosamente y se pasaron a un tubo cónico de 50 mL, el cual contendrá 10 mL de la solución de medio RPMI 1640 + SFBI 10%. Posteriormente, la mezcla se adiciono a una solución 1:2 de Ficoll-hypaque (10 mL). El tubo cónico se centrifugo a 2500 rpm durante 30 minutos a 4 °C en centrifuga refrigerada Eppendorf 5804 R. El Ficoll tiene un gradiente de densidad igual al de células MN (linfocitos T, linfocitos B, monocitos y células NK) pero menor que los eritrocitos y granulocitos. Los eritrocitos y polimorfonucleares formaron una pastilla en el fondo del tubo, mientras que las células MN quedaron en la interfase del medio y el Ficoll. Las células MN se separaron con ayuda de una pipeta pasteur o micropipeta de 1 mL, pasándose a otro tubo cónico donde fueron lavadas 2 veces con 10 mL de solución PBS) y por último fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos para su posterior utilización. La suspensión celular se ajustó a una concentración final de 1×10^6 cel/mL en un hemocitómetro (Cámara de Neubauer).

Nota: Toda la preparación de la obtención y separación de células mononucleadas se realizó en campana de Bioseguridad, Clase II.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS MONONUCLEADAS

Para evaluar la viabilidad de las células MN se usó el método de exclusión de azul de tripano al 4%. Esta prueba refleja la integridad de la membrana plasmática, ya que colorantes como el azul de Tripano no permean a través de la membrana íntegra en las células vivas. La solución de este colorante se realizó pesando 4 g de azul de tripano que se disolvieron en 100 mL de agua bidestilada estéril. Para la realización del ensayo se colocaron 20 μ L de la suspensión celular en el hemocitómetro, se agregaron 20 μ L de azul de tripano al 4% y se observó al microscopio óptico a 10x. Se determinó la viabilidad celular en un hemocitómetro por

el porcentaje de células teñidas de azul (viables) contra el porcentaje de células no teñidas (no viables). Se aceptó una viabilidad celular $\geq 95\%$.

OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS ACTIVADAS POR RIBOVAC® Y COMPONENTES DE LA PREPARACIÓN

Las células MN se sembraron en cajas estériles de 96 pozos (Sarstedt, Inc. Newton, NC, USA), a 2×10^5 células/100 μ L por pozo en medio RPMI-1640 completo. Las células se trataron con un volumen de 20 μ L/pozo de la presentación comercial de Ribovac®. Las células se incubaron durante 4h, 6h y 72 horas a 37°C con atmósfera de CO₂ al 5% en una incubadora de la marca SHEL LAB. A cada pozo se le adiciono 80 μ L de RPMI 1640 + SFBI al 10% como fuente de nutrientes. El control negativo consistió en células MN a 2×10^5 células/100 μ L pozo no tratadas con Ribovac®. y 100 μ L de RPMI 1640 + SFBI al 10% como fuente de nutrientes. Por último, se recolectaron los sobrenadantes del cultivo celular a las 6 y 72 hrs. en tubos para centrifuga de 1 mL.

DETERMINACIÓN DE LOS BLANCOS CELULARES DE LA ACCIÓN DE RIBOVAC®

Se obtuvieron 10 mL de sangre heparinizada proveniente de donantes sanos adultos. Se aislaron células mononucleadas en gradientes de Ficoll-Paque premium (d=1.077). Se estimularon las células con Ribovac®. El control negativo no llevó estímulo. Las células se incubaron con 95% de humedad y 5% de CO₂ y se estudió a las 4 y 6 horas, el efecto de las fracciones ribosomales se identificaron en citometría de flujo con los siguientes marcadores:

CD3/CD16 & CD56 CAT CIM2076 Exp. Beckman Coulter Inc. Fullerton CA. USA..

CD3/19/45 FITC/PE/PECy5 50t OC CAT CIM 1671 Exp. Beckman Coulter Inc. Fullerton CA. USA.

CD71 G1 FITC 100TEST-ASR CAT CIMO483 Exp. Beckman Coulter Inc. Fullerton CA. USA.

CD25-PC5 100t ASR CAT CIM 2646U Exp. Beckman Coulter Inc. Fullerton CA. USA.

El efecto de Ribovac® sobre la proliferación de células mononucleadas se midió a las 72 horas de cocultivo de estas con las fracciones ribosomales de Ribovac® por citometría de flujo y se determinó IL-6 en sobrenadantes de cultivo.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PRESENTES EN SOBRENADANTES DE CULTIVO CELULAR

Se determinaron mediante ELISA los niveles de expresión de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas con Ribovac®, en tiempos de incubación de 4h, 6h, 24h y 72h. Se utilizaron Kits de ELISA de la marca BIOSOURCE (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, USA. Se colocaron 100µL de Muestra, 100µL Satandart Diluent Buffer y 50µL de Biotilinato anti-IL6, en cada uno de los pocillos de la placa de ELISA, se dejaron incubar durante dos horas a temperatura ambiente en una cámara oscura, posteriormente fueron realizados cuatro lavados, con la solución de lavado, después de estos se le agregaron 100µL Estreptavidin –HRP 30 y 100µL cromógeno para dejarse incubar durante 30 min. Posteriormente se llevó a un espectrofotómetro para lectura de placas de ELISA.

Los valores de absorbancia fueron convertidos en valores de [pg/mL]; esto se realizó por medio de un análisis de correlación lineal con los valores obtenidos de la curva de calibración estándar, al obtener la ecuación de la pendiente, por lo que es posible convertir los valores de absorbancia en valores de [pg/mL].

IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS POR RIBOVAC®

Las sub-poblaciones de células mononucleadas estimuladas por Ribovac® se identificaron con un citómetro de flujo EPICS Xcl. Los resultados obtenidos con esta técnica fueron analizados con el programa WIN MDI 2.8, con el cual se analizaron las sub-poblaciones de células mononucleadas, para obtener datos de sub-poblaciones más específicas así como datos de intensidad media de fluorescencia.

Panel				
1	CD3 FITC PMT1	CD16+56 PE PMT2	CD25 PC5 PMT4	
2	CD71 FITC PMT1	CD11c PE PMT2	CD19 P-RT PMT3	CD25 PC5 PMT4
3	CD3 FITC PMT1	CD19 PE PMT2	CD45 PC5 PMT3	

Tabla 2.-Diseño de los paneles de lectura con grupo de diferenciación, fluorocromo y fotomultiplicador de lectura.

En esta tabla se muestra para cada recuadro el anticuerpo monoclonal utilizado, con el tipo de fluorocromo que contiene y el fotomultiplicador utilizado para su lectura. Los valores de citometría se reportaron como conteos absolutos y como intensidad media de fluorescencia.

VARIABLES DEPENDIENTES

Expresión de IL-6 en sobrenadantes de células mononucleadas estimuladas con Ribovac®.

Expresión de CD3,CD25,CD19,CD45,CD71,CD16+56.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Extractos ribosomales (Ribovac®).

PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO

Se organizaron y analizaron los datos en el programa Microsoft Excel y el programa estadístico SPSS versión 18. Los procedimientos estadísticos descriptivos e inferenciales que se emplearon incluyeron porcentajes, medias, error estándar y t de Student. El intervalo de confianza fue del 95%. Las determinaciones de citocinas se realizaron por duplicado, mientras que las determinaciones de conteo celular se realizaron por triplicado, las graficas de barras se realizaron con el programa Sigma-Plot 10.0.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE IL-6 EN SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS TRATADAS CON CONCENTRACIONES VARIABLES DE RIBOVAC® A DISTINTOS TIEMPOS.

Se estandarizó un ensayo para determinar citocinas en sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas tratadas con concentraciones variables de Ribovac® a distintos tiempos. La figura 1 muestra la curva de calibración del ensayo ELISA que se usó para realizar las determinaciones de IL-6 en sobrenadantes de cultivo, ($y=0.0129x + 0.0873$, $R^2=0.9975$). Al comparar la expresión de IL-6 en el tiempo entre sobrenadantes de células mononucleadas que habían sido tratados por 6 horas, 24 horas y 72 horas con concentraciones variables de Ribovac®, se encontró que los efectos más constantes de elevación de niveles de IL-6 se obtuvieron a las 24 horas para las concentraciones 3.9, 7.8, 15.6, 31.2 y 62.5 µg/ml de Ribovac®, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo. Al comparar la expresión de IL-6 en el tiempo entre sobrenadantes de células mononucleadas que habían sido tratados por 6 horas, 24 horas y 72 horas con concentraciones variables de Ribovac®, se encontró que los efectos más constantes de elevación de niveles de IL-6 se obtuvieron a las 24 horas para las concentraciones 3.9, 7.8, 15.6, 31.2 y 62.5 µg/ml de Ribovac®, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo.

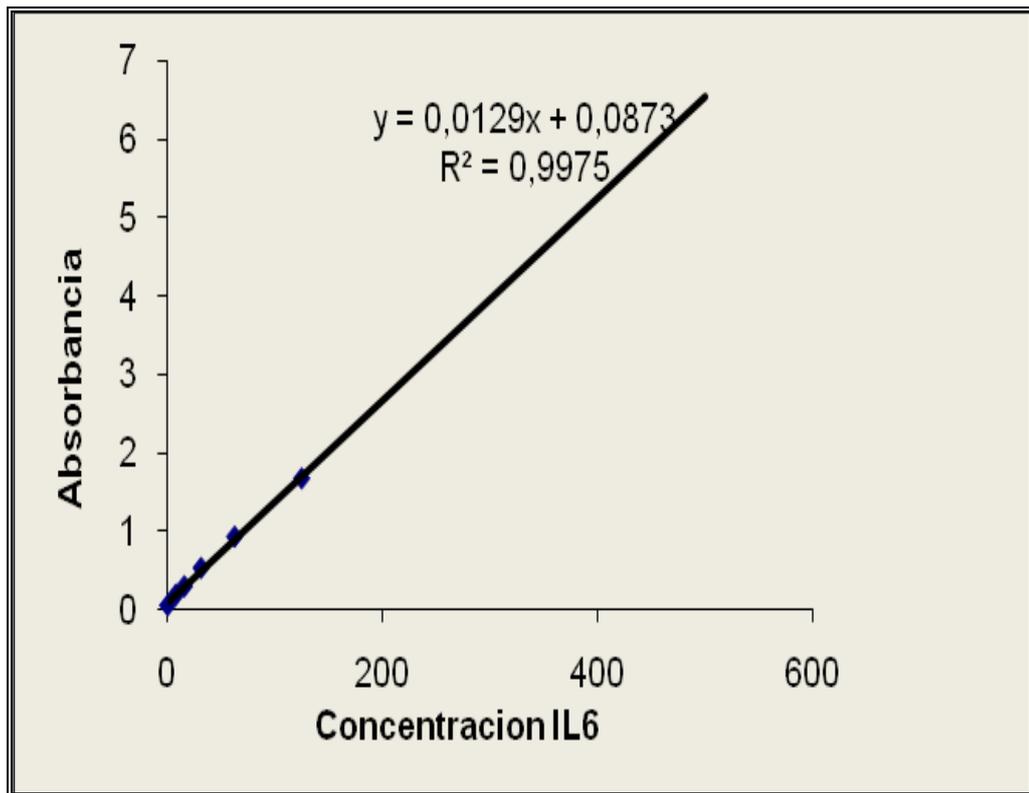


Figura 1.- Curva de calibración de IL-6.

Los niveles de IL-6 tendieron a disminuir para todas las concentraciones estudiadas respecto al control con células no tratadas al tiempo 72 horas, este cambio fue estadísticamente significativo al comparar células no tratadas con células tratadas a una concentración de 31.2 $\mu\text{g/ml}$ de Ribovac®, ($p=0.006$). Fig 2

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles de IL-6 en células tratadas con todas las concentraciones de Ribovac® respecto a células no tratadas a las 4 y 6 horas.

