

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 sincitial respiratorio utilizando un ARN de transferencia

Biól. Noé Alvarado Vázquez*
M. en C. Julio Raúl Santiago Cruz †
Dra. Susana Alcázar Leyva §
M. en C. Ma. Teresa Benítez Rodríguez §
QFB. Carlos Castellanos II
Dr. Pedro Zamudio Cortés*

Palabras clave: Interferones, inductores de interferón, inhibidores virales, antivirales.
Key words: Interferons, interferon inducers, virus inhibitors, antiviral agents.

RESUMEN

El interferón (IFN) es una linfocina con actividad inmunomoduladora, antitumoral y antiviral; por esta razón en numerosos laboratorios se trabaja intensamente en la búsqueda de nuevas moléculas capaces de inducir su producción de manera natu-

ral en el organismo humano, y de este modo utilizarlas contra diferentes padecimientos (virales y tumorales). Con este fin, en el presente trabajo se evaluó la capacidad de un ARN de transferencia (ARNt) de origen fúngico, como agente inductor de la síntesis de interferón tanto *in vivo* como *in vitro*. Para esto, se aplicaron por vía intramuscular 200 mg del inductor a siete sujetos clínicamente sanos; a cada uno de ellos se les tomó dos muestras de sangre para obtener el plasma, una antes de la aplicación del ARNt y otra 2 horas después. A las muestras de plasma se les determinó el nivel de interferón mediante la técnica de inhibición del efecto citopático utilizando el virus de la estomatitis vesicular. Los niveles de interferón en los plasmas variaron de 10 a 320 unidades internacionales (UI) por mL, antes de la aplicación y de 80 a 1,280 UI/mL 2 horas después de la misma, al realizar el análisis estadístico las diferencias encontradas fueron significativas.

* Departamento de Investigación en Farmacología, INER.
† Departamento de Investigación en Virología, INER.
§ Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C.
II Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Correspondencia:
Biól. Noé Alvarado Vázquez. Departamento de Investigación en Farmacología. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan 4502, col. Sección XVI. México, D.F., 14080
Trabajo recibido: 28-IV-97. Aceptado: 18-VI-97

Para valorar la capacidad del ARNt en la protección contra las infecciones virales *in vitro*, se incubaron células Vero con diferentes concentraciones del ARNt durante 24 h, posteriormente se infectaron con adenovirus tipo 6 (AV-6), virus de herpes simple tipo 1 (VHS-1) o virus sincitial respiratorio (VSR), los cultivos se incubaron cinco días adicionales y se cuantificó el efecto del inductor sobre la multiplicación viral. Los cultivos incubados previamente con el ARNt de origen fúngico, e infectados posteriormente con uno de los virus mencionados, presentaron menor daño citopático que los cultivos usados como controles virales; dicha reducción del efecto citopático fue dependiente de la dosis. Los resultados indican que el ARNt utilizado es capaz de estimular la síntesis de IFN *in vivo* e *in vitro*, lo cual abre la posibilidad de utilizarlo en el tratamiento de las infecciones virales, sólo o en combinación con antivirales ya conocidos.

ABSTRACT

Interferon (IFN) is a lymphokine with immunomodulatory, antitumoral and antiviral activity, and thus a number of laboratories are intensively searching for new chemical agents with the capacity to induce IFN production in the human body, in order to use them against different diseases (viral, tumoral). In the present study we evaluated the ability of a fungal transfer RNA (tRNA) to induce interferon synthesis both in *in vivo* and *in vitro* conditions. We administered by the intramuscular route 200 mg of the presumptive inducer agent to 7 clinically healthy subjects. Two samples of blood were taken from each subject, the first one just before administration of tRNA and the other 2 hours later. From this samples, plasma was obtained and the IFN level was determined by the cytopathic-effect inhibition assay using the stomatitis vesicular virus. Plasmatic IFN levels ranged from 10 to 320 international units (IU) per mL before the inducer administration, and from 80 to 1280 IU/mL 2 hours later. These differences were statistically significant.

The fungal tRNA was also evaluated as for its ability to protect against an *in vitro* infection by three different viruses. Vero cells were incubated for 24 h with different concentrations of the tRNA, and then infected with type 6 adenovirus (AV-6), type 1 herpes simplex virus (HSV-1) or respiratory syncytial virus (RSV). Infected cells were further incubated for 5 days, and the inducer effect on the *in vitro* viral replication was quantified. The infected cells previously treated with the fungal tRNA showed lesser cytopathic effect than the control infected cell, and such response was dose-dependent.

