

Efectos biológicos en células HEp-2, en la multiplicación del adenovirus tipo 6 y en la concentración de interferón en plasma humano en presencia de un RNA de transferencia fúngico

Noé Alvarado-Vásquez*

Julio Santiago‡

Heberto Alcázar-Montenegro§

Susana Alcázar-Leyva§

María Eugenia Manjarrez-Zavala‡

María Teresa Benítez-Rodríguez§

Manuel Meneses-Flores II

Pedro Zamudio-Cortés*

Palabras clave: Inductores de IFN, interferón, tRNA, agentes antivirales, polyl: polyC, adenovirus, efecto citopático.

Key words: IFN inducers, interferon, tRNA, antiviral agents, polyl:polyC, adenovirus, cytopathic effect.

RESUMEN

Introducción: Trabajos previos mostraron la capacidad antiviral *in vitro*, así como la utilidad como inductor de interferón natural (IFN-n) *in vivo* de un RNA de transferencia (tRNA) de origen fúngico, por

este motivo se sigue estudiando esta molécula como una alternativa para el tratamiento antiviral. **Objetivos:** Estudiar el efecto del tRNA fúngico en la viabilidad, síntesis de DNA y en la multiplicación del adenovirus tipo 6 (AV-6) en células HEp-2, comparando su efecto con el producido por el polyl:polyC o por IFN- α . Valorar su capacidad como inductor a largo plazo de la síntesis de IFN-n *in vivo*.

Material y métodos: Células HEp-2 se incubaron con diferentes concentraciones de las moléculas mencionadas durante 24 horas, y se determinó la viabilidad y la síntesis de DNA celular; adicionalmente cultivos tratados en las mismas condiciones se infectaron con 200 unidades formadoras de placas (ufp) del AV-6, se incubaron cinco días adicionales, y se valoró el grado de protección. *In vivo* a siete voluntarios clínicamente sanos se les administró intramuscularmente una dosis única de 100 mg del tRNA, y se determinó mediante la técnica de inhibición del efecto citopático (ECP) el nivel sérico de IFN-n, cinco días después de la inoculación.

* Departamento de Investigación en Farmacología, INER.

‡ Departamento de Investigación en Virología, INER.

§ Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C.

II Departamento de Investigación en Contaminación Ambiental, INER.

Correspondencia:

Noé Alvarado-Vásquez

Unidad de Investigación, Depto. de Farmacología

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Calz. de Tlalpan 4502

Col. Sección XVI México D.F. 14080

Trabajo recibido: 30-XI-98; Aceptado: 28-I-99.

Resultados: El tRNA protegió a las células HEP-2 contra la infección por AV-6, mejor que el polyI:polyC y de forma similar al IFN- α . Ninguna de las tres sustancias afectó significativamente la viabilidad celular. En cambio, la síntesis de DNA sí disminuyó de manera directa en relación con la concentración de los inductores, no así con el IFN- α . En los plasmas de los sujetos tratados con el tRNA fúngico se encontró un aumento en la concentración de IFN-n (de 84.2 ± 107.6 a 171.42 ± 129.5 UI/mL) a los cinco días, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Conclusión: El tRNA fúngico mostró actividad antiviral contra el AV-6, no afectó la viabilidad pero sí la síntesis celular de DNA, y con una capacidad de mantener elevada hasta por cinco días la concentración plasmática de IFN-n en humanos.

ABSTRACT

Introduction: Antiviral *in vitro* activity and interferon-inducer *in vivo* ability of a fungal tRNA were shown in previous works; because of this the tRNA continues to be studied as an antiviral treatment choice.

Objective: The goals of this study were a) to determine the effect of the fungal tRNA on viability and DNA synthesis of HEP-2 cells, and on the replication of adenovirus type 6 (AV-6) propagated onto the same cells, compared with the effects of polyI: polyC and IFN- α ; and b) to analyze its ability as *in vivo* interferon inducer on a long term basis.

Material and methods: HEP-2 cells were incubated for 24 hours with different concentrations of each of the three indicated substances and cell viability and DNA synthesis were determined; in addition similarly treated cell cultures were infected with 200 plaque former unities (pfu) of adenovirus type 6, incubated 5 more days and protection percentages were evaluated. Seven clinically healthy volunteers received an *in vivo* intramuscular dose of 100 mg of tRNA, and serum interferon levels were determined by the cytopathic-effect (CPE) inhibition method, five days after tRNA administration.