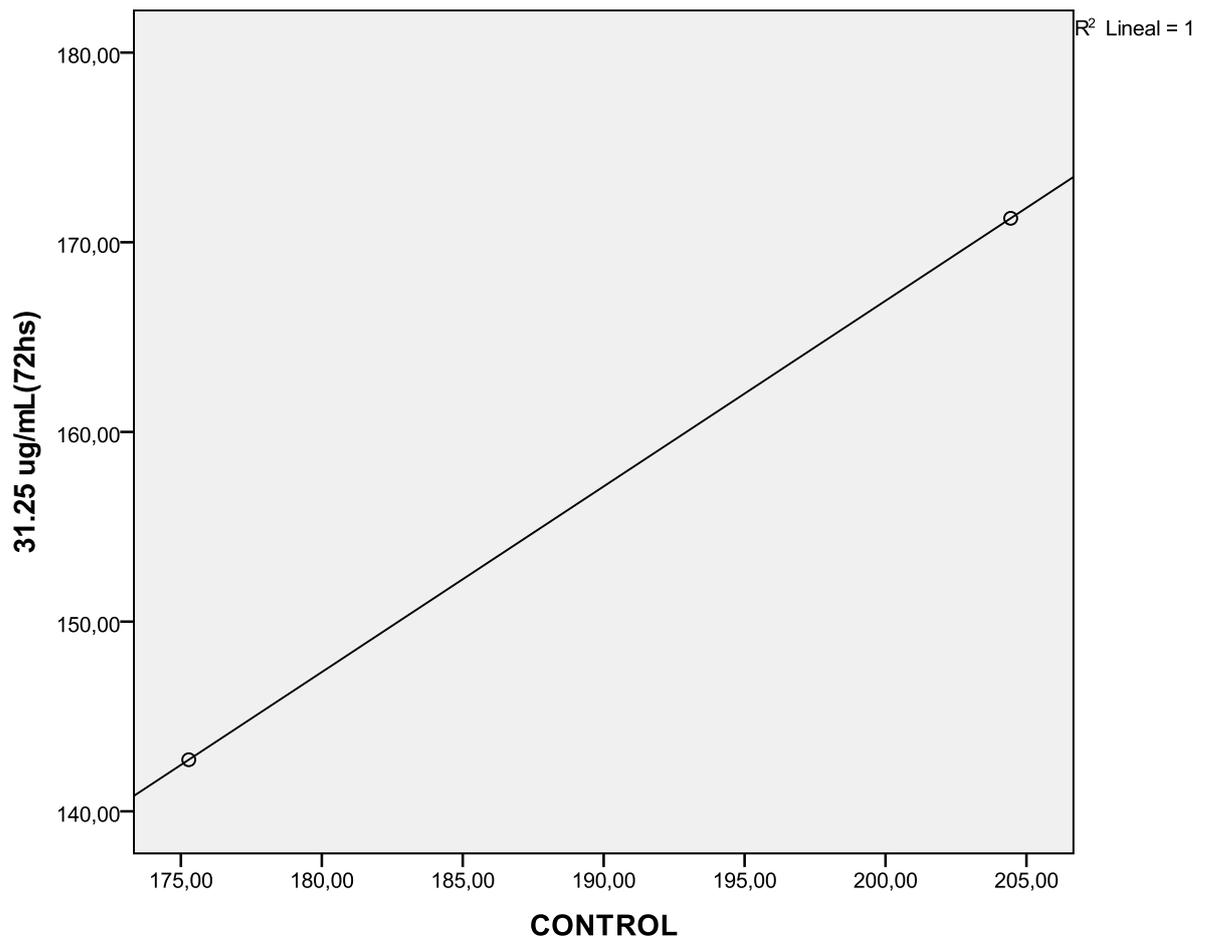


Figura 2.- Curva de correlación de la expresión de IL-6 a CONTROL vs [31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$] 72hs.

EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD3 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®

Se obtuvieron valores máximos de conteo de células CD3+ en células mononucleadas tratadas por 72 horas con concentraciones de 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ribovac®, (CD3 basal a las 72 horas vs. CD3 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a las 72 horas), $p=0.025$.
Fig 3.

También se encontraron valores estadísticamente significativos al comparar los conteos de células CD3+ entre células mononucleadas tratadas por 72 horas a concentraciones de 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respecto a aquellas tratadas en el mismo tiempo pero a concentraciones de 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $p=0.010$ y entre la expresión CD3 en células

tratadas con 62.5µg/ml de Ribovac® por 6 horas respecto a expresión de CD3 en células tratadas con 125 µg/ml de Ribovac® a las 72 horas., p=0.019. En todos los casos se obtuvieron los efectos máximos en células tratadas con la concentración de 125 µg/ml de Ribovac®.

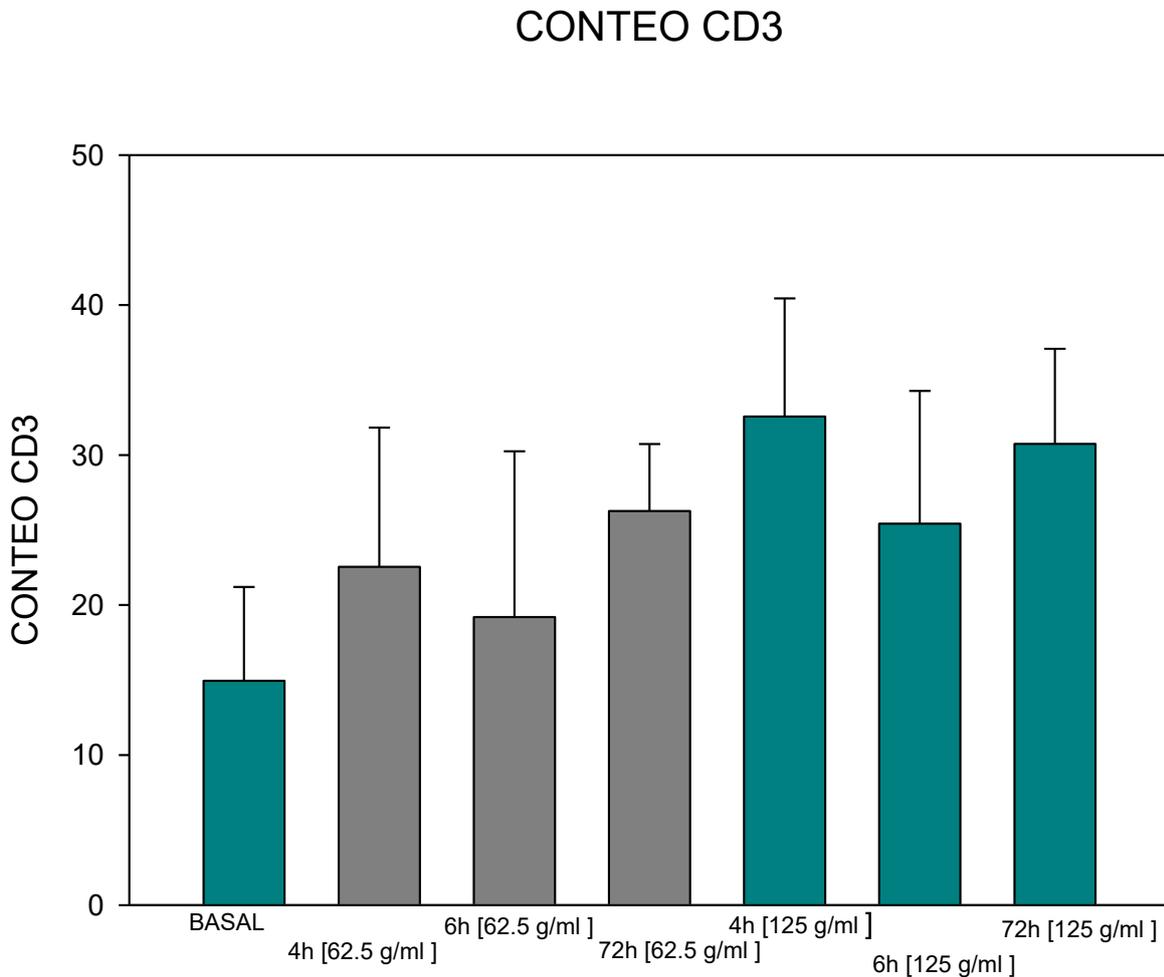


Figura 3.-Conteo de células con expresión de CD3 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

La fig 4 muestra un gráfico de correlación entre la expresión de CD3 basal y CD3 a las 72 horas que presenta una $R^2=0.993$, lo que indica que la variable tiempo resulta importante para analizar el impacto de Ribovac® sobre la expresión de CD3.

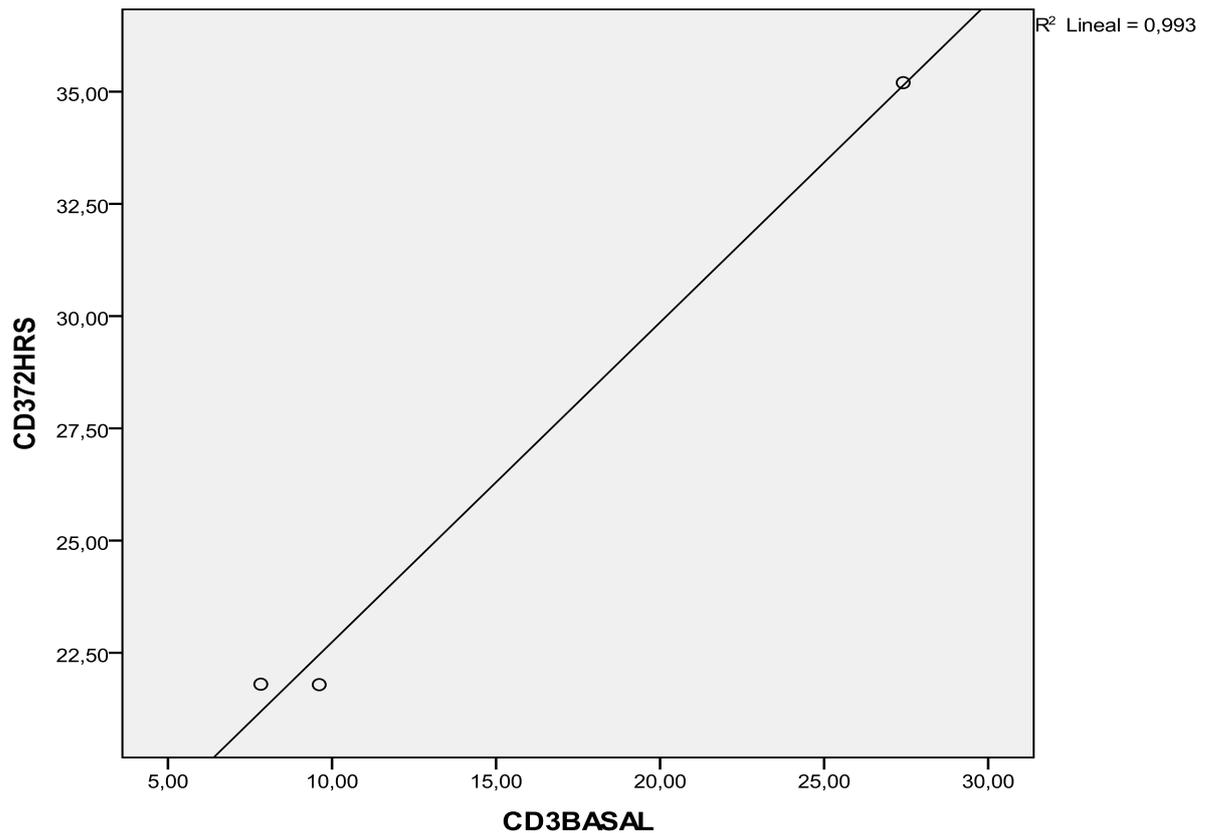


Figura 4.- Curva de correlación de la expresión de células con fenotipo CD3 que presento valor de significancia estadística.