Our results indicate that the fungal tRNA stimulates IFN synthesis *in vivo* and *in vitro*, raising the possi-

bility to use it in the treatment of viral infections, alone or in combination with the traditional antiviral agents.

INTRODUCCION

El tratamiento específico de las infecciones virales está mucho menos desarrollado que el de las infecciones bacterianas, hasta el momento se han encontrado muy pocos agentes antivirales efectivos contra los más de 400 virus que infectan al ser humano. Un grupo viral muy importante son los adenovirus (AV), los cuales tienen una distribución mundial y causan infecciones agudas del aparato respiratorio, genitourinario, digestivo, así como de la conjuntiva. Además, pueden producir infecciones crónicas¹. Los virus de herpes simple tipo 1 y tipo 2 (VHS-1, o -2), también tienen una alta prevalencia en la población, se encuentran implicados en infecciones activas de epitelios y en infecciones persistentes del sistema nervioso central; producen el herpes labial y el genital, causando infecciones sistémicas y encefalitis en recién nacidos así como en sujetos inmunodeficientes².

El virus sincitial respiratorio (VSR), es un importante agente causal de enfermedades del tracto respiratorio, tiene una distribución mundial. Este virus está entre los principales causantes de infecciones nosocomiales respiratorias en pabellones pediátricos, frecuentemente se presenta en bronquiolitis y neumonías en niños pequeños³. No hay vacunas comerciales contra los tres tipos de patógenos mencionados.

Lo expuesto, confirma la importancia de estudiar nuevos compuestos para utilizarlos en el tratamiento de este tipo de infecciones, los que solos o en combinación con los agentes terapéuticos tradicionales ayuden a controlar mejor el proceso infeccioso. Esto es de gran importancia, ya que constantemente aparecen cepas resistentes a los fármacos utilizados comúnmente para su control (iododesoxiuridina, aciclovir, ribavirina, etc.), y si tomamos en cuenta la capacidad que los virus tienen por sí mismos para evadir la vigilancia del sistema inmune⁴, el panorama se complica. Se ha observado que para mantenerse en el huésped los virus tienen diversos mecanismos; por ejemplo, los adenovirus pueden promover la producción de moléculas que antagonizan la acción del interferón (IFN), de los linfocitos T citotóxicos y del factor de necrosis tumoral⁵, y pueden alterar los mecanismos de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I⁶; otro tipo de virus, el VIH, es capaz de inducir la síntesis de tipos de interferón aberrante que muestra poco o un nulo efecto en su multiplicación⁷.

En el presente trabajo, se utilizó un ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) de origen fúngico como inductor de la síntesis de IFN, y se valoró su capacidad como agente inductor en humanos, así como su efecto en la replicación *in vitro* de: adenovirus tipo 6 (AV-6), virus de herpes simple tipo 1 (VHS-1) y virus sincitial respiratorio (VSR).

Como antecedentes, tenemos que este tipo de ARNt se ha usado con anterioridad para el control de la enfermedad de Newcastle, leucosis aviaria de tipo Marek y para el

cólera porcino (datos no publicados), con buenos resultados. Por las características de la molécula utilizada, se agrupa dentro de los compuestos considerados como inductores de la síntesis de interferón alfa y beta. Un inductor de IFN, es una molécula que al interactuar con diferentes tipos celulares (leucocitos, fibroblastos, linfocitos, etc.), es capaz de promover la producción de esta linfocina (como ejemplos de inductores, se mencionan al poly I:C, poly A:U, etc.). La capacidad del ARNt utilizado como promotor de la producción de IFN en este trabajo, está apoyado por resultados previos⁸. Actualmente, se utilizan diversos tipos de compuestos como inductores de IFN, buscando promover de manera importante su producción endógena y poder explotar terapéuticamente las características de estas linfocinas. Inductores de la síntesis del IFN, con características semejantes al que usamos, se han empleado para tratar las infecciones intracraneales por alfavirus⁹, como inhibidor del virus herpes 6 *in vitro*¹⁰, para el tratamiento de HIV-1¹¹ sólo o en combinación con el AZT¹², y en el tratamiento del virus B de la hepatitis¹³, etc.