Results: Fungal tRNA protected HEP-2 cells against AV-6 infection better than polyI: polyC, and in a level similar to IFN- α . The three substances showed no significant effect on cell viability. In contrast, DNA synthesis was reduced by fungal tRNA and polyI: polyC in a dose dependent way. IFN- α showed no effect on DNA synthesis. A non significant increase in IFN-n plasmatic levels (from 84.2 ± 107.6 to 171.42 ± 129.5 UI/mL) was found in tRNA-treated subjects, although the difference was not statistically significant.

Conclusion: Fungal tRNA showed antiviral activity against AV-6 onto HEP-2 cells, it had effect on cellular DNA synthesis and showed a tendency to

increase, plasmatic IFN levels in human subjects after five days.

INTRODUCCIÓN

El estudio de moléculas capaces de estimular la síntesis del interferón natural (IFN-n) se inicia en la década de los cincuenta, y sigue siendo un tema en que se trabaja activamente hasta nuestros días¹. Los inductores de IFN se han empleado en el tratamiento de diversos padecimientos como la hepatitis crónica tipo B^{2,3}, en la infección producida por *Plasmodium cynomolgi* en monos⁴, en procesos tumorales malignos en humanos⁵, en la infección por VIH⁶ y por influenza⁷. Sin embargo, los resultados obtenidos son muy heterogéneos, motivo por el cual se han seguido buscando mejores inductores de IFN-n, que por otra parte ayuden a evitar los efectos secundarios (náuseas, vómitos, mialgias, artralgias, fiebre y neuropatía periférica)⁸, así como el alto costo de la administración de IFN exógeno.

En trabajos previos utilizando un ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) de origen fúngico (Hypatia, Méx.) se obtuvieron resultados alentadores en el tratamiento y control de diversas enfermedades virales en animales, como la enfermedad de Newcastle, la leucosis aviaria tipo Marek y el cólera porcino⁹. En dichos trabajos se sugirió que la protección contra los virus derivaba de la inducción de IFN-n. En humanos el mismo tRNA se empleó en el tratamiento de herpes labial, herpes ocular y herpes zoster, observándose una mejoría de los síntomas clínicos respectivos. En individuos clínicamente sanos, la aplicación del tRNA fúngico produjo a las 2 h de su administración, un incremento en la concentración plasmática del IFN-n¹⁰, así como del IFN- γ y del factor de necrosis tumoral alfa¹¹. Por otra parte, se observó que el tRNA fúngico protegió a células Vero de la infección por adenovirus, virus de herpes simple tipo I y virus sincicial respiratorio¹⁰, lo cual probablemente también sea por la síntesis de IFN-n.

En este trabajo, se valoró el efecto de un tRNA de origen fúngico en la viabilidad y síntesis de DNA en células HEP-2, y se estudió su efecto antiviral contra el adenovirus tipo 6 (AV-6) en las mismas células. Y se compararon los resultados obtenidos con los mostrados por un inductor sintético ampliamente utilizado (el polyI: polyC); y con los observados utilizando IFN- α recombinante como control positivo. Uno de los principales problemas existentes con la utilización de inductores de IFN tiene que ver con la rápida degradación de éstos por el organismo, por este motivo se cuantificaron los niveles del IFN-n a los cinco días después de haber recibido una dosis única del tRNA fúngico en un grupo de siete voluntarios clínicamente sanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Células y virus: La línea celular HEP-2 obtenida de la American Type Culture Collection se propagó en botellas de cultivo de 50 mL (Costar, Co), en medio RPMI-1640 adicionado con suero de ternera fetal al 10% (Sigma Chemical, Co.) complementado con 100 UI/mL de peni-

cilina y 100 µg/mL de estreptomycin (medio completo). El AV-6 (Bio Whittaker Inc. 30-800) se propagó en células Vero a una multiplicidad de infección de 0.01 ufp/mL. El virus fue titulado por ensayo en placa en células HEp-2.

Inductores: El tRNA de origen fúngico estable en solución fue donado por el Laboratorio de Investigaciones Científicas y Filosóficas (Hypatia), México. El polyI: polyC (Sigma Chemical, Co) y el IFN-α (Sigma Chemical, Co) fueron de origen comercial. Las tres sustancias se prepararon en amortiguador salino de fosfatos (PBS) estéril (pH 7.2), se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a -20 °C.