Al analizar la intensidad media de fluorescencia (IMF) como marcador para la identificación de células CD3+, se encontró un comportamiento similar al encontrado a través de conteo de subpoblaciones CD3+, CD3 basal vs. CD3 62.5 µg/ml a las 6 horas, (p=0.006) y CD3 62.5µg/ml vs. CD3 125 µg/ml a las 6 horas, (p=0.012) el conteo aumentó en un 99.3%. Tanto por el número de conteos de células CD3+ como por los niveles de intensidad media de fluorescencia, los niveles de CD3 tendieron a ser mayores a concentraciones más grandes de Ribovac® (125 µg/mL) y al mayor tiempo de estimulación ensayado (72 horas).

Se encontró un coeficiente de correlación $R^2=0.773$ al evaluar la expresión de CD3 en células tratadas por 72 horas con 125 µg/ml y la encontrada a la misma concentración pero en un tiempo de 6 horas, de forma que la magnitud de la asociación entre la expresión de CD3 por células mononucleadas depende también

del tiempo de estimulación y no solo de la dosis aplicada de Ribovac®. (Fig 5). Asimismo, el cambio observado es positivo del 77.3%.

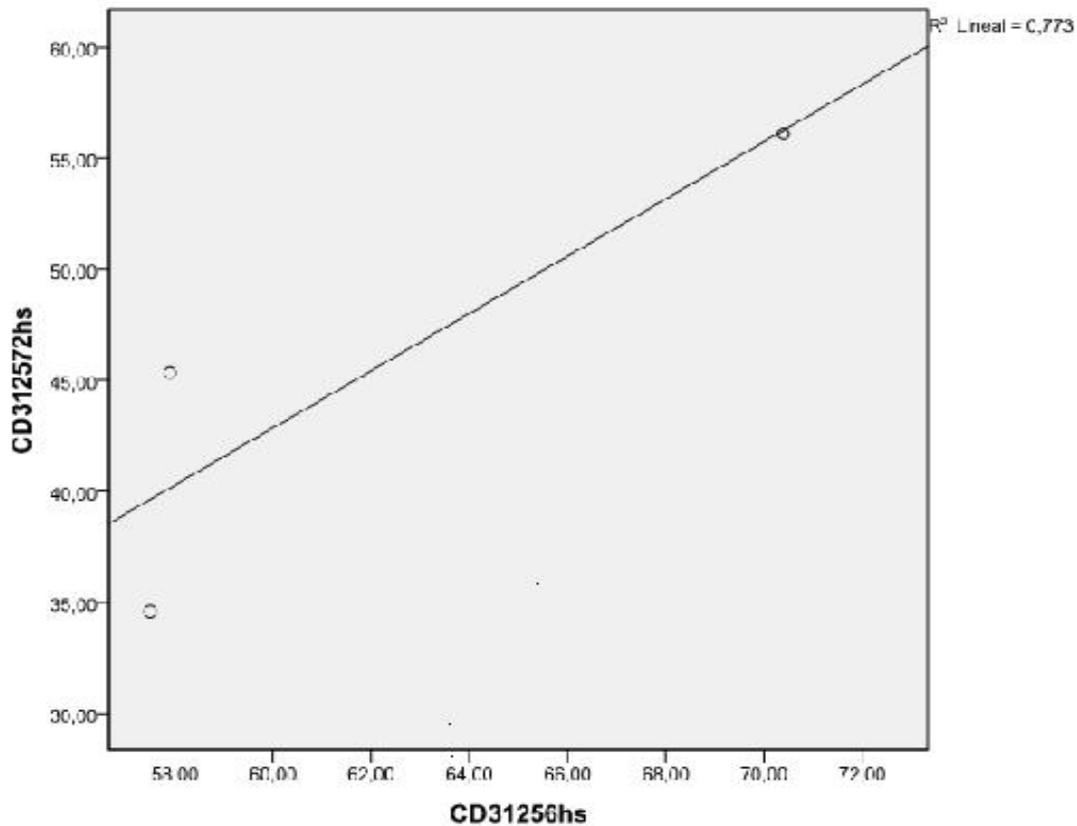


Figura 5.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD3 que presento significancia estadística de CD3 [125] 6h vs. CD3 [125] 72h.

EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD19 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre la expresión del marcador CD19 por células mononucleadas estimuladas con Ribovac® a las concentraciones 62.5 y 125 µg/ml, de Ribovac®, y estas concentraciones respecto al control con células no estimuladas. Nuevamente, este efecto dependió de la concentración usada y del tiempo de estimulación.

Las comparaciones fueron: CD19 basal vs. CD19 (62.5µg/ml), t=6 horas, p=0.005; CD19 basal vs. CD19 (62.5µg/ml), t=72 horas, p=0.017; CD19 (62.5µg/ml, t=6 horas) vs. CD19 (125 µg/ml, t=72 horas), p=0.008; CD19 (62.5µg/ml, t=72 horas) vs. CD19 (125µg/ml, t=72 horas), p=0.021. Las figuras 6, 7, 8 y 9 muestran los coeficientes de correlación de las asociaciones antes descritas.

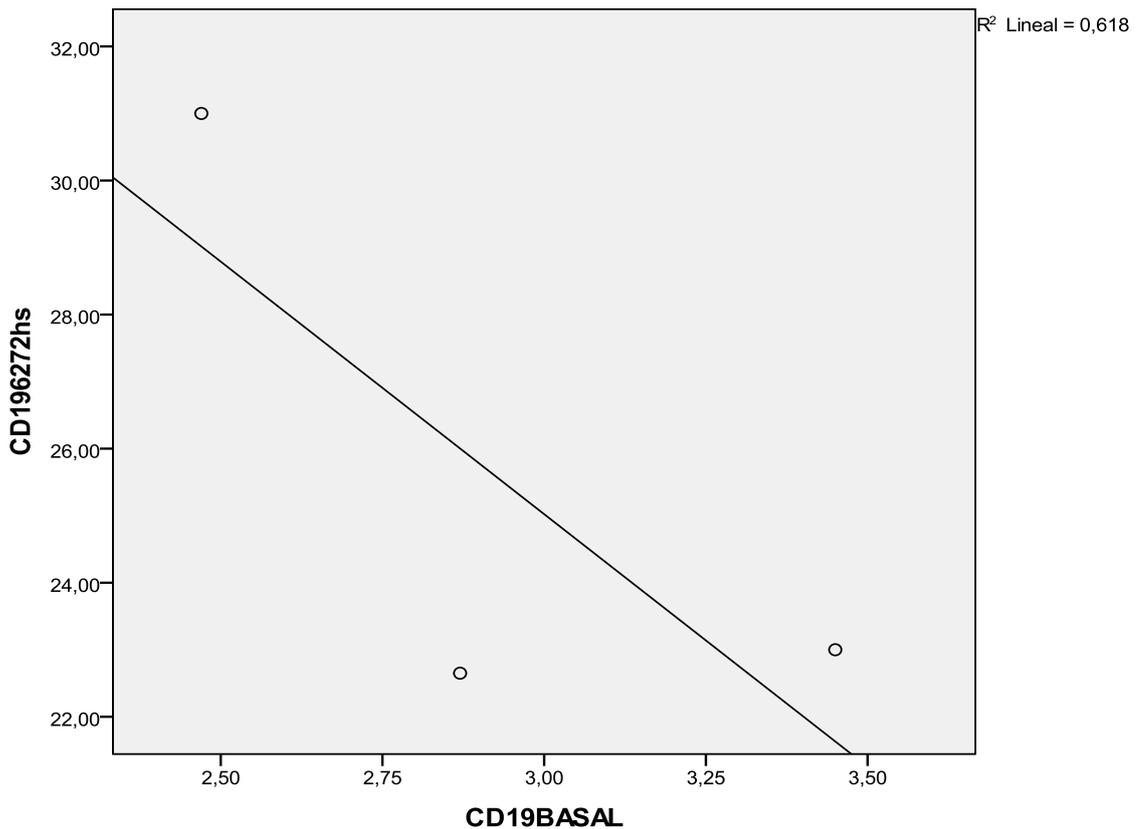


Figura 6.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presento significancia estadística de CD19 BASAL vs CD19 [62.5 µg/mL] 72h.

En la fig.6 se puede observar un cambio dependiente de concentración y de tiempo con un coeficiente de correlación de $R^2=0.618$, aunque el cambio observado fue negativo con magnitud de 61.8%.

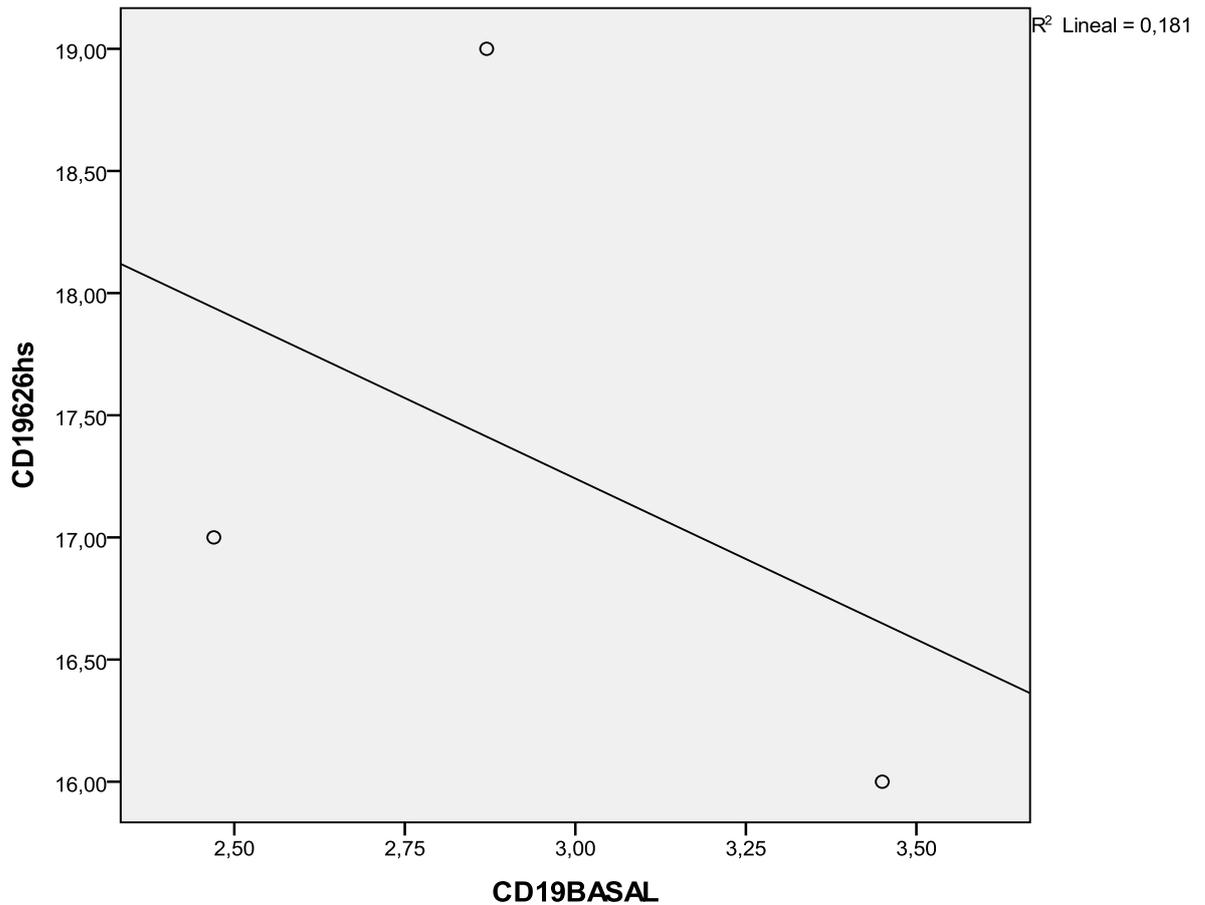


Figura 7.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presento significancia estadística de CD19 BASAL vs CD19 [62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] t=6h.