Por lo mencionado anteriormente, los objetivos de esta investigación son: comprobar que la utilización del ARNt puede reducir la multiplicación viral *in vitro* de diferentes tipos de virus y promover, además, la producción de IFN *in vivo*.

MATERIAL Y METODOS

Virus

Se utilizaron el VSR cepa Long; el virus de herpes simple tipo 1 (VHS-1) cepa McIntyre (donado por la Dra. Blanca Lilia Barrón Romero de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional, México D.F.); y el adenovirus tipo 6 (AV-6) (Bio Whittaker, Inc.). Los virus se propagaron en células Vero (línea celular obtenida a partir del riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) a una multiplicidad de infección de 0.01 ufp/mL; y se titularon en el mismo tipo de células, para lo cual se diluyeron en serie de 1:10 en medio esencial mínimo con penicilina 100 UI/mL y estreptomycin 100 ug/mL (Sigma Chemical Co.) (en lo sucesivo denominado medio incompleto), y se inocularon por triplicado en monocapas confluentes de células en placas de cultivo múltiples de 96 pozos (NUNC, Co.). Los virus se dejaron adsorber durante 1 hora, se retiró el inóculo y se agregó medio incompleto suplementado con metilcelulosa 0.5% (Sigma Chemical Co.). La placa múltiple se incubó a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, para el VHS-1 dos días, nueve días para el VSR y el AV-6.

Efecto del ARNt de origen fúngico en la multiplicación *in vitro* de los virus AV-6, VHS-1 y VSR

En placas de cultivo de 24 pozos (NUNC, Co.), se sembraron 200,000 células Vero en cada uno en medio incompleto suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma Chemical Co.). Se incubaron las células durante 24 horas para la formación de monocapas, se adicionó al ARNt (Hypatia) a las siguientes concentraciones: 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 6 0.0 mg/mL en medio incompleto, cada

concentración se probó por triplicado, y se incubó la caja múltiple durante 24 horas. Al término de este tiempo se lavaron los pozos con solución salina de fosfatos (PBS) dos veces, y se infectaron dejando adsorber una hora el virus correspondiente; con 100 unidades formadoras de placas por pozo (ufp/pozo) del VSR y del VHS-1 o con 50 DICT al 50% del AV-6, los tres virus fueron diluidos en medio incompleto.

A los cinco días, se retiró el medio de cultivo y se tiñó cada pozo con 500 µL de colorante cristal violeta (SIGMA Chemical, Co.) (0.2% p/v en metanol al 70%), durante 15 minutos, los pozos fueron lavados con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante. Se contaron las placas virales en el caso del VHS-1 y VSR. Para el adenovirus se solubilizó el colorante de las monocapas utilizando ácido acético al 33% y se llevó la placa a un espectrofotómetro para medir las absorbancias a una longitud de onda de 570 nm; en este caso, la absorbancia es directamente proporcional al porcentaje de células viables que sobreviven después de la infección viral.

Inducción de la producción de IFN *in vivo*

Se estudiaron siete voluntarios clínicamente sanos. El rango de edad fue de los 38 a los 68 años de edad, con una media de 51 años. A cada uno de los voluntarios se les tomó una muestra con jeringa heparinizada de 5 mL de sangre en ayunas, en condiciones estériles, inmediatamente después se aplicó a cada uno 200 mg por vía intramuscular del ARNt. A las dos horas se tomó una nueva muestra de sangre bajo las mismas condiciones. Ambas muestras se centrifugaron a 1,300 rpm durante 10 minutos, se recolectó el plasma y se congeló a -70° C hasta su utilización.

En uno de los sujetos se llevó a cabo un seguimiento durante nueve días, aplicándole en los días 1, 3 y 7 el ARNt, a la dosis ya señalada. Se siguió el mismo procedimiento de toma de muestra todos los días, durante el tiempo que se realizó el estudio.