Efecto de los inductores en la viabilidad y actividad de las células HEp-2. Se incubaron durante 24 h monocapas de células HEp-2 con diluciones 1:2, en medio RPMI-1640 con antibióticos, de las soluciones originales de los inductores y de IFN; para el tRNA fúngico la menor concentración fue de 1.2 y la mayor de 2,500 µg/mL; para el polyI: polyC la menor concentración fue de 48.8 y la mayor de 1,000 µg/mL; y para el IFN la menor fue de 0.244 y la mayor de 500 UI/mL. Después del tiempo de incubación se retiró el medio, se fijaron y se tiñeron las células con 200 µL de cristal violeta (Sigma Chemical, Co) (0.5% p/v en metanol al 70%), se desechó el exceso y la placa de cultivo se lavó exhaustivamente con agua corriente dejándose secar a temperatura ambiente. El colorante se extrajo de las células con ácido acético al 33% y se leyó la absorbancia a 570 nm. Ésta es directamente proporcional a la cantidad de células viables que quedaron en el cultivo. El porcentaje de viabilidad se calculó de la siguiente forma: % de viabilidad = (Absorbancia de las células tratadas / Absorbancia de las células testigo) x 100.

En paralelo, también se evaluó el efecto de los diferentes agentes en la actividad celular, midiendo la incorporación de timidina tritiada. Para esto, las células se sembraron en medio de cultivo completo durante 24 h, posteriormente las placas se lavaron con PBS estéril tres veces, y se aplicaron las concentraciones indicadas de tRNA, polyI: polyC o IFN-α, se incubaron 24 h, y se marcó con 1 µCi/pozo durante 18 h. Al término de este tiempo se cosecharon las células en un cosechador múltiple (Cell Harvester, Brandel, USA), el papel filtro (Brandel, USA) se deshidrató durante 48 h a temperatura ambiente, se colocó en viales con 3 mL de líquido de centelleo y los viales se leyeron en un contador de radiación beta (Beckman LS 6000SE). Los resultados expresados en cuentas por minuto (cpm) se analizaron mediante la prueba de Dunnett.

Ensayo antiviral in vitro: En placas de cultivo de 96 pozos se sembraron 4x10⁴ células HEp-2 por pozo, y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 h. Después se incubaron las monocapas 24 h más, con las diluciones mencionadas de los inductores, aunque en este caso se usaron cinco diluciones más, de manera que la menor concentración para el tRNA fue de 0.038 µg/mL, para el polyI: polyC fue de 0.015 µg/mL y para el IFN-α fue de 0.0076 UI/mL. Las monocapas se infectaron posteriormente con 200 ufp de AV-6 en 200 µL de medio de cultivo con antibióticos, con excepción de los pozos utilizados como testigos celulares que se incu-

baron sólo con medio. Las monocapas se incubaron cinco días más, al término del periodo se tomaron fotogramas de los cultivos, se retiró el sobrenadante, se tiñó durante 15 minutos con cristal violeta como se indicó anteriormente, se extrajo el colorante de las células con ácido acético y se leyó la absorbancia a 570 nm. El efecto de los inductores de interferón y del IFN-α se expresó de la siguiente forma:

Protección antiviral (%) = (Absorbancia de las células con inductor e infectadas - Absorbancia de las células sin inductor e infectadas / Absorbancia de las células sin inductor e infectadas) X 100.

Estimulación prolongada de la síntesis de IFN in vivo: EL grupo estudiado estuvo conformado por siete voluntarias clínicamente sanas, que fueron sometidas a evaluación clínica para descartar la existencia de alguna patología capaz de influir en el estudio. La población provino del área metropolitana de la ciudad de México, y tuvo un promedio de edad de 50.1 ± 11.7 años. A todas se les tomó una muestra de 5 mL de sangre en ayunas con jeringa heparinizada, y luego se les aplicaron 100 mg del tRNA por vía intramuscular. A las 2 h y a los cinco días de la aplicación del inductor se les tomaron nuevas muestras de 5 mL de sangre. Todas las muestras se centrifugaron a 1600 rpm durante 10 minutos, el plasma se recolectó y se hicieron alícuotas que fueron congeladas a -70 °C hasta su análisis.

