

Incremento en la concentración de IFN- γ y TNF- α en el plasma de sujetos sanos a los que se administró un RNAt de origen fúngico.

Reporte preliminar

Noé Alvarado Vásquez*

Susana Alcázar Leyva ‡

Ma. Teresa Benítez Rodríguez ‡

Pedro Zamudio Cortés*

Palabras clave: RNAt, inductores de interferón, IFN- γ TNF- α , inmunomoduladores.

Key words: tRNA, interferon inducers, γ -IFN, α -TNF, immunomodulators.

RESUMEN

Antecedentes: Es importante el uso con fines terapéuticos de inmunomoduladores que funcionen como inductores de la síntesis de interferón natural (IFN-n), principalmente si se considera el costo y toxicidad del interferón recombinante. En este trabajo, se estudia el efecto que la aplicación de uno de estos inductores, el ácido ribonucleico de transferencia (RNAt), tuvo sobre los niveles séricos del interferón gamma (IFN- γ) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Objetivos: Determinar la concentración del IFN- γ y el TNF- α en el plasma de sujetos a quienes se les aplicó un RNAt de origen fúngico como inductor de la síntesis de IFN-n.

Material y Métodos: A nueve voluntarios sanos se les administró por vía IM 200 mg del RNAt, y se valoró en plasma de sangre venosa antes y dos horas después de la aplicación del RNAt, la concentración del IFN- γ y del TNF- α por la técnica de ELISA.

Resultados: Se observó que los niveles de IFN- γ y del TNF- α se incrementaron de 267.83 ± 208.03 a 2230 ± 2088.73 pg/mL, y de 48.92 ± 88.07 a 261.64 ± 80.61 pg/mL respectivamente (Prom. $\pm$ D.S, $p < 0.05$), a las dos horas de la administración de RNAt.

Conclusión: Con la administración del RNAt se observa una tendencia de incremento en la concentración del IFN- γ y del TNF- α , en el plasma de sujetos normales.

* Departamento de Farmacología. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México.

‡ Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C. México.

Correspondencia:

Noé Alvarado Vásquez.

Departamento de Investigación en Farmacología. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calz. de Tlalpan 4502, col. Sección XVI. México D.F., 14080.

Trabajo recibido: 10-XI-97; Aceptado: 5-I-98

ABSTRACT

Background. The use of immunomodulators which work as inducers of natural interferon (IFN-n) synthesis with therapeutic purposes is highly important, mainly if we consider the cost and toxicity of recombinant interferon. In this work we studied the effect that administration of one of these inducers has over serum levels of gamma interferon (IFN- γ), and tumoral necrosis factor (TNF- α).

Objectives: To determine the IFN- γ and TNF- α concentration in human plasma before and after

administration of a transfer ribonucleic acid (tRNA) of fungal origin as inducer of IFN- γ synthesis. Methods: Nine healthy volunteers received an IM administration of 200 mg of fungal tRNA, and concentrations of IFN- γ and TNF- α in venous blood plasma were assessed before and 2 h after the administration of tRNA, using the ELISA technique. **Results:** It was observed that the levels of IFN- γ and TNF- α increased from 267.83 ± 208.03 to 2230.0 ± 2088.73 pg/mL and for 48.92 ± 88.07 to 261.64 ± 80.61 pg/mL, and for 48.92 ± 88.07 to 261.64 ± 80.61 pg/mL, respectively (Mean $\pm$ SD, $p < 0.05$), 2 h after the administration of tRNA.

Conclusions: The administration of tRNA promoted an increase in the concentrations of IFN- γ and TNF- α in plasma of healthy people.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años se ha trabajado en la investigación básica y clínica, analizando la posibilidad de aplicar con fines terapéuticos inmunomoduladores que influyan en la síntesis del interferón natural (IFN-n) en donde se incluyen al IFN- α , β o γ ; lo anterior resulta de gran importancia por la utilidad del IFN en el control de infecciones virales², bacterianas y en el tratamiento del cáncer. Con el uso de inductores de IFN-n, se han obtenido resultados alentadores en el control de problemas virales³, bacterianos o tumorales^{4,5}. Un aspecto sumamente interesante de los IFN, es que son capaces de autorregular su expresión y actividad (principalmente se ha visto entre el IFN- α y el IFN- γ)⁶, e influir además en la síntesis y actividad de otras citocinas importantes, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)⁷.