Determinación de IFN en plasma

El interferón se cuantificó en los plasmas mediante la técnica de inhibición del efecto citopático¹⁴. En placas de cultivo de 96 pozos se colocaron las muestras de los plasmas a titular, diluidas con medio RPMI-1640 al 10% de suero fetal de ternera de complementado (RPMI-10). En el primer pozo de la placa, de cultivo, se colocaron 200 µL de la dilución inicial del plasma y en cada uno de los siguientes se colocaron 100 µL de RPMI-10, todas las diluciones utilizadas se hacen por triplicado, transfiriendo 100 µL de un pozo al siguiente de manera sucesiva hasta el final de la línea. En cada placa de cultivo doce pozos fueron utilizados como controles, funcionando seis como control celular y seis como control viral.

En cada pozo se sembraron 30 000 células HEp-2 (línea celular obtenida de un carcinoma epidermoide humano), en un volumen de 100 µL de RPMI-10 y se incubaron por 24 horas a 37° C. Al término de este tiempo, se infectó cada pozo con 500 unidades formadoras de placas del virus de la

estomatitis vesicular (VSV) en 50 μ L de medio de cultivo. La placa se incubó hasta que los controles virales muestran entre un 90-100% de efecto citopático (aproximadamente a los tres días); posteriormente, se retiró el medio de cultivo, se tiñó con cristal violeta de acuerdo al procedimiento que ya se mencionó, y se leyeron las placas. El título del IFN se toma como el inverso de la dilución que dio el 50% de protección del efecto citopático del VSV (reducción al contar las placas virales del 50% respecto al control viral).

Análisis estadístico

Se realizó la prueba estadística de Dunnet con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

Para demostrar que el ARNt utilizado en esta investigación es capaz de dar protección ante una infección viral *in vitro*, se incubaron cultivos celulares con diferentes concentraciones de esta molécula y posteriormente, se infectaron con alguno de los virus que ya se mencionaron.

En los resultados se observó, que los cultivos incubados con el ARNt e infectados después con el VSR, mostraron una disminución en la multiplicación viral de manera dosis-dependiente, la concentración del inductor que dio un mayor grado de protección fue la de 5 mg/mL, en donde se encontró una reducción de hasta el 60% aproximadamente en el número de placas virales (Figura 1).

Con respecto a los cultivos que se incubaron con el inductor y se infectaron con el VHS-1, se vio un comportamiento similar; es decir, una inhibición de la replicación viral dependiente de la dosis (Figura 2), la concentración de ARNt que vuelve a mostrar el mayor grado de protección nuevamente fue la de 5 mg/mL, con una reducción en el número de placas virales cercano al 60%.

Para el AV-6, se observa en la Figura 3 que la utilización del ARNt a 5 mg/mL da la mejor respuesta. La concentración más alta utilizada del ARNt dio un grado de protección de un poco más del 50%, lo que se visualiza en la figura

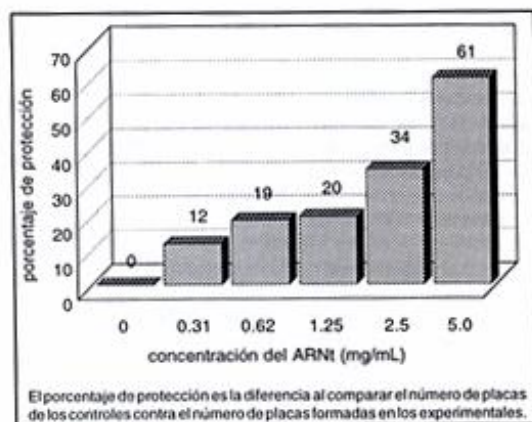


Figura 1. Efecto del ARNt en la replicación del VSR.

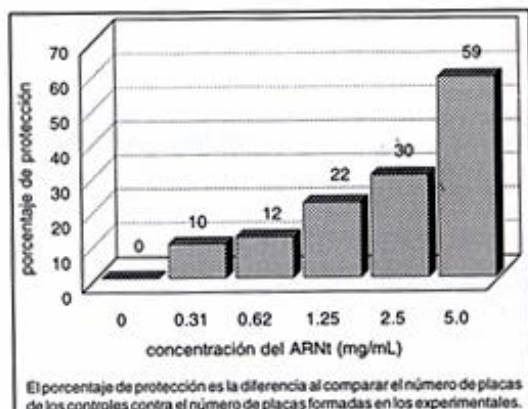


Figura 2. Efecto del ARNt en la replicación del VHS-1.