El nivel del IFN-n plasmático se determinó por la técnica de inhibición del efecto citopático (ECP) utilizando el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Para lo cual se sembraron placas de cultivo de 96 pozos con 3x10⁴ células HEp-2 por pozo en medio completo y se incubaron con diferentes diluciones del plasma durante 24 h. Como estándar se incubaron el mismo número de células con concentraciones conocidas de IFN-α. Los cultivos experimentales se infectaron con 500 ufp del VSV en 50 µL de medio RPMI 1640 y se incubaron durante otras 24 h. Se retiró el sobrenadante y se siguió el mismo procedimiento ya mencionado para la tinción con cristal violeta. Se leyeron las placas para determinar el número de placas virales, y el título del IFN-n presente en el plasma se consideró como el inverso de la dilución que redujo al 50% el ECP del VSV.

Análisis estadístico: El análisis estadístico de los resultados de viabilidad e incorporación de timidina tritiada se realizó mediante análisis de varianza y prueba de Dunnett con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. A los valores encontrados en los cultivos celulares incubados con los inductores y el IFN-α e infectados con el AV-6 se les aplicó una prueba de correlación lineal simple. A los resultados obtenidos al determinar IFN-n en plasma se les realizó una prueba de *t* de Student pareada ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las sustancias más usadas para inducir IFN es el polyI:polyC, el cual estimula la producción de dicha interleucina tanto *in vitro*¹², como *in vivo*¹³, por lo que se ha utilizado en el tratamiento de diversos padecimientos

resultados muy variables. En el presente trabajo este factor, así como el tRNA fúngico, cuya actividad inactiva de IFN también se ha reportado^{10,11}, y el IFN- α recombinante, no afectaron la viabilidad de células epiteliales humanas (HEP-2), de manera significativa en ninguna de las concentraciones usadas ($p < 0.05$) (Figura 1); no obstante, los valores de viabilidad muestran una ligera tendencia a bajar conforme aumenta la concentración de los inductores y del IFN. Con el tRNA y con el polyI:polyC la mayor disminución fue de 9 y 17% respectivamente, en comparación con los testigos de células sin tratar (concentración 0). En términos generales la figura de la viabilidad muestra un descenso conforme aumenta la concentración de los inductores. La ligera disminución en la cantidad de células viables en los cultivos tal vez sea una acción transitoria en la actividad celular derivada de la presencia de los inductores, es interesante mencionar que se han descrito disminuciones en el número celular de fibroblastos murinos¹⁴, así como en leucocitos humanos cuando se administra polyI:polyC¹⁵; los autores han observado además que las células son estimuladas *in vitro* a sintetizar proteínas (observaciones de los autores no publicadas aún).

La Figura 2 presenta los valores de incorporación de timidina tritiada de las células tratadas con las tres sustancias. En dicha figura se observa que la entrada del radioisótopo en las células tratadas se reduce de manera significativa y directa al aumentar la concentración de los inductores, el tRNA y el polyI:polyC. Dicho efecto reductor es dependiente de la dosis y las células expuestas a la concentración más alta del polyI:polyC mostraron el mayor efecto, al disminuirse la incorporación de timidina incluso en un 75% con comparación con los cultivos testigo; mientras que para la mayor concentración de tRNA la reducción de incorporación fue de 40%; a diferencia de los inductores, el IFN- α no tuvo efecto significativo en la síntesis de DNA ($p < 0.05$). El diferente efecto observado entre los inductores y la linfocina se puede relacionar con el tipo de estímulo proporcionado con los inductores, en donde se ha observado un aumento en la síntesis de proteínas como ya se mencionó, lo cual influye en la actividad celular dedicada a la síntesis de DNA; en cambio en el caso de los cultivos celulares expuestos a la linfocina, la interacción de ésta con el receptor, no influye directamente en la síntesis de ADN. En cuanto al efecto de los inductores en la multiplicación del AV-6 en las células HEP-2, la incubación previa de células con el tRNA durante 24 h redujo el ECP viral. La disminución se determinó de dos maneras: la primera mediante la observación a microscopía de luz de las placas tratadas e infectadas en comparación con placas solamente infectadas, las células infectadas que no fueron adosadas con ningún inductor, presentan un notorio hinchamiento y desprendimiento celular.