En este trabajo, se utilizó un ácido ribonucleico de transferencia (RNAt) (por sus características se considera como un inductor de IFN- α o β) de origen fúngico, que ha demostrado su utilidad en el control de la enfermedad de Newcastle, leucosis aviaria de tipo Marek, en el cólera porcino⁸, y que además es capaz de inducir la producción de IFN-n en sujetos sanos a las dos horas; así como de proteger cultivos celulares (células HEp-2) incubados con el RNAt, volviéndose resistentes al efecto citopático de diferentes agentes virales con los que fueron infectados experimentalmente⁹. Los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* con el RNAt, y los antecedentes conocidos de la interacción entre los interferones con el TNF- α , permitieron plantear el estudio acerca de la relación entre el IFN- γ (un tipo de IFN que no se sintetiza con la clase de inductor utilizado), y el TNF- α , ya que ambas linfocinas pueden ser reguladas en su expresión y actividad por los IFN- α o β .

En el presente trabajo, se midió la concentración en el plasma del IFN- γ y del TNF- α en sujetos clínicamente sanos que recibieron un RNAt como inductor de la síntesis de IFN-n.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos. Se estudiaron nueve personas voluntarias clínicamente sanas (sexo femenino); residentes de la ciudad de México, que fueron sometidas a evaluación clínica para determinar la existencia de alguna condición patológica capaz de alterar la concentración de las linfocinas en estudio. Con edades comprendidas entre los 38 y los 68 años y una media de 51.3 ± 12.17 años. A cada una de las voluntarias se les tomó 5 mL de sangre en jeringa estéril y heparinizada, como primera muestra. Posteriormente se les aplicaron 200 mg de RNAt (Hypatia, Méx.) por vía intramuscular. Después de dos horas de la aplicación, se extrajo una segunda muestra de sangre bajo las mismas condiciones. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1,300 rpm por 10 minutos, fue separado el plasma, conservándose a -70°C hasta el momento de realizar las determinaciones.

A uno de los sujetos se le determinó diariamente los niveles de IFN- γ y del TNF- α , durante nueve días continuos, con aplicaciones del RNAt los días 1, 3 y 7. La obtención de las muestras de sangre y de plasma se hizo bajo las condiciones mencionadas previamente.

Medición del IFN- γ y del FNT- α .

Se utilizó un "kit" de ELISA (Amersham, Life Sciences code RPN 2757) para la cuantificación del IFN- γ , el cual no da reacción cruzada con IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, GM-CSF, FNT- α o IFN- γ de ratón, la sensibilidad de la prueba va de los 2 pg/mL en adelante.

Un "kit" también de ELISA (Amersham, Life Sciences code RPN 2758) se utilizó para la determinación del TNF- α , con el que no se ha observado reacción cruzada con las linfocinas ya mencionadas, además de IL-4, IFN- α , IFN- γ y TNF- β , la cantidad mínima que se detecta es de 5 pg/mL.

Para calcular las concentraciones de cada plasma se comparan los valores obtenidos, con los de una curva estándar realizada en las mismas condiciones.

Análisis estadístico:

Se realizó por T de student (T pareada) considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

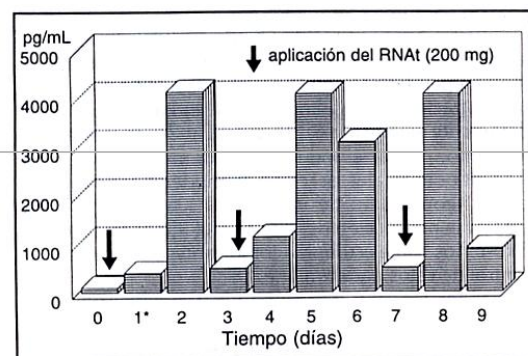
RESULTADOS

El promedio de la concentración de IFN- γ en el grupo de estudio, antes de la aplicación del inductor fue de 267.83 ± 208.03 pg/mL, estos valores aumentaron después de la administración del RNAt hasta un promedio de $2,230 \pm 2,088.73$ pg/mL (Tabla I). Se observó un incremento en la concentración del IFN- γ en el plasma a las dos horas de aplicado el inductor en todos los sujetos, con excepción del número 1 (11% del total), el que tuvo incluso una disminución en sus niveles. El aumento en la concentración de la linfocina en plasma fue muy variable en cada sujeto con un rango de 312.0 a los 7,500 pg/mL, el análisis estadístico fue significativo ($*p < 0.05$).

A uno de los sujetos se le determinaron diariamente por nueve días sus niveles de IFN- γ (Figura 1). Se observó que de un valor basal de 34.0 pg/mL antes de la aplicación del

Tabla I. Resultados en la determinación de la concentración de IFN- γ , antes y dos horas después de aplicado el RNAt.