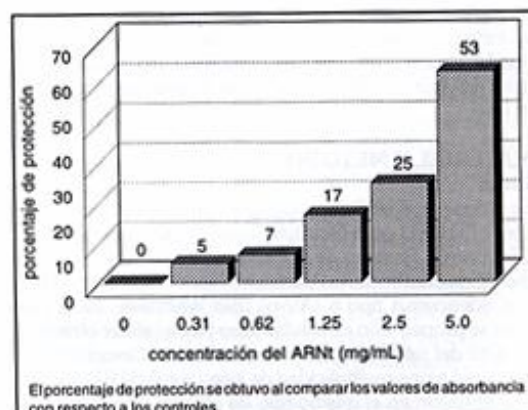


Figura 3. Efecto del ARNt en la replicación.

mencionada, nuevamente se vio una inhibición de la multiplicación del virus de manera dosis-dependiente.

Para comprobar si el efecto de protección observado contra la infección viral *in vitro*, se debía a la presencia del IFN, se realizó el experimento *in vivo* en donde se aplicó a siete individuos clínicamente sanos el ARNt por vía intramuscular. Es importante recalcar que cada uno de ellos al estar libres de alguna patología funcionan como su propio control, y que el aspecto interesante, es encontrar si con la aplicación del inductor se da la producción de la linfocina mencionada.

La propuesta anterior se verificó, al realizar la determinación de los niveles de IFN en el plasma de dichos sujetos; las concentraciones de la linfocina después de la aplicación del inductor se vieron incrementadas de una manera estadísticamente significativa al compararse con los valores basales de IFN de los individuos. El intervalo en la

concentración de IFN antes de la aplicación del inductor (niveles basales) se encontró en un rango de 10 a las 320 UI, con una media de 90 ± 115.7 UI. Al realizar la medición del IFN a las dos horas de la administración de los 200 mg del ARNt, el rango se ubicó entre las 80 y 1280 UI, con una media de 440 ± 417.6 UI (Tabla I). Como se puede ver, todos los sujetos mostraron un aumento en sus concentraciones de IFN con la aplicación del inductor, si bien esta respuesta fue muy variable. El análisis estadístico, nos demostró que la diferencia observada en los niveles de IFN, encontrados antes y después de la aplicación del inductor de la síntesis de IFN, fueron significativas ($p < 0.05$).

Al sujeto número uno se le midió los niveles de IFN durante un lapso de nueve días, se observó que de un valor inicial de IFN de 40 U/mL antes de administrarle por primera vez la molécula inductora, se incrementó hasta 320 U/mL con la administración del ARNt. Cuando se aplicó por segunda ocasión, se observó un aumento en los niveles hasta las 2,560 U/mL, niveles que disminuyeron 72 horas después a 320 U/mL. Con el tercer y último estímulo, se encontró un nuevo incremento hasta 1,280 unidades, con un descenso posterior a 640 U/mL en el último registro realizado (Figura 4).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La búsqueda de moléculas capaces de desencadenar la producción de IFN endógeno, se ha realizado desde mucho tiempo atrás, para ello se han utilizado compuestos químicos como las arilpirimidinas¹⁵, polirribonucleótidos sintéticos¹⁶, o bien virus como el de Sendai¹⁷, se han usado principalmente para intentar controlar padecimientos virales o tumorales, aprovechando la capacidad como inmunomodulador del IFN producido con el agente inductor. Uno de los compuestos que se han utilizado en mayor grado a nivel experimental es el poly(I):poly(C), el cual es un polirribonucleótido sintético, que se ha empleado en el tratamiento del cáncer así como para el control de infecciones virales y bacterianas^{18,19}. La utilización de los inductores

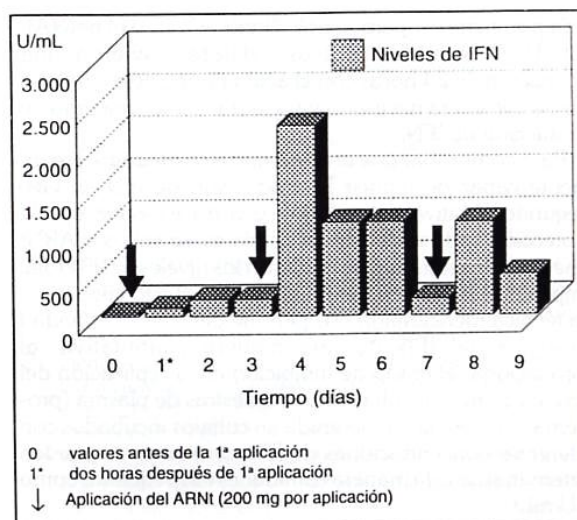


Figura 4. Determinación de IFN total por la técnica de inhibición del efecto citopático.

de IFN, empero, presenta numerosos problemas, como lo es la pobre inducción de la producción de IFN²⁰.