En las células tratadas con IFN- α y con las células adosadas con tRNA fúngico se encontró una disminución a y apreciable en el microscopio de luz del ECP en las mayores diluciones de ambas sustancias como se puede apreciar en la Figura 3A. En los cultivos celulares incubados

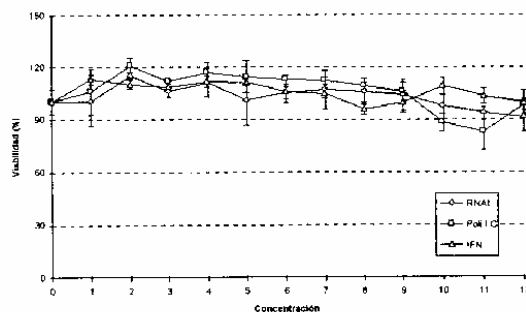


Figura 1. Viabilidad de células HEP-2 incubadas con un tRNA, con polyI:polyC o con IFN- α . Las diluciones comienzan con la concentración más baja de los inductores o del IFN (concentración 1) y van aumentando en un factor de 2 hasta la mayor concentración que fue de 2,500 $\mu\text{g/mL}$ para el tRNA fúngico, de 1,000 $\mu\text{g/mL}$ para el polyI:polyC; y de 500 UI/mL para el IFN. El porcentaje de viabilidad se calculó dividiendo la absorbancia de los pozos experimentales entre los controles celulares y multiplicando por 100 el resultado obtenido. Se muestran los promedios $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos. cc = control celular.

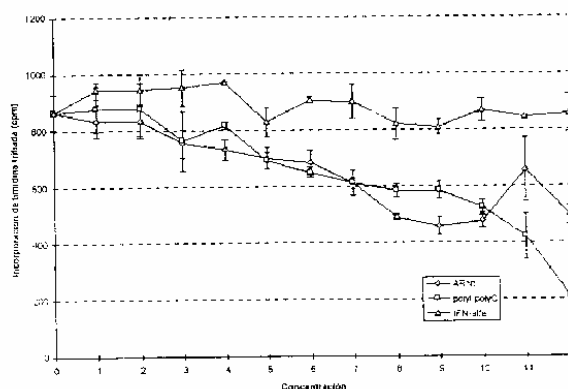


Figura 2. Incorporación de timidina tritiada en células HEP-2 incubadas durante 24 h con un tRNA fúngico, el polyI:polyC o con IFN- α . Cada punto representa el promedio $\pm$ la desviación estándar de tres experimentos. Las concentraciones utilizadas de los inductores o del IFN- α son iguales a las de la Figura 1.

con el polyI:polyC se ve claramente el ECP del virus (células redondeadas y despegadas), (Figura 3B).

La segunda forma para evaluar la disminución del efecto citopático fue mediante el cálculo del porcentaje de células que permanecieron viables después de la infección con el virus, mediante tinción con cristal violeta. Mediante este procedimiento se observó una disminu-

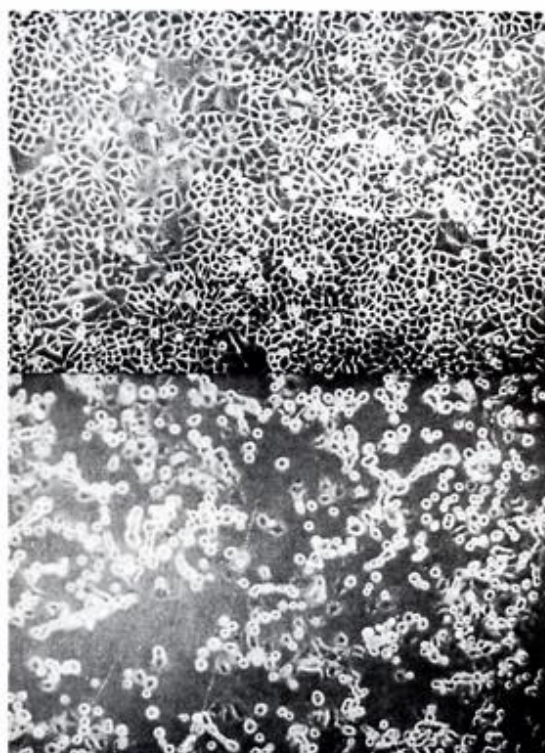


Figura 3. a) Células HEp-2 infectadas con adenovirus tipo 6 e incubadas con el tRNA. **b)** cultivos celulares infectados con AV-6 en presencia del polyI:polyC.

ción del daño producido por el virus, efecto claramente dependiente de la dosis (Figura 4), hecho observado incluso en la concentración más baja de tRNA (0.038 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aunque en menor grado, y de IFN (0.015 UI/mL). La disminución de la lisis celular producida por el tRNA y el IFN- α fue al menos durante la parte ascendente de la curva, directamente dependiente de la dosis ($r = 0.9831$ y 0.9768 , respectivamente). En los cultivos con el polyI:polyC, hubo una protección limitada a las tres concentraciones mayores, con las menores se confirmó mediante la observación de las placas a microscopia de luz, una clara infección viral.