Sujeto (edad en años)	Antes-pg/mL	Después-pg/mL
1 (53)	435.0	406.0
2 (56)	546.0	2000.0
3 (38)	437.0	2500.0
4 (68)	400.0	2000.0
5 (38)	34.0	266.0
6 (68)	435.0	2187.0
7 (38)	34.0	312.0
8 (41)	19.5	2900.0
9 (62)	70.0	7500.0
$\bar{x} = 51.3 \pm 12.17$	$\bar{x} = 267.83 \pm 208.03$	$\bar{x} = 2230 \pm 2088.73^*$

Prom. $\pm$ DS (*p < 0.05)**Figura 1.** Concentración de IFN- γ en el plasma de un sujeto al que se aplicó un RNAt.* = determinación a las dos horas de aplicado el inductor
0 = valores basales

inductor, los niveles de IFN- γ aumentaron hasta 312.5 pg/mL a las dos horas de aplicado el RNAt, alcanzando su nivel máximo a las 24 horas (4,375.0 pg/mL) y declinando a las 72 horas (545.0 pg/mL). Con una segunda administración del inductor (día 3), se observó un nuevo aumento en la concentración del IFN- γ hasta 4,375.0 pg/mL, con un posterior descenso hasta los 550.0 pg/mL, momento en el cual se dio un tercer estímulo y el incremento regresó a los 4,375.0 pg/mL del IFN- γ (día 8).

En las mismas muestras de plasma se determinó la concentración del TNF- α ; y se observó que el promedio de la concentración del factor de necrosis tumoral alfa en nuestro grupo de sujetos antes de la aplicación del inductor fue de 48.92 ± 88.07 pg/mL (es interesante mencionar

Tabla II. Resultados en la determinación de la concentración del TNF- α antes y dos horas después de aplicado el RNAt.

Sujeto	Antes-pg/mL	Después-pg/mL
1	0.0	388.0
2	250.0	250.0
3	0.0	277.0
4	0.0	277.0
5	0.0	270.0
6	92.5	92.5
7	0.0	277.0
8	N.D	N.D
9	N.D	N.D
	$\bar{x} = 48.92 \pm 88.07$	$\bar{x} = 261.64 \pm 80.61^*$

N.D = no determinado (*p < 0.05)

que en cinco sujetos no se detectó la linfocina), dos horas después de aplicado el RNAt, aumentó a 261.64 ± 80.61 pg/mL (Tabla II), con un incremento en la concentración de esta citocina en cinco de los siete individuos, es decir el 28% (2 sujetos) no responden. La respuesta en cada individuo fue diferente como lo observado para el IFN- γ . El análisis estadístico indicó que el aumento en la concentración del TNF- α es significativo (p < 0.05).

Al mismo individuo al que se le determinaron los niveles de IFN- γ diariamente, se le cuantificó la concentración del TNF- α presente en el plasma también durante nueve días. Se encontró que de un nivel basal de 0.0 pg/mL del factor de necrosis tumoral antes de la aplicación del inductor, este aumentó a 277.0 unidades, encontrándose su nivel más alto a las 24 horas (370.0 pg/mL), con un posterior descenso hasta los 280.0 pg/mL. En este momento fue dado un nuevo estímulo con el RNAt y se observó un nuevo incremento hasta los 388.0 pg/mL. Se encontró un nuevo descenso (0.0 pg/mL) en el día siete de estudio. Se le dio un tercer estímulo y la concentración de la linfocina aumentó nuevamente (398.0 pg/mL), descendiendo en el día nueve a 277.0 pg/mL.

DISCUSIÓN

Aunque el número de individuos del presente trabajo es pequeño, nos permitió observar que la aplicación de un inductor de IFN- γ (RNAt) a sujetos sanos tiene el efecto de incrementar las concentraciones del IFN- γ y del TNF- α . Lo anterior es importante, ya que la utilización terapéutica de ácidos nucleicos se ha determinado que estimula la producción del IFN- α o β , pero no del IFN- γ o de TNF- α que necesitan de otros agentes, tales como los mitógenos: Con A, LPS, PMA, etc., para estimular su síntesis¹. Por lo ya mencionado, los resultados obtenidos son interesantes, más aún si comparamos con resultado obtenidos recientemente en donde se administró a sujetos sanos el poly I: poly C₁₂U, uno de los inductores sintéticos más utilizados en la actualidad y en donde lo

autores no encontraron ningún efecto en la síntesis del IFN- γ , ni en la del TNF- α ¹⁰.

El incremento observado en las linfocinas mencionadas, puede deberse: a) que el RNAt utilizado sea capaz de una manera directa, de promover la síntesis y/o liberación de estas linfocinas de los almacenes intracelulares; b) la producción de IFN- γ ya observada es quien influye⁹, en la síntesis del IFN- γ e indirectamente en la producción del factor de necrosis tumoral.