También se ha observado, que con las aplicaciones repetidas del inductor se va dando una disminución en la capacidad de respuesta del individuo (producción de IFN); un problema adicional es la toxicidad para el individuo en el cual se aplica, debido a las concentraciones extremadamente altas que en algunos casos es necesario administrar²¹. Lo anterior, afirma la necesidad de seguir en la búsqueda de moléculas capaces de inducir la producción endógena de IFN, y que además muestren lo menos posible, los problemas de otras moléculas usadas como inductores. Estos nuevos compuestos deben ser capaces de funcionar solos o en combinación con los agentes terapéuticos tradicionales, ayudando a un mejor control no sólo de las infecciones virales, sino incluso de problemas como los tumorales o bacterianos^{19,22}.

Las características de la molécula utilizada como agente inductor en este trabajo, y el tipo de enfermedades en las cuales se ha utilizado (cólera porcino, enfermedad de Newcastle), nos hizo suponer que la regulación de estas infecciones podría ser por medio de la producción de IFN, lo que sin embargo, no se había comprobado, por lo cual los objetivos principales de esta investigación, están enfocados a comprobar que con la utilización del ARNt, se puede reducir la replicación viral *in vitro* y además, inducir la producción de IFN *in vivo*.

Los resultados que se obtuvieron *in vitro*, indican que efectivamente el ARNt ayuda a disminuir el número de placas virales o bien, el número de células dañadas por el agente viral, en donde el grado de protección se incrementa de una manera dosis dependiente. Con respecto a las concentraciones aplicadas, al compararlas con las utilizadas para otros inductores se pueden considerar altas, como

Tabla I. Valores de IFN total en plasma.

Sujeto #	Muestra antes de la aplicación del ARNt, UI de IFN	Muestra 2 horas después de la aplicación del ARNt, UI de IFN	Edad de los sujetos
1	40	320	38
2	20	160	45
3	20	320	53
4	10	160	56
5	320	1280	59
6	10	80	38
7	160	640	68
$\bar{X} \pm S.D$	82 ± 117.2	$422 \pm 420.0^*$	$\bar{x} = 51$

(*diferencia significativa, $p < 0.05$)

sería por ejemplo, para el poly(I):poly(C)²¹, o el poly(A):poly(U)²². Nuestros cultivos celulares tuvieron una incubación de 24 horas con el ácido ribonucleico, tiempo que se considera necesario para lograr el pico máximo de producción de IFN.

Para comprobar que el ácido nucleico utilizado, era un agente capaz de inducir la producción de IFN *in vivo* (segundo objetivo del trabajo), y correlacionarlo con la protección dada a los cultivos celulares, se aplicó el ARNt a siete sujetos testigo, y se midieron los niveles de IFN total empleando la técnica de inhibición del efecto citopático. La técnica mencionada nos permite detectar la actividad biológica del IFN de una manera cuantitativa, al correlacionar el grado de inhibición en la replicación del VSV en cultivos incubados con muestras de plasma (problema) y la inhibición obtenida en cultivos incubados con diferentes concentraciones de IFN comercial, se pueden determinar de esta manera cantidades tan pequeñas como 2 U/mL²³.