Los resultados del tRNA indican una clara protección *in vitro* contra el adenovirus. Dicha protección fue mayor en comparación con el polyI:polyC, la incapacidad del polyI:polyC para dar una protección significativa, probablemente derive no de una deficiente estimulación para promover la síntesis de IFN, sino de la resistencia del AV-6 contra el tipo de IFN producido o liberado de la célula en presencia del polyI:polyC, a este respecto se conoce que el tipo de IFN producido por las células en general, depende direc-

tamente del tipo de estímulo aplicado, ya que existen tres tipos principales de IFN, alfa, beta y gamma, y en particular el tipo alfa consta de 22 subtipos, cada uno con diferentes propiedades antivirales, antitumorales e inmunorreguladoras. Partiendo de las características de las moléculas utilizadas, éstas caen dentro de la categoría de inductores de IFN- α , probablemente el estímulo proporcionado por el polyI:polyC promueva la liberación o la síntesis de un tipo de IFN menos eficaz para inhibir la multiplicación del AV-6, hecho que estamos en proceso de confirmar mediante la tipificación de los IFN producidos.

Con ninguna de las tres sustancias se vio afectada la viabilidad celular de manera significativa, no se encontraron efectos de citotoxicidad ni efecto en la morfología celular apreciables a microscopia de luz. Estos datos nos indican la importancia de seguir estudiando la utilidad del tRNA fúngico como un agente antiviral tanto *in vitro* como *in vivo*, en particular si consideramos que los cultivos celulares incubados con el tRNA mostraron valores de protección antiviral por arriba del 100% (controles celulares), acción parecida a la del IFN recombinante. En el caso del ácido ribonucleico de transferencia se encontró hasta un 234% de protección en contra del AV-6 (Figura 4), mientras que para el IFN los valores estuvieron por arriba del 180%. Con respecto al polyI:polyC el nivel más elevado fue de 68% (con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de este inductor).

Al obtener el coeficiente de correlación entre los valores obtenidos con el tRNA y con el IFN- α se obtuvo una $r = 0.8863$, lo cual nos indica un comportamiento similar de protección entre el inductor y el IFN- α ; al hacer la misma operación con el polyI:polyC y el IFN- α se obtuvo una $r = 0.4582$, lo cual sugiere un rango de acción diferente entre este inductor y el IFN. De acuerdo con los resultados del

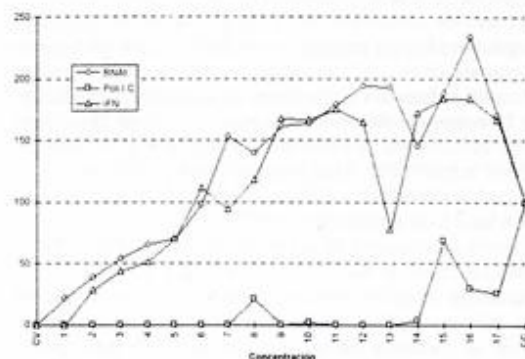


Tabla I. Concentración de IFN-n en el plasma de los sujetos antes, dos horas y cinco días después de haber recibido una aplicación de 100 mg de un tRNA de origen fúngico usando la técnica de inhibición del efecto citopático.

Sujeto	Antes del tRNA (UI/mL)	2 h después del tRNA (UI/mL)	Cinco días después del tRNA (UI/mL)
1	40	160	320
2	20	320	80
3	20	640	320
4	20	320	80
5	10	160	40
6	320	1280	320
7	160	640	40
X = 50.1 ± 11.7 años X = 84.2 ± 107.6 X = 502.8 ± 367.1* X = 171.42 ± 129.5			

(promedio ± D.S. *p ≤ 0.05). U.I.= unidades internacionales de IFN

Para reafirmar los valores de IFN mostrados, éstos se compararon con los obtenidos de una curva realizada con IFN-α comercial, en donde se utilizaron concentraciones de IFN que fueron de 0.244 a 500 UI/mL.

presente trabajo, el efecto antiviral del tRNA fúngico sobre el AV-6 se puede relacionar con su capacidad inductora de la síntesis de IFN en las células HEp-2, el IFN protegería por tanto a la monocapa de células infectadas posteriormente. Esto podría estar relacionado con las diferencias biológicas observadas para cada molécula: el tRNA no afecta la viabilidad celular, sí afecta la síntesis de ADN (medida por incorporación de timidina) y protege claramente a las células contra el adenovirus; el IFN no afecta la viabilidad, no afecta la síntesis de DNA y protege claramente contra el adenovirus; y el polyI:polyC no afecta la viabilidad, sí afecta la síntesis de DNA, igual que el tRNA fúngico, y brinda una protección limitada contra la infección por adenovirus.