En el caso de la fig.7, se obtuvo un coeficiente de correlación $R^2 = 0.181$, el cambio observado fue negativo con una $R^2 = 0.181$, equivalente a un 18.1%. En este sentido es contundente la disminución de la población de células con fenotipo CD19 dependiente del tiempo y la concentración.

Este cambio también se pudo observar en la concentración de 125 μg , en la cual disminuyó la cantidad de células que expresan el fenotipo CD19.

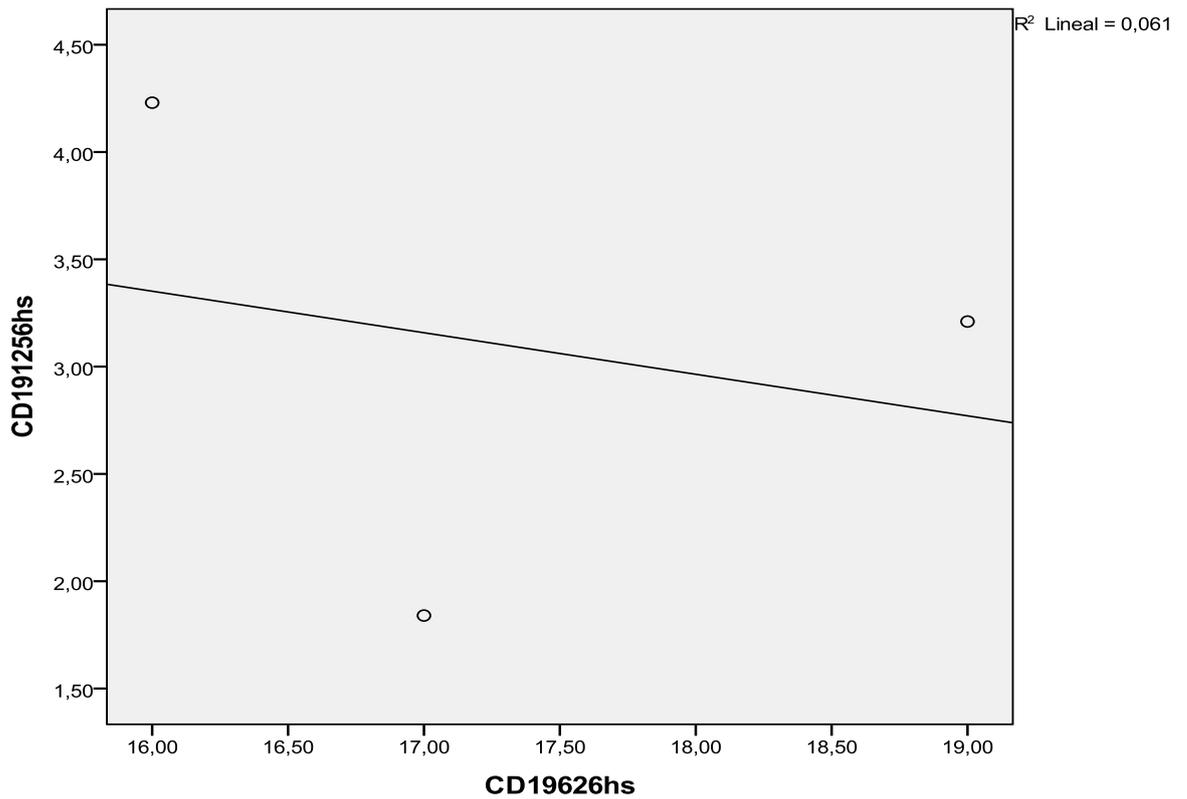


Figura 8.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presento significancia estadística de CD19 [62.5 µg/mL] 6h vs CD19 [125µg/mL] 6h.

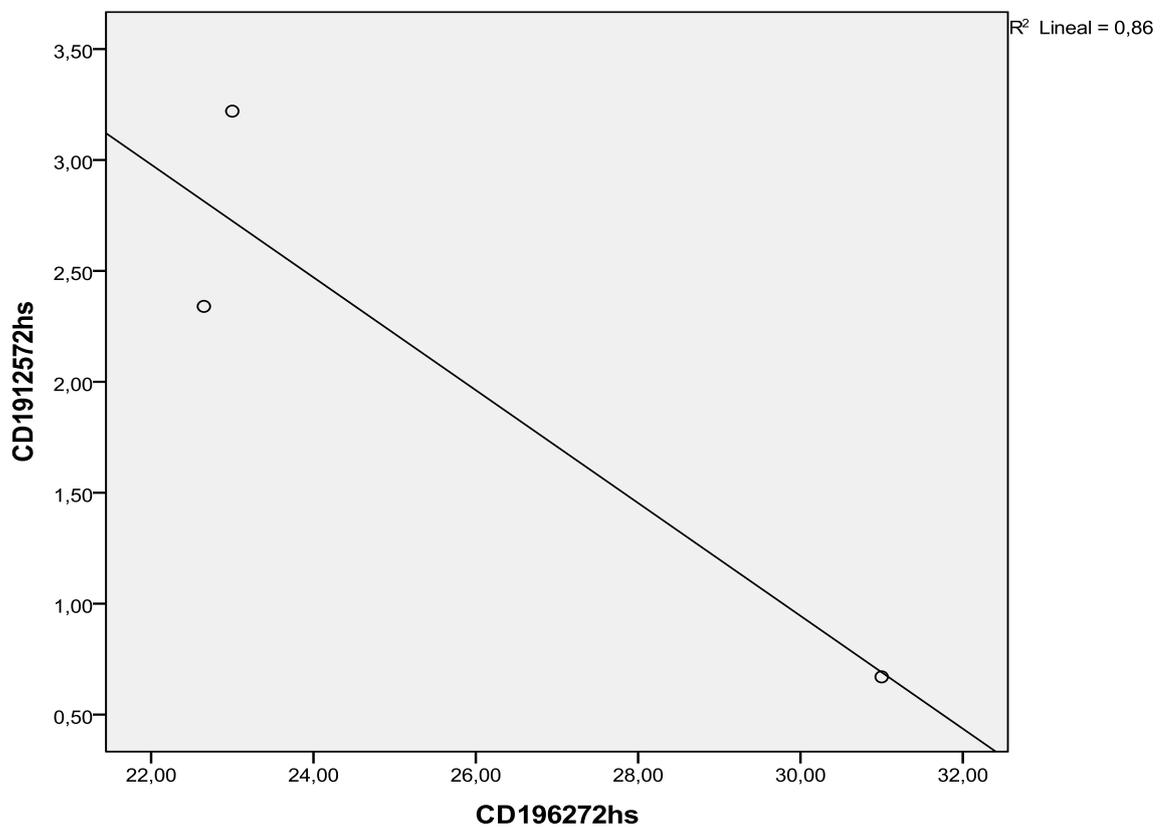


Figura 9.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD19, que presento significancia estadística de CD19 [62.5 µg/mL] 72h vs CD19 [125 µg/mL] 72h.

La fig 9 muestra la expresión de CD19 en función del tiempo y la concentración usada de Ribovac®.El valor de la $R^2 = 0.86$, lo que equivale a un cambio negativo de 86%, este cambio es dependiente de tiempo.

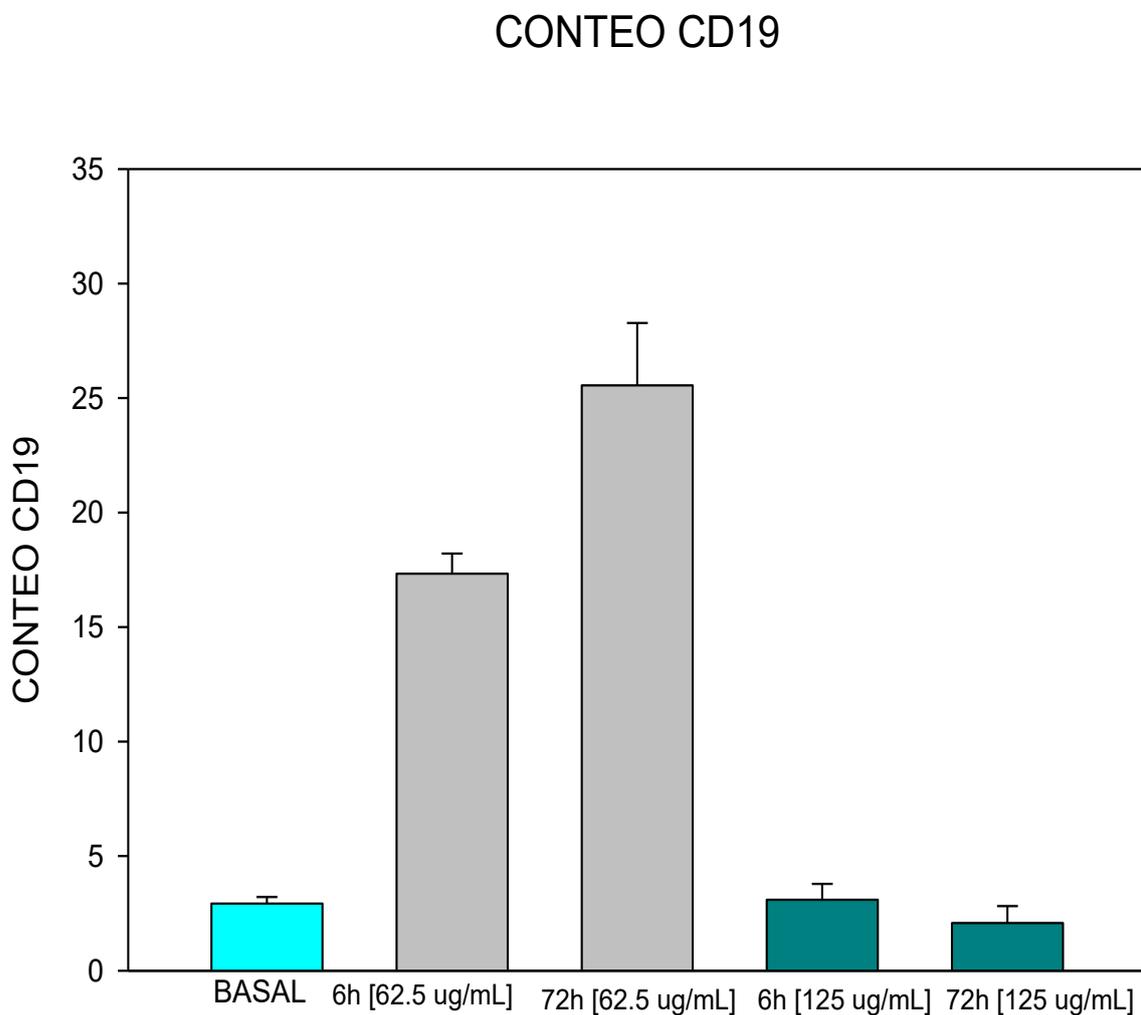


Figura 10.- Conteo de células con expresión de CD19 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

Al medir la expresión de CD19 por IMF, también se encontraron cambios estadísticamente significativos al comparar CD19 basal vs. CD19 125 µg/ml, t=72 horas, p=0.004; CD 19 basal vs. CD 19, el cambio se presentó en un 92.2%. La fig 10 muestra, el conteo de células con expresión de CD19 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