Los resultados muestran que los niveles basales de IFN total en los sujetos estaban en un rango de 10 a 320 U/mL, valores que se encuentran dentro de los niveles que se consideran como normales en el individuo (rango de < 10 hasta 300 U/mL)^{8,24}. El análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos, muestran que son estadísticamente significativos los incrementos observados en los niveles de IFN en plasma, después de la aplicación del inductor (80-1280 UI/mL); e interesantemente éstos se dan con sólo dos horas de inducción, mientras que para otros agentes de este tipo se necesitan por lo menos 12 horas. La comparación adicional con un grupo de sujetos control (sin inductor), a los cuales se inyectó solución salina y no mostraron ningún incremento en sus niveles de IFN plasmático (datos no mostrados), nos permite afirmar que la presencia de la molécula utilizada como inductor es la promotora de la síntesis del IFN, dando como resultado, la elevación de los niveles de esta linfocina en el plasma. Los niveles obtenidos de la linfocina en nuestros sujetos, nos muestran la gran heterogeneidad que existe entre los individuos en cuanto a sus niveles de IFN, tanto antes como después de la aplicación del estímulo. Al considerar las diferencias de edades, se esperaba que algunos de ellos tuvieran valores diferentes a los esperados como normales, se sabe que en las personas de edad avanzada se pueden mostrar decrementos en poblaciones celulares importantes para la producción de IFN; no obstante, no se observaron diferencias que pudieran considerarse como significativas, ya sea en sus niveles basales o bien, en la capacidad de respuesta ante el estímulo dado por la presencia del ARNt, con excepción del sujeto número cinco el cual a pesar de ser de los sujetos de mayor edad, tuvo el incremento más marcado de todos los individuos (1280 UI/mL)²⁵.

Ante la imposibilidad de hacer el seguimiento durante más días a todos los sujetos y con la finalidad de seguir la curva de producción de IFN; a uno de ellos se le midieron sus niveles de IFN durante nueve días, con aplicaciones del ARNt en distintos tiempos (días 1, 3 y 7) (Figura 4). Se

encontró que el sujeto fue capaz de responder ante diferentes estímulos dados por el inductor; lo cual, aunque se trata de un solo sujeto, da la pauta para seguir el estudio con un mayor número de individuos; lo anterior es importante, ya que uno de los diferentes problemas que se encuentran con el uso de inductores de IFN, tiene que ver con la pérdida de respuesta ante el estímulo repetido con este tipo de moléculas²¹. Otro aspecto interesante, es que ha sido reportado que al aplicar un inductor de IFN, generalmente los niveles de la linfocina regresan a sus niveles basales en 24 horas; no obstante, en este caso se observó que éstos se mantuvieron elevados (con respecto a la basal) por más de 48 horas, ello nos permite suponer que el ARNt es capaz de soportar por más tiempo los procesos de degradación naturales del organismo, lo mencionado es otro problema adicional en la utilización de moléculas de este tipo, el organismo es capaz de desecharlos rápidamente y disminuir de esta manera su capacidad como agente promotor de la síntesis de IFN.

Un aspecto adicional e interesante que se desprende de este trabajo (y en el cual nos encontramos trabajando), reside en determinar qué subtipos de IFN (IFN-alfa principalmente) se producen con la aplicación del ARNt utilizado, los cuales cumplen distintas funciones dentro del organismo y que además poseen diferentes grados de actividad inmunorreguladora, antiviral y antitumoral⁷.

Todo lo anterior nos permite concluir, que este inductor podría mediante la inducción de la síntesis de IFN proteger al ser humano de infecciones producidas por estos virus. Los resultados obtenidos nos sugieren además, que es factible su utilización con fines terapéuticos, tal y como se ha propuesto²⁶, utilizando su capacidad como inductor de IFN y usándolo en combinación con los tratamientos tradicionales de control viral. Es importante mencionar, que este tipo de molécula tiene por tanto, un amplio panorama de acción en el tratamiento de afecciones tumorales o en contra de infecciones bacterianas, de manera análoga a otros inductores^{9-11,13,15,22}.

REFERENCIAS

1. Horwitz MS. *Adenovirus*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 2149-2172.
2. Whitley RJ. *Herpes Simplex Viruses*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 2297-2302.
3. Manjarrez ZME. *Virus sincitial respiratorio y su participación en las infecciones respiratorias agudas*. Rev Inst Nal Enf Resp Méx 1991; 4: 161-169.
4. Paroli M, Barnaba V. *Strategies Used by Viruses to Evade the Immune Response*. Ital J Gastroenterol 1995; 27: 133-136.
5. King RW, Simon EH. *The Virion of Mengovirus Contains Anti-interferon Activity*. J Int Research 1993; 13: 1-7.
6. Ohno S. *MHC Evolution and Development of a Recognition System*. Ann N Y Acad Sci 1994; 712: 13.
7. McNair AN, Kerr IM. *Viral Inhibition of the Interferon System*. Pharmacol Ther 1992; 56: 79-95.