El uso de inductores de la síntesis de IFN-n con fines terapéuticos *in vivo*, ha presentado desde sus inicios algunos problemas entre los que destacan: la toxicidad hacia el individuo a altas concentraciones, su rápida biodegradación por la presencia de endonucleasas, o su baja capacidad como inductor de la síntesis de IFN-n, por lo anterior se trabaja activamente para resolver estos problemas¹⁶. Los resultados obtenidos en las personas voluntarias indican que a las 2 h de administrar el tRNA fúngico, se produce un aumento significativo de la concentración de IFN-n (Tabla I) de una basal de 84.2 ± 107.6 a 502.8 ± 367.1 UI/mL después de su administración. Esta respuesta se considera que es muy rápida, a diferencia de otros inductores en donde se necesita de un mínimo de 24 h para poder determinar a esta linfocina en plasma, no podemos descartar que este aumento se deba en un principio sólo a la liberación de los almacenes intracelulares de IFN y más tarde a su síntesis. La respuesta al estímulo es del 100% de los sujetos, lo cual coincide con datos ya reportados previamente⁸, en donde se demostró la capacidad del tRNA fúngico para mantener estimulada hasta por 24 h la síntesis de IFN-n donde el 100% de los sujetos respondieron.

Estos resultados estimularon el estudio del tRNA fúngico en cuanto a su capacidad para inducir a largo plazo la síntesis de IFN, principalmente por la capacidad del organismo de degradar a los agentes de este tipo y de neutralizar su actividad rápidamente¹⁷. Por lo anterior, se valoraron los niveles del IFN-n a los cinco días de haber administrado el inductor. En relación con esto, como se observa en la Tabla I, el 71% de los individuos aún mostraron niveles elevados de IFN-n a los cinco días con respecto a sus concentraciones iniciales (171.4 ± 129.5 UI/mL). En un sujeto (14%) se observó su regreso a la concentración inicial y la otra persona mostró una disminución por debajo de su concentración basal (14%). El incremento en los niveles de IFN a las 2 h se encuentra por arriba del rango normal (de 10 hasta 300 UI/mL)¹⁸, sin llegar a concentraciones encontradas en estados patológicos, a los cinco días los niveles descienden, no obstante no regresan al nivel basal. Estas diferencias se pueden explicar por la gran heterogeneidad que hay en la respuesta de los individuos a la presencia del inductor, así como a la diferente capacidad de biodegradación de cada individuo.

CONCLUSIONES

Se concluye que el tRNA mostró una buena biodisponibilidad a los cinco días, ya que aún existen niveles elevados de IFN-n en plasma; esto probablemente se debe a una mayor resistencia del mismo, a la degradación por las endonucleasas celulares quienes juegan un papel sumamente importante en la inactivación de los inductores de la síntesis de IFN¹⁷. No se cuenta con muchos antecedentes acerca de la utilización de los tRNA como agentes promotores de la síntesis de IFN, pero se ha observado utilizando tRNA de origen vegetal, que se puede mantener estimulada la síntesis de IFN por más tiempo, lo cual coincidiría con los resultados de este trabajo, o bien la estimulación a un mayor nivel de la producción de esta linfocina si se estimula

con un agente adicional en presencia de un tRNA¹⁹. Además de todo esto, se realizó un interrogatorio a los voluntarios, a las 24 h y a los cinco días acerca de la existencia de alguna molestia posterior a la aplicación del inductor, quienes mencionaron que en algunos casos se presentó un ligero malestar semejante a un cuadro gripal que desapareció a las 24 h; ésta es una particularidad observada en general en individuos a los cuales se les administra algún tipo de inductor de IFN, y resulta congruente si se menciona que los síntomas de la gripa se cree que son causados por la presencia de IFN²⁰.