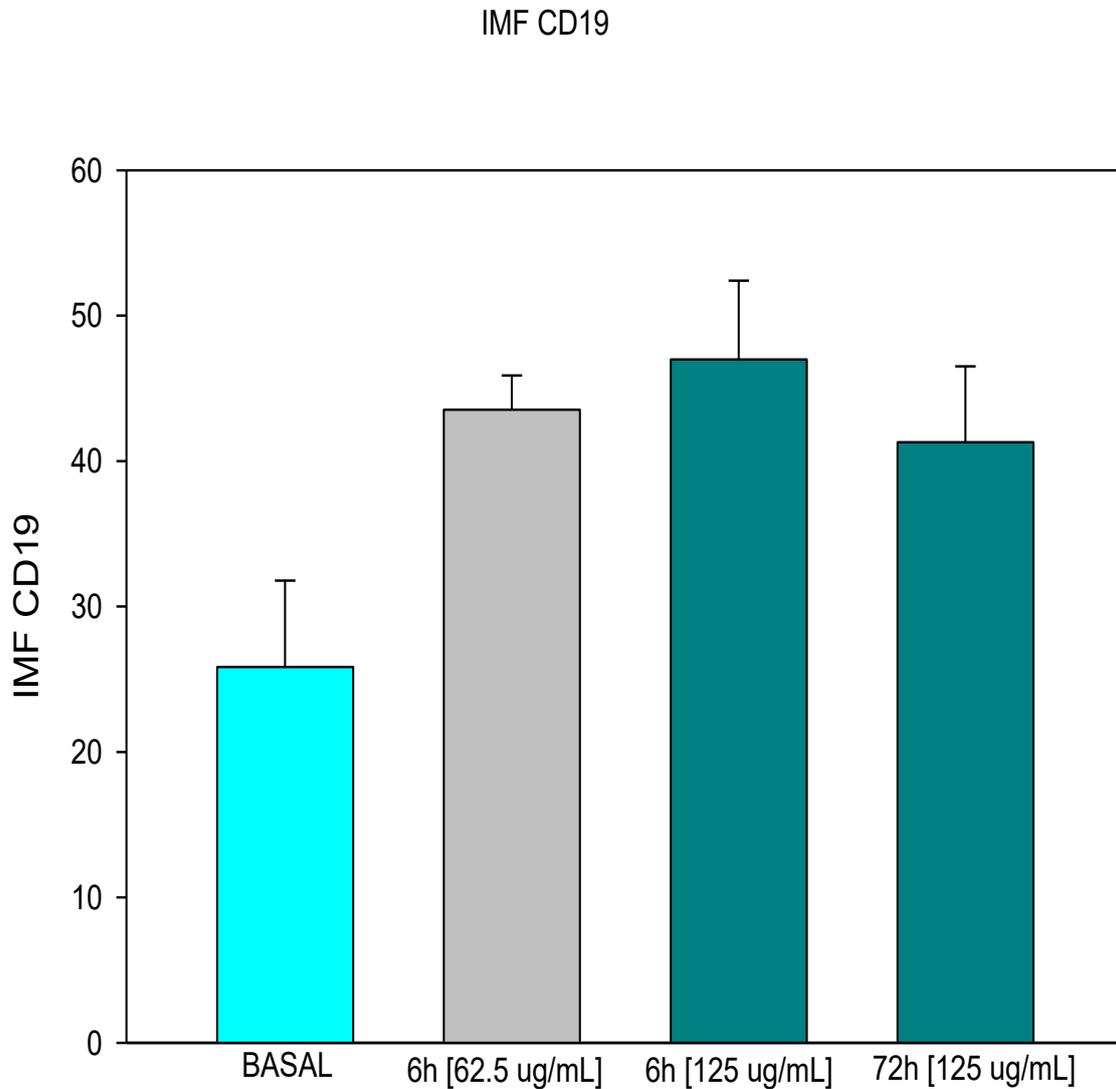


Figura 11.- Expresión de IMF de células con expresión de CD19 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD16 CD56 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.

El número de células CD16+ disminuyó con las concentraciones 62.5 y 125 $\mu\text{g/ml}$ de Ribovac®, aunque esta disminución no fue significativa estadísticamente ni respecto al tiempo de estimulación ni a la dosis usada de Ribovac®, al comparar la media de los conteos de células CD16+ e intensidad media de fluorescencia, entre células tratadas con Ribovac® y controles no tratados. (Figs 12 y 13).

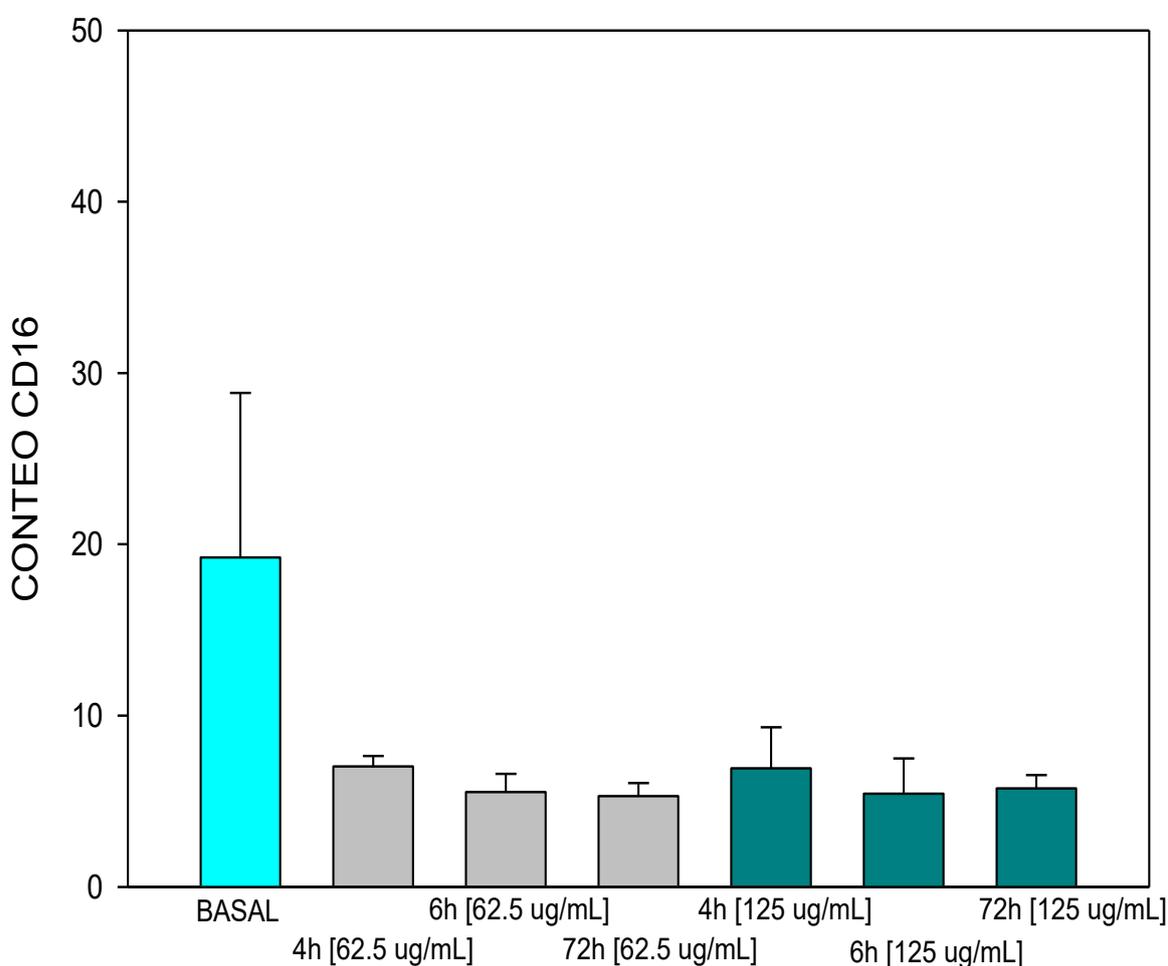


Figura 12.- Conteo de células con expresión de CD16 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

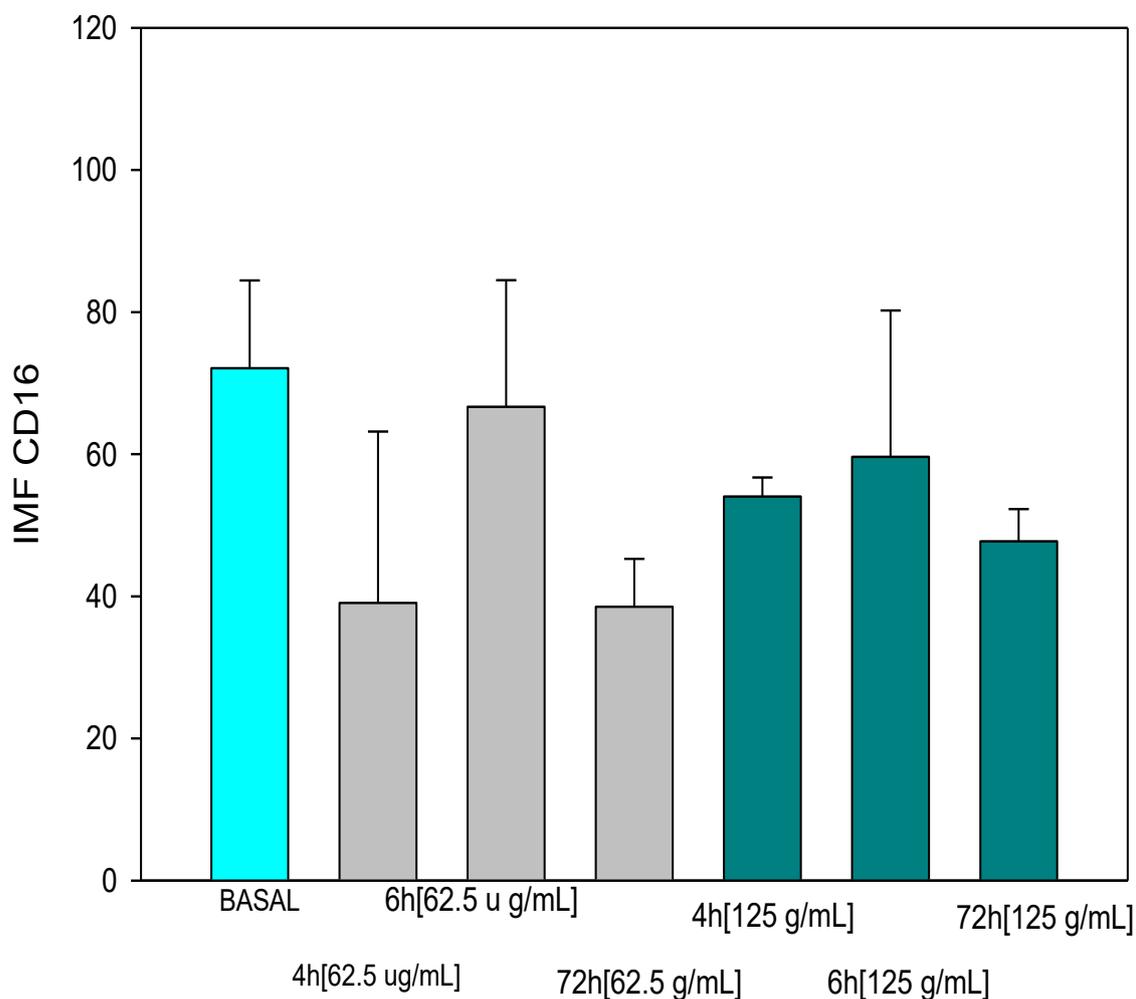


Figura 13.- Conteo de IMF en células con expresión de CD16 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

EXPRESIÓN DEL MARCADOR CD45 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®

No se encontraron diferencias significativas al comparar la expresión de CD 45 entre células tratadas y no tratadas ni entre células tratadas en diferentes

concentraciones de Ribovac®. Este cambio no fue significativo ni respecto al tiempo de estimulación ni a la dosis administrada de Ribovac®. (Fig 14 y 15).