- plasma de pacientes tratados con un ARNt (HAM). (Tesis)* México: Fac de Ciencias UNAM, 1994.
9. Coppenhaver DH, Singh TP, Sarzotti M, Levy HB, Baron S. *Treatment of Intracranial Alphavirus Infections in Mice by a Combination of Specific Antibodies and an Interferon Inducer.* Am J Trop Med Hyg 1995; 52: 34-40.
10. Ablashi DV, Berneman ZN, Williams M, Strayer DR, Kramarsky B, Suhadolnik RJ, et al. *Ampligen Inhibits Human Herpesvirus-6 in vitro.* In Vivo 1994; 8: 587-591.
11. Lee SW, Gallardo HF, Gaspar O, Smith C, Gilboa E. *Inhibition of HIV-1 in CEM Cells by a Potent TAR Decoy.* Gene Ther 1995; 2: 377-384.
12. Gillespie D, Hubbell HR, Carter WA, Midgett P, Elsasser W, Mullaney R, et al. *Synergistic Inhibition of AZT-resistant HIV by AZT Combined with poly(I):poly(C12U). Without Synergistic Toxicity to Bone Marrow Progenitor Cell Elements.* In Vivo 1994; 8: 375-381.
13. Ijichi K, Mitamura K, Ida S, Machida H, Shimada K. *In vivo Antiviral Effects of Mismatched Double-stranded RNA on Duck Hepatitis B Virus.* J Med Virol 1994; 43: 161-165.
14. Rubinstein S, Familletti CP, Pestka S. *Convenient Assay for Interferons.* J Virol 1981; 37: 755-758.
15. Onishi T, Machida T. *A Study on Direct Antitumor Activity of Bropiramine (Oral Interferon Inducer) for Renal Cell Carcinoma.* Acta Urol Jap 1994; 40: 195-260.
16. Black PL, McKinnon KM, Wooden SL, Ussery MA. *Antiviral Activity of a Synthetic Double-stranded Polynucleotide Interferon Inducer in a Murine AIDS Retrovirus Model. Role of Augmentation of Natural Killer Cell Activity and Synergy with Oral AZT.* Ann NY Acad Sci 1993; 685: 467-470.
17. Megyeri K, Au WC, Rosztoczy T, Raj NR, Miller RL, Tomai MA, et al. *Stimulation of Interferon and Cytokine Gene Expression by Imiquimod and Stimulation by Sendai Virus Utilize Similar Signaling Transduction Pathways.* Mol Cell Biol 1995; 15: 2207-2218.
18. Thompson KA, Strayer DR, Salvato PD, Thompson C, Klimas N, Molavi A, et al. *Results of a Double-blind Placebo-controlled Study of the Double-stranded RNA Drug poly(I):poly(C12U) in the Treatment of HIV Infection.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 580-587.
19. Puri SK, Dutta GP, Levy HB, Maheshwari RK. *Poly ICL Inhibits Plasmodium Cynomolgi B Malaria Infection in Rhesus Monkeys.* J Interferon Cytokine Res 1996; 16: 49-52.
20. Milhaud PG, Compagnon B, Bienvenue A, Philippot J. *Interferon Production of L929 and HeLa Cells Enhanced by Polyribonucleosinic Acid-polyribocytidylic Acid pH-sensitive Liposomes.* Bio Chem 1992; 3: 402-407.
21. Hendrix CW, Margolick JB, Petty BG, Markham RB, Nerhoo L, Farzadegan H, et al. *Biological Effects After a Single Dose of poly(I):poly(C) in Healthy Volunteers.* Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 429-435.
22. Witt PL, Zahir S, Ritch PS, McAuliffe TM, Ewel CH, Borde 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.
23. Lebon P, Daffos F, Checoury A, Grangeot-keros L, Foresti F, Toubanc JE. *Presence of an Acid-labile Alpha-interferon in Sera From Fetuses and Children with Congenital Rubella.* J Clin Microbiol 1985; 21: 775-778.
24. Bocci V. *The Physiological Interferon Response.* Immun Today 1985; 6: 7-9.
25. Ben-Yehuda A, Weksler ME. *Host Resistance and the Immune System.* Clin Geriatr Med 1992; 8: 701.
26. Alcázar MH. *Historia de una investigación biológica.* México: Elarteh, 1988: 128.