El tRNA de origen fúngico probado en este estudio no afecta significativamente la viabilidad celular, ha resultado ser un buen agente inductor de la síntesis de IFN endógeno *in vitro* e *in vivo*, a corto (2 h) y a largo plazo (5 días), tiempo éste último en el que la mayoría de los inductores ha perdido su efecto. De manera que es un excelente candidato en el tratamiento antiviral contra el AV-6, el cual es un importante agente infeccioso de vías respiratorias principalmente en niños y contra el cual no existe vacuna hasta el momento.

REFERENCIAS

- Merigan TC. Interferon stimulated by double stranded ARN. *Nature* 1970; 228: 219-222.
- Hahn KB, Han KY, Kim WH, Yim DS, Chon CY, Moon YM et al. Efficacy of polyadenylic polyuridylic acid in the treatment of chronic active hepatitis B. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16: 217-225.
- Park SJ, Kim WH, Han KH, Chon CY, Hahn KB, Moon YM, et al. Adjuvant effect of polyadenylic polyuridylic acid on antibody production of recombinant hepatitis B surface antigen in mice. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 513-516.
- Puri SK, Dutta GP, Levy HB, Maheshwari RK. Poly ICLC inhibits plasmodium cynomolgi B malaria infection in rhesus monkeys. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16: 49-52.
- Witt PL, Zahir S, Ritch PS, McAuliffe TM, Ewel CH, Borden EC. Phase I/II study of polyadenylic polyuridylic acid in patients with advanced malignancies: clinical and biological effects. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16: 631-635.
- Thompson KA, Strayer DR, Salvato PD, Thompson CE, Klimas N, Molavi A, et al. Results of a double-blind placebo-controlled study of the double-stranded RNA drug poly(I):poly(C)12U in the treatment of HIV infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:580-587.
- Wong JP, Saravolac EG, Sabuda D, Levy HB, Kende M. Prophylactic and therapeutic efficacies of poly(I):poly(C) against respiratory influenza A virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2574-2576.
- Baron S, Tying KS, Fleischmann WR, Coppenhaver DH, Niesel DW, Klimpel GR, et al. *The interferons: Mechanisms of action and clinical applications*. JAMA 1991; 266:1375-1385.
- Alcázar MH. Historia de una investigación biológica. México ELARTEH Publicaciones, 1988.
- Alvarado VN, Santiago CJ, Alcázar LS, Benítez RMT, Castellanos C, Zamudio CP. Inducción de la producción de interferón endógeno en humanos e inhibición de la replicación *in vitro* de adenovirus tipo 6, virus herpes simple tipo 1 y virus sincicial respiratorio utilizando un ARN de transferencia. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 1997; 10:100-106.
- Alvarado VN, Alcázar LS, Benítez RMT, Zamudio CP. Incremento en la concentración de IFN- α y TNF- α en el plasma de sujetos sanos a los que se administró un ARN de origen fúngico. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 1998; 11:12-16.
- Pitha MP. Interferon induction with insolubilized polynucleotide and their preparation. *Methods Enzymol* 1981; 78: 236-242.
- Suhadolnik RJ, Reichenbach NL, Hitzges P, Adelson MI, Peterson DL, Cheney P, et al. Changes in the 2-5A synthetase RNase L antiviral pathway in a controlled clinical trial with poly(I):poly(C)12U in chronic fatigue syndrome. *In vivo* 1994; 8:599-604.
- Kimura-Takeuchi M, Majde AJ, Toth AL, Krueger MJ. The role of double-stranded RNA in induction of the acute-phase response in an abortive influenza virus infection model. *Infect Dis* 1992; 166: 1266-1275.
- Hendrix WC, Margolick BJ, Petty GB, Markham BR, Nerhoo L, Farzadegan H, et al. Biological effects after a single dose of poly(I):poly(C)12U in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 429-435.
- Khan AL, Heys SD, Eremin O. Synthetic polyribonucleotide: current role and potential use in oncological practice. *Eur Surg Oncol* 1995; 21: 224-227.
- Nordlund JJ, Wolff SM, Levy HB. Inhibition of biologic activity of poly(I):poly(C) by human plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 133:439-444.
- Bocci V. The physiological interferon response. *Immun Today* 1985; 6:7-9.
- Zahorska R, Korbecki M, Barciszewski J, Wojda U. Effects plant transfer ribonucleic acids on interferon production. *Acta Virol* 1985; 29:203-208.
- Bender SB, Small AP. Influenza: pathogenesis and host defense. *Semin Respir Infect* 1992; 7:38-45.