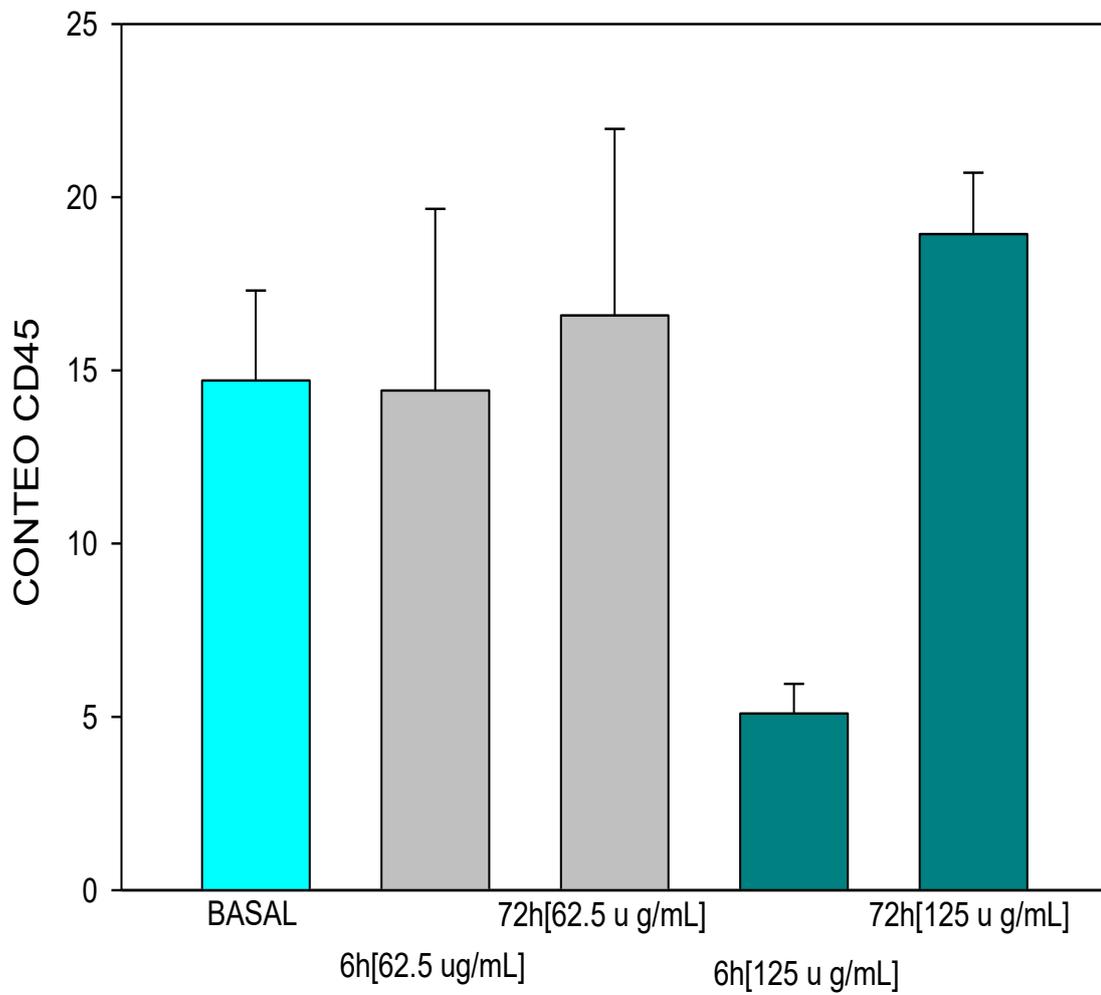


Figura 14.-Conteo de células con expresión de CD45 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

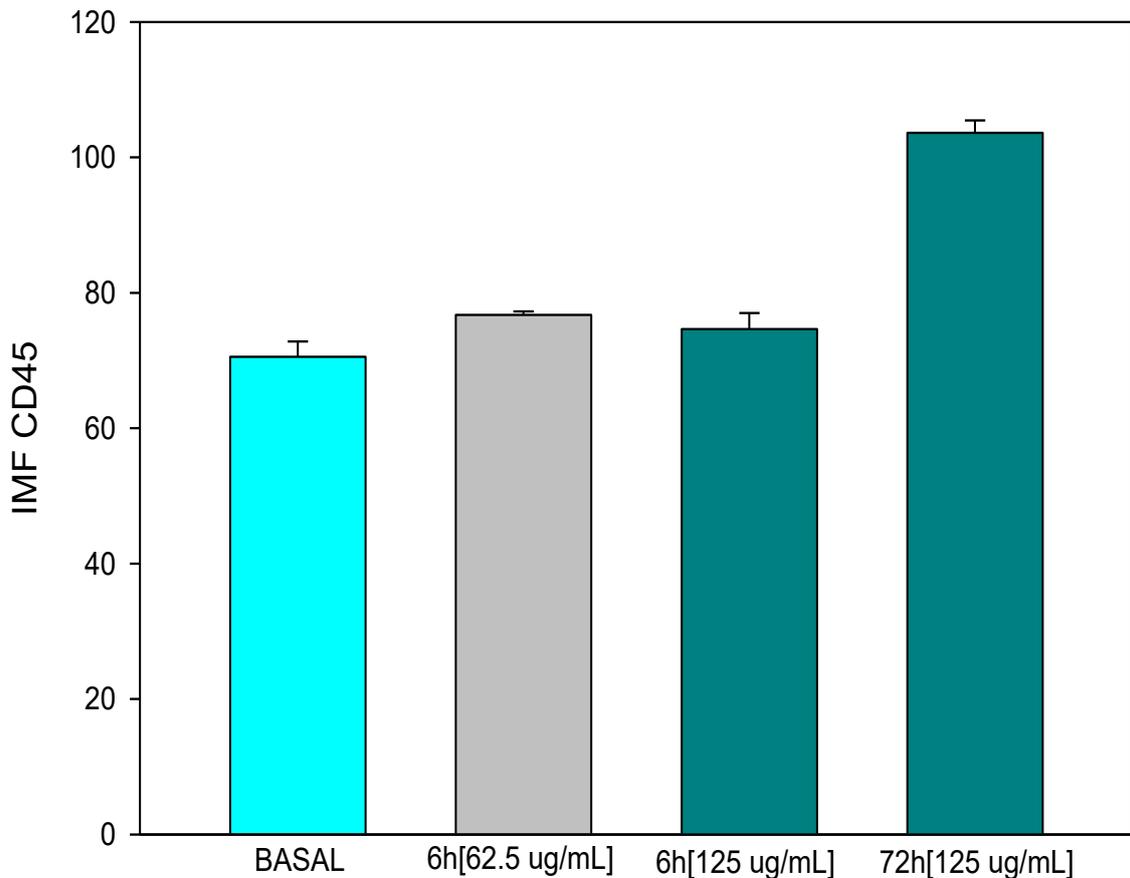


Figura 15.-Conteo de IMF en células con expresión de CD45 estimuladas con Ribovac® a tiempo y concentraciones variadas.

COEXPRESIÓN DEL MARCADOR CD 45 Y DEL MARCADOR CD3 POR CÉLULAS MONONUCLEADAS ESTIMULADAS CON RIBOVAC®.

Se encontró un aumento de la población celular que coexpresó CD45+ y CD3+ del 76%, el cual fue directamente proporcional al tiempo de estimulación, al comparar células tratadas con 125 µg/ml a las 6 horas y a las 72 horas, ($p=0.028$, $R^2=0.766$ Figs 16 y 17).

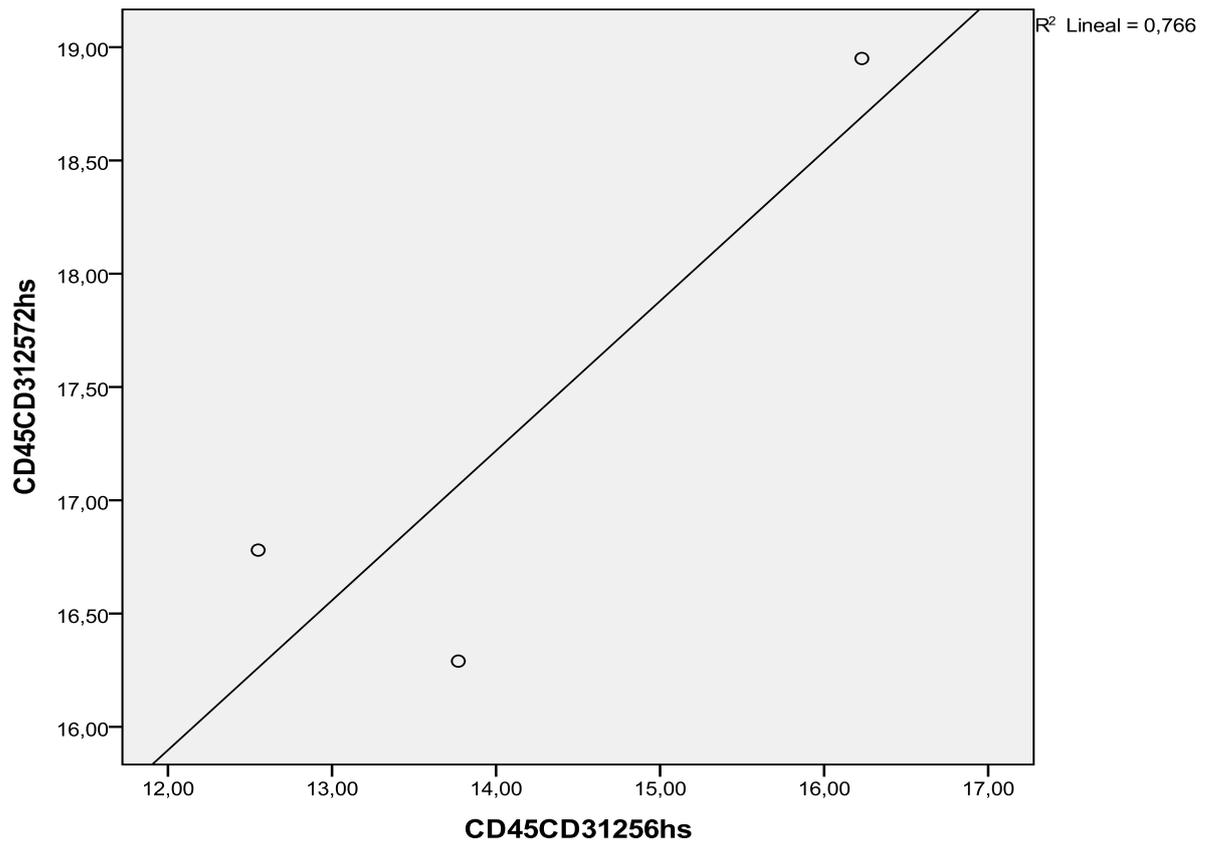


Figura 16.- Curva de correlación del conteo de células con fenotipo CD45CD3 [125µg/mL] 6h vs. CD45CD3 [125 µg/mL] 72h.