Especulando con respecto a la primera opción, recordemos que ha sido descrito que la administración de inductores semejantes al utilizado en este trabajo a células no pertenecientes al sistema inmune (fibroblastos) induce la síntesis de pequeñas cantidades de IFN- γ ¹¹; se ha observado además con la aplicación de oligonucleótidos sintéticos a cultivos de linfocitos humanos estimula la producción de IFN- α ,¹² así como pequeñas cantidades del IFN- β e IFN- γ . Sin embargo, se han encontrado cantidades muy pequeñas de interferón gamma, lo que no permitiría explicar los incrementos observados en algunos casos (sujetos 2-4, 6, 8, 9). Por tanto, consideramos como más factible la segunda opción tomando en cuenta la capacidad del RNAt como inductor de la síntesis del IFN- γ .

En relación a la concentración de IFN- γ encontrada en los sujetos, de acuerdo con algunos autores, estos valores se consideran elevados no obstante, es importante mencionar que se han observado diferencias en la concentración del IFN- γ en la población considerada como normal (control) en diferentes estudios, de acuerdo al país en donde se realizó la investigación (Suecia 132 pg/mL, India > 200 pg/mL¹³), sin que lo anterior indique la presencia de alguna patología. Otro punto interesante a resaltar es que por las características de los sujetos (población de estudio abierto, edad, y originaria de la ciudad de México), probablemente la concentración determinada de la linfocina se relacione con procesos inflamatorios o infecciosos a nivel subclínico que no han sido determinados (sujetos número 1, 2, 3, 4 y 6) en donde los niveles de las dos linfocinas estudiadas se encontraron elevados desde el inicio⁹.

Con respecto al TNF- α , los tres tipos de IFN pueden influir en su síntesis, actividad¹⁴, y en el número de sus receptores en la membrana celular, motivo por el cual fue importante cuantificar su concentración en el plasma de los sujetos a los cuales se aplicó el inductor de IFN. El aumento en la concentración del factor de necrosis tumoral, lo relacionamos directamente con el incremento en los niveles del IFN- γ , ya que este tipo de IFN es quien influye principalmente sobre su actividad y síntesis⁷, la concentración de esta linfocina en el plasma también muestra variación de acuerdo a la población (control) en la cual se determine¹³, y como se observa en los sujetos 2 y 6, muestran niveles elevados de la linfocina, y no tiene ninguna respuesta después de la aplicación del inductor, lo anterior ayuda también a fundamentar que probables procesos infecciosos o inflamatorios están influyendo en los niveles basales de las linfocinas estudiadas. Encontramos que la produc-

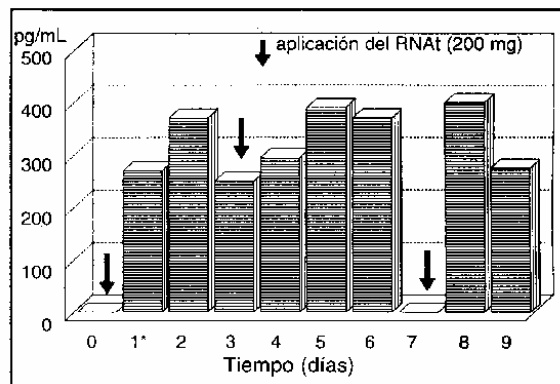


Figura 2. Determinación del TNF- α en el plasma de un sujeto al que se aplicó un RNAt.

* = determinación a las dos horas de aplicado el inductor
0 = valores basales

ción del TNF- α tiene significancia estadística a las dos horas de administrado el RNAt.

Los resultados obtenidos fundamentan seguir trabajando con este tipo de inductor, porque aun con aplicaciones repetidas del inductor se observan diferencias en la concentración de las linfocinas estudiadas (a niveles claramente significativos) (Figura 1 y 2); es interesante por tanto, probar el inductor en un mayor número de individuos normales, así como en modelos experimentales de neoplasias o de infecciones; ya que es posible esperar la producción del IFN- γ , del IFN- α así como del TNF- α , los cuales cumplen importantes funciones en el control de estos padecimientos.

REFERENCIAS

1. Torrence FP, De Clercq E. *Interferon Inducers: General Survey and Classification*. Methods in Enzymology. 1981; 78: 291-299.
2. Kunder SC, Wu L, Morahan PS. *Protection Against Murine Cytomegalovirus Infection in Aged Mice and Mice with Severe Combined Immunodeficiency Disease with the Biological Response Modifiers Polyribosinic-Polycytidylic Acid Stabilized with L-lysine and Carboxymethylcellulose, Maleic Anhydride Divinyl Ether and Colony Stimulating Factor 1*. Antiviral Res 1993; 21: 233-245.
3. 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.
4. 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.
5. Witt PL, Zahir S, Ritch PS, Mc Auliffe TM, Ewel CH, Borden EC. *Phase I/II Study of Polyadenylic-polyuridylic Acid in Patients with Advanced Malignancies: Clinical and Biologic Effects*. J Interferon Cytokine Res 1996; 16: 631-635.