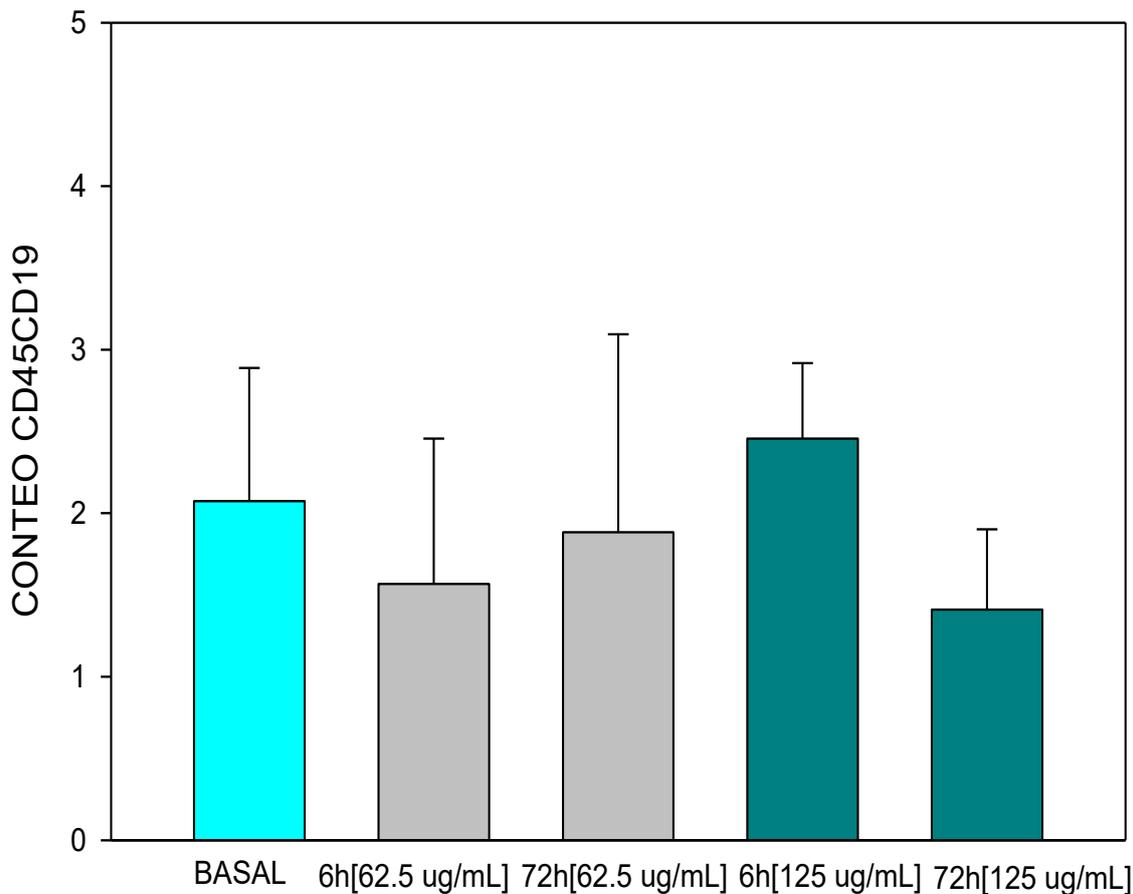


Figura 18.-Coexpresión del marcador CD 45 CD 19 por células mononucleadas estimuladas con Ribovac® a diferentes concentraciones y tiempos.

DISCUSIÓN

Ribovac® estimula la respuesta inmune inespecífica a través de la estimulación de la actividad de macrófagos, polimorfonucleares y NK (D'HinterInd *et al.* 1980, Fontanges *et al.* 1981) y se ha documentado la producción de IL-6 por linfocitos humanos de sangre periférica cuando se estimulan con los proteoglicanos de membrana de *K pneumoniae* (0.01 a 100 mg/mL) (Rigante *et al.* 1989). Estos proteoglicanos también inducen en monocitos humanos de sangre periférica la producción de IL-8 y de factores quimiotácticos de monocitos (Luini *et al.* 1991).

En un reporte se menciona el efecto de Ribovac®, en el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8) (Clot J. 1997). En

concordancia con este reporte, en este estudio se encontró un aumento en la producción de IL-6 por células mononucleadas a las 24 horas de tratamiento con dosis variables de Ribovac® y luego los valores de IL-6 decrecieron a las 72 horas, lo cual se relaciona con el hecho de que diferentes concentraciones de IL-6 inducen distinta respuesta de producción de IL-6 y que esta puede ser regulada en un tiempo corto porque a las 72 horas la producción de IL-6 es similar a la encontrada a niveles basales (sin estimulación). No tenemos una explicación para este fenómeno de inmunoregulación pero en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio hemos encontrado que en sujetos normales la expresión de IL-6 puede regularse localmente por el sitio en que ocurre la respuesta que desencadenó su síntesis y que esta suele regularse en un corto tiempo (datos enviados a publicación).

Se ha reportado el efecto de Ribovac® en la activación de algunas de las funciones de las células polimorfo nucleadas, en la estimulación de la producción de radicales libres del oxígeno, en la quimiotaxis y en la adhesión (Clot J 1997).

En el trabajo de Bellanti *et al.* 2003, se demostró el efecto de Ribovac®, en la reducción de IRVRA, tanto en niños como en adultos. Este autor reporta que Ribovac® tiene efecto en la respuesta inmune al estimular linfocitos B policlonales y linfocitos T.

En este estudio encontramos cambios a las 72 horas en la expresión de los marcadores CD3 y CD19 de células mononucleadas con Ribovac® y que este estímulo fue máximo a la concentración de 125 mg/mL de Ribovac®, lo cual muestra que Ribovac® induce la expansión de poblaciones de linfocitos, en particular células B a las 72 horas. Esto concuerda con el hecho de que Ribovac® induce la producción de anticuerpos específicos por linfocitos B efectores (células plasmáticas) en ratones y humanos. (Fontages *et al.* 1980, Fontage *et al.* 1977, Michel *et al.* 1978). Una vez que los linfocitos B efectores son estimulados, migran a sitios de mucosa en donde se diferencian e inducen la síntesis de IgA donde son detectables unidades formadoras de anticuerpos específicos (Faure *et al.* 1990, Béné *et al.* 1993, Zain *et al.* 1994). En este estudio la coexpresión de CD3 y CD45 fue máxima a las 72 horas de tratamiento de las células con 125 µg/ml de Ribovac® lo cual apoya el hecho de que ocurre una expansión clonal de linfocitos dependiente de los ribosomas bacterianos y proteoglicanos presentes en Ribovac®, lo cual unido

al hecho de que no se apreció un aumento en la coexpresión de CD45 y CD19, sugiere que la expansión de células T es medible en término de incrementos de conteos celulares y que en la población de células B parece ser más importante el cambio hacia fenotipos efectores con mayor capacidad para producir anticuerpos. En próximos estudios es recomendable cuantificar células plasmáticas y usar marcadores de activación de célula B para demostrar el fenómeno de cambio de linfocito B a un inmunofenotipo más maduro producto de la estimulación con Ribovac® y correlacionar estos cambios con la respuesta de anticuerpos específicos.

Un grupo de investigadores de Suecia observó un incremento en la actividad de las células NK cuando los leucocitos aislados de sangre humana periférica se incuban con Ribovac® durante 2 horas; este incremento fue estadísticamente significativo en comparación con la actividad basal después de 20 horas. En un estudio separado, la incubación con Ribovac® durante 20 horas estimuló la actividad citotóxica, la migración y la secreción de citocinas por células NK (Ramstadt 1987, Allavena *et al.* 1989).

En el año 1989 se documentó que Ribovac® estimula funciones citotóxicas y no citóticas en células NK; en este estudio encontramos que Ribovac® indujo una disminución no significativa del total de células CD16+. Este cambio debe interpretarse en el contexto de la coexpresión de otros marcadores como CD56 y CD153 para analizar el destino de las subpoblaciones de células NK. Si consideramos que la mayoría de las células CD16+ fueron CD3- (inmunofenotipo NK), cabe mencionar que el marcador CD16 se asocia a alta citotoxicidad en células NK por lo que es posible que a pesar de no haberse detectado cambios en el número de células NK, puede existir una maduración en la respuesta de estas, lo cual se relaciona con la sobreexpresión de IL-6 encontrada en este estudio y con el aumento de la actividad NK reportada por otros autores (Ramstadt 1987, Allavena *et al.* 1989).

CONCLUSIONES

- Ribovac® tiene un efecto dependiente de dosis y tiempo de exposición en la expresión de IL-6 por células mononucleadas cultivadas con diferentes concentraciones de Ribovac® en tiempos de 4h, 6h, 24h y 72h.

- Ribovac®, tiene efecto en la expresión de marcadores de activación tardíos, en células mononucleadas. Sin embargo se observa que el efecto en la producción de marcadores de activación temprana como lo es CD25 y CD71 no fue estadísticamente significativo; esto podría estar relacionado con el hecho de que las células no se encuentran en estado de proliferación.
- Los resultados de IMF nos muestran los cambios cualitativos que muestran las células mononucleadas a diferentes concentraciones de Ribovac® y tiempos distintos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto RIBO-MEX-001-08 el cual recibió fondos de laboratorios Pierre Fabre México.

Laboratorios clínicos SERVIMED, al biólogo Carlos Béjar Lozano

Unidad de investigación en epidemiología clínica Hospital Regional número 86 del IMSS, al Matemático Carlos Gómez Alonso

Dr. Sergio Guerrero, encargado del citómetro de flujo de la División de Estudios de Posgrado Facultad de ciencias médicas y biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

ANEXO 1.-CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

No.	Descripción de la actividad	Inicio	Terminación
1	Toma de muestra de sangre	08/01/2009	14/01/2010
2	Determinaciones de laboratorio	08/01/2009	14/01/2010
3	Registro electrónico de datos	08/01/2009	14/01/2010
4	Procesamiento de datos	08/01/2009	14/04/2010
5	Redacción de informe final y escritura de publicaciones	08/01/2009	08/04/2010
6	Difusión de resultados	21/04/2009	30/05/2010

BIBLIOGRAFIA

Allavena P, Annalaura E, Pirelli A, et al. 1989. Stimulation of cytotoxic and non-cytotoxic functions of natural killer cell by bacterial membrane proteoglycans and ribosomes. *Int J Immunopharmacol*;11:29-34.

Alexander DR.2000. The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin Immunol*.12(4):349-359.

Álvares Castelló M, Castro Almarales RC, Abdo Rodríguez A, Orta-Hernández SD, Gómez-Martínez M,Álvares-Castelló M.2008.Infecciones respiratorias recurrentes. Algunas consideraciones. *Revista Cuaba de Medicina General Integral*. 24 (1):45-49.

Anatomía del desarrollo del Aparato Respiratorio en: Tortora G J, Grabowski S R. 2002. Principios de Anatomía y Fisiología. 9ª edic. Oxford University Press.817-818.

Andre,P., Biassoni,R., Colonna,M., Cosman,D., Lanier,L.L., Long,E.O., Lopez-Botet,M., Moretta,A., Moretta,L., Parham,P., Trowsdale,J., Vivier,E., Wagtmann,N., and Wilson,M.J. 2001.New nomenclature for MHC receptors. *Nat.Immunol*; 2:661.

Akdis M, Akdis CA.2007. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119:780-789.

Acosta AM, Muñoz MAC, Díaz MLA, Zapata DF.2005.Eficacia y grado de aceptación del tratamiento preventivo con fracciones ribosomales en niños con infección respiratoria recurrente. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*; 7:72-81.

Banerjee B, Kelly KJ, Fink JN, Henderson JD, Bansal NK, Kurup VP.2004.Modulation of Airway Inflammation by Immunostimulatory CpG Oligodesoxynucleotides in a Murine Model of Allergic Aspergillosis. *Infection and Immunity* 72:6087-6094.

Béné MC, Kahl L, Perruchet AM, et al. 1994. Bacterial lysates and ribosomes as inducers of specific oral treatment of children with bacterial ribosomes. *Int J Immunopharmacol*;16:497505.

Bianchi ME.2007.DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*;81:1-5.

Bocaccio C, Jacod S, Kaiser A, Boyer A, Abastado JP, Nardin A.2002.Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cell. *J Immunother*, 25(1):88-96.

Bousquet J, Fiocchi A.2006. Prevention of recurrent respiratory tract infections in children using a ribosomal immunotherapeutic agent: a clinical review.*Pediatric Drugs*;8:235-243.

Brown M, Wittwer C.2000.Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*;46(8):1221-2129.

Brekelmans P, van Soest P, Voerman J, Platenburg PP, Leenen PJ, van Ewijk W.1994.Transeferrin receptor expression as a marker of immature cycling thymocytes in the mouse. *Cell Immunology*;159:331-339.

Broide D.2008.New perspectives on mechanisms underlying chronic allergic inflammation and asthma in 2007.*J Allergy Clin Immunol*;122:475-480.

Broide DH.2007.Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol*;121:560-570.

Bystron J, Hermanova Z, Azatkovska J, Heller L, azderová D.2004.Effect of Ribosomal Immunotherapy on the Clinical Condition and Plasma Levels of Cytokines IL-4,IL-5,IL-12 and Total IgE in Patientes with Seasonal Allergy during the Pollen Season. *Cli Drug Investig*;24(12):761-764.

Campbell JJ, Quin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC.2001.Unique Subpopulation of CD56+ NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoires. *The Journal of Immunology*;166:6477-6482.

Casale T, B, Stokes J, R.2008. Immunomodulators for allergic respiratory disorders. *J. Allergy Clin Immunol*; 121:288-296

Células y tejidos del sistema inmunitario.2002. En: Abbas A K, Lichtman A H., Pober J S, eds. *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana, 17-41.

Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH.1988.The leukocyte common antigen (CD45): A putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry*.85:7182-7186.

Clot J. 1997.Pharmacology of Ribosomal Immunotherapy. *Drug*.54:33-36.

Donnelly JJ, Deck RR, Liu M A.1990. Immunogenicity of a Hemophilus Influenzae polysaccharide-Neisseria meningitides outer membrane protein complex conjugate vaccine. *J. Immunol* ; 145:3071-3079.

Domzing W, Pinel AM, Nomier G, et al.1987 Cross protection induced by bacterial ribosomes. *Maladies Médicaments* ;3:19-24.

Dussourd D'Hinterland L, Pinel AM, Rey G.1980. Immunological study. *Arzneimittelforschung* ;30:132-141.

Especific acquired immunity.2001. En: Roitt I. M, Delves P J, eds. *Essential immunology*. Blackwell science 21-35.

Fauré GC, Bené MC, Simon C.1990.Increase in specific antibody-forming cells in human tonsils after oral stimulation with D-53, a ribosomal vaccine. *Int J Immunopharmacol*;12(3):315-320.

Fiocchi A, Terracciano L, Martelli A, Bernardo L, Calcinai E, Marcassa S.2009. Ribosome-component immune modulation of respiratory tracts infections in childrens. *Allergy Asthma Proc*;30:S21-31.

Fontages R, BinderP, Burckhart MF. 1981.Étude en microscopie électronique de balayage et de trans-mission des modifications morphologiques des macrophages péritoneaux de la souris Balb/C après stimulation locale par D 53. *Rev Fr d' Allergol* 21:227-231.

Fontages R, Robert D, Conteun U, et al.1980. Study of the immunogenicity of ribosomes and ribosomal RNA extracted from K. pneumonia and S. pneumonia. *Arzneimittelforschung*; 30: 14272.

Fontages R, Robert D, Content U, et al.1977. Pouvoir vaccinant de ribosomes extrait de K. pneumoniae, D. pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Haemophilus

influenzae et d'une fraction membranaire de K. pneumonia. *Rev Fr d'Allergol*; 17:35-81.

Gabay C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*; 8: S2-S3.

Gharehbaghian A, Donalson C, Newman J, Bannister G, Bradley Ba. 2006. The correlation between the percent of CD3⁻ CD56⁻ Cells and NK precursor function. *Iran J Allergy Asthma Immunol*;5:167-175.

Goodier MR, Londei M.2000.Lipopolysaccharide Stimulates the Proliferation of Human CD56⁺ CD3⁻ NK Cells:A regulatory Role of Monocytes and IL-10.*The Journal of Immunology*;165:139-147.

Hammad H, Lambrecht BN.2006.Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammationn. *J Allergy Clin Immunol*;118:331-336.

Hayes SM, Laky K, El-Khoury D, Kappes DJ, Fowlkes BJ, LovePE.2002. Activation-Induce Modification in the CD3 Complex of the $\gamma\delta$ T cell Receptor.*The Journal of Experimental Medicine*;196:1255-1361.

Heinrich CP, Castell JV, Andus T.2002. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem*; 265: 621-636.

Hernández-Cadena L, Barraza-Villarreal A, Ramírez-Aguilar M, Moreno-Macías H, Miller P, Carbajal-Arroyo LA, Romieu I.2007.Morbilidad Infantil por causas respiratorias y su relación con la contaminación atmosférica en ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Pública de México*; 49:27-36.

Huntington ND, Tarlinton DM.2000. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol Lett*; 94 (3):167-174.

Innate Immunity. En: Roitt I. M, Delves P J, eds. *Essential immunology*. Blackwell science, 2001: 1-19.

Introducción a la inmunología. En: Abbas A K, Lichtman A H., Pober J S. 2002. eds. *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana: 3-17.

Janeway J. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 1: 1-13.

Janssen S, Beyaert R. 2003. Role of Toll-like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin Microbiol Rev*; 16: 637-646.

Karevold G, Kvestad E, Nafstad P, Kvaerner KJ. 2006. Respiratory infections in children: co-morbidity and risk factors. *91*:391-395.

Kilne J N. 2007. CpG and the Immunomodulation of Asthma. *Proc Am Thorac Soc*; 4: 283-288.

Krieg A, M. 2003. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?. *Nature medicine*; 9:831-835.

Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. 2000. Naturally anergic and suppressive CD25⁺ CD4⁺ T cells as a functionally and phenotypically distinct Immunoregulatory T cell subpopulation. *International Immunology*; 12:1145-1156.

Ledbetter J, Tonks NK, Fischer EH, Clark EA. 1988. CD45 regulates transduction and lymphocyte activation by specific association with receptor molecules on T or B cells. *Immunology*; 85:8628-8632.

Luini W, De Rossi M, Licciardello L, et al. 1991. Chemotactic cytokine gene expression and production induced in human monocytes by membrane proteoglycans from *Klebsiella pneumoniae*. *Int Immunopharmacol*; 13:631-637.

Maródi L. 2006. Neonatal Innate Immunity to Infections Agents. *Infection and Immunity* 74:1999-2006.

MECANISMOS EFECTORES DE LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS en: Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S. 1999. Inmunología

Metzhitov R, Janeway C A Jr. 2000. Innate Immunity. *New Engl J Med*; 343: 338-344.

Michel FB, Dussourd D'Hinterland L, Bousquet J, et al. 1978. Immunostimulant by a ribosomal vaccine associated with a bacterial cell wall-adjuvant in humans. *Infect Immun*; 20:760-769.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity; *Annu. Rev. Immunol.* 19:197-223.

Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, Pantaleo G, Moretta L. 1990. A novel Surface Antigen Expressed by a subset of human CD3⁺ CD16⁺ Natural Killer Cells. *The Journal of Experimental Medicine*; 171:695-714.

Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros M, Collawn JF, Cooper MD, Monteiro RC. 2001. Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)A1 Receptor and its Enhanced Expression on Mesangial Cells in IgA Nephropathy. *Journal of Experimental Medicine*; 194:417-425.

Nascimento J, 1997. Recurrent respiratory tract infections in pediatric patients. *Suppl*; 1:44.

Nelson H, S. 2005. Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*; 115:676-684.

Paupé J. 1991. Immunotherapy with an oral bacterial extract (OM-85 BV) for upper respiratory infections. *Respiration*; 58:150-154.

Pujol JL, Klein B, Godard P, d'Hinterland LD, Michel FB. 1991. Bacterial Ribosomal Immunostimulants prime Alveolar Macrophages In Vivo to Produce Interleukin 1 In Vitro. *Chest* ; 100:644-648.

Quezada LA. 1999. Uso de inmunoestimulantes en pediatría. *Rev Chil Pediatr*; 70:123-129.

Racila DM, Kline JN. 2005. Perspectives in asthma: Molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J Allergy Clin Immunol*; 116:1202-1205.

Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andrés E, Hentges F, Zimmer J.2007.Control of NK cell function by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of Leukocytes Biology*;8:144-153.

Riganti F, Sironi M, Allavena et al. Induction of IL-6 production by membrane proteoglycans from K pneumoniae. 7th International Congress of Immunology 1989; 30 July -5-August; Berlin.

Robaina Suárez GR, Campillo Moliéva R.2003.Morbilidad y manejo de infecciones respiratorias agudas en menores de 5 años. *Revista Cubana de Pediatría*.75(3).

Rodríguez OAR.2001.Amoxiclav-Ribovac vs Ribovac-inmunoglobulina en niños con infección respiratoria alta recurrente. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*; 10(3):104-118.

Rodríguez AR, Pérez AG, Cardoso SA, Reyes A.2007.Prevalencia comparada de asma y rinitis alérgica entre niños y adolescentes michoacanos provenientes de escuelas públicas de Morelia. *Rev Invent clín*;59:90-92.

Roques C, Frayret MN, Luc J. 1993.In vitro stimulation of polymorphonuclear cell adhesion by Ribomunyl and antibiotic+Ribomunyl combination: effects on DC18, CD35 and CD16 expression. *Int J Immunopharmacol*;15:497-505.

Rosemberg C M, Finlay B B.2003. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nature Reviews* 4: 385-395.

Rovers MM, Balemans WFA, Sanders EAM, van der Ent CK, Zihelhuis GA, Schilder GM. 2005. Persistence of upper respiratory tract infections in a cohort followed from childhood to adulthood. *Family practice*; 23:286-290.

Sampola-Lainz A, López Gómez M.1992.Anticuerpos monoclonales y grupos de diferenciación antigénico: métodos de estudio y aplicaciones al diagnóstico clínico. *Med clin (Barc)* ;99:30-36.

Schöder N W J, Arditi M.2007. IEIIS Meeting minireview: The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma: evidence for the involvement of Toll-like receptor signaling. *J Endotox Res*; 13: 305-312.

Sel S, Wegmann M, Sel S, Bauer S, Garn H, Alber G, Renz H.2007. Immunomodulatory Effects of Viral TLR Ligands on Experimental Asthma Depend on the Additive Effects of IL-2 and IL-10. *The Journal of Immunology* 178:7805-7813.

Shinichi S, Steeber DA, Tedder TF.1995. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocytes differentiation. *Immunol*;92:11558-11562.

Simon AJ 2005. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *The Journal of Immunology*,175:3463-3468.

Spahn J,D, Covar R.2008. Clinical assessment of asthma progression in children and adults. *J Allergy Clin Immunol*;121:548-557.

Spörri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A. 2008. A novel Role for Neutrophil As Critical Activators of NK Cells. *The Journal of Immunology*;181:7121-7130.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR.2004. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*;113:1025-1034.

Toda A, Piccirillo CA.2006. Development and function of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of Leukocytes Biology*;80:458-470.

Towen GB.2005. Impact of bacterial infection on airway diseases. *European Respiratory Review*, 14(95):62-68.

Uthaisangsook S, Day N, Bahna S, et al.2002. Innate immunity and its role against infections. *Ann Aller Asth Immu*; 88: 253-265.

Varela C M, Lara AV, Martínez BA, Romero BM, Pérez VN, Cruz PM, Salcedo B C.2006. Eficacia e un inmunoestimulante ribosomal en la prevención de infecciones respiratorias en población preescolar del a ciudad de Orizaba Veracruz. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*;77:17-23.

Vargas M H. La epidemia de asma en México.2000. *Neumología y cirugía de Torax*; 59:101.

Vautel JM,Cauquil J, Perruchet AM, Thomas AM.1993.Prevention of recurrent ear, nose, and throat infections in young children with Ribomunyl: double-blind placebo-controlled study. *Curr Ther Res*;53:722-729.

Walter L, Biffi MD, Ernest E, Moore MD, Frederick A, Moore MD, Verlyn M Peterson MD. 1996. Interleukin-6 in the Injured Patient Marker of Injury or Mediator of Inflammation?. *Annals of Surgery*; 5: 647-664.

Weissman AM, Hou D, Orloff DG, Mod WS, Seuanez H, O'Brien SJ, Klausner RD.1988.Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell . receptor ξ chain: Distinction from the molecular CD3 complex.*Immunology*; 85:9709-9713.

West JV.2002. Acute upper airway infections. *British Medical Bulletin*; 61:215-230.

Youmans AS, Youmans GP. 1966.Preparation of Highly Immunogenic Ribosomal Fractions of *Mycobacteriu tuberculosis* by Use of Sodium Dodecyl Sulfate.*Journal of Bacteriology*; 91:2139-2145.