




Evaluación de la acción inmunomoduladora del Extracto Dializable Leucocitario de Caballo con actividad de Factor de Transferencia en Hipersensibilidad tipo I en roedores

Evaluation of the immunomodulatory action of the Horse Leukocyte Dialyzable Extract with Transfer Factor activity in Hypersensitivity type I in rodents

Alarcón Bonilla, Jesús , Rodríguez Meléndez, Israel J.  y Cerón Montes Genaro I. 

Universidad Tecnológica de Tecámac, División Químico Biológicas, 55749, Tecámac, Estado de México, México.

Resumen

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I (alérgicas) presentan una respuesta inmune a antígenos ambientales. Están implicados linfocitos B productores de IgE provocando un choque anafiláctico. Una alternativa de tratamiento es el Factor de Transferencia (FT), obtenido del lisado de células linfoides, con pesos moleculares entre 3.5 y 5 kDa, con actividad inmunomoduladora interespecífica. Se seleccionó al caballo para la obtención del FT, a partir de la lisis de células sanguíneas, ultrafiltración e identificación de péptidos. Se obtuvo el FT, con un 51.3% más concentrado comparado con el FT comercial con un patrón electroforético similar. A partir del FT equino se evaluó su efecto inmunomodulador en alergias en cobayo previamente sensibilizado con ovoalbúmina. Los grupos de cobayos fueron: - A: sensibilizados con ovoalbúmina, B: que se le administró el FT humano, C: que se le dosificó FT de caballo y D: que no se le administró FT. El FT equino registró un efecto inmunomodulador sobre las reacciones alérgicas equivalente al presentado con el FT humano, por tanto, se propone como una alternativa para el tratamiento de alergias en humanos.

Palabras Clave:

Alergias, Extracto Dializable Leucocitario, Factor de Transferencia, Inmunodifusión, Ultrafiltración.

Abstract

Type I (allergic) hypersensitivity reactions present an immune response to environmental antigens. IgE producers as Lymphocytes B are implicated causing an anaphylactic shock. An alternative treatment is Transfer Factor (TF), obtained from lymphoid cell lysate, with molecular weights between 3.5 and 5 kDa, with interspecific immunomodulatory activity. The horse was selected to obtain the TF, from the lysis of blood cells, ultrafiltration and identification of peptides. TF was obtained, with 51.3% more concentrated compared to commercial TF with a similar electrophoretic pattern. From equine TF, its immunomodulatory effect on allergies was evaluated in guinea pigs previously sensitized with ovalbumin. The groups of guinea pigs were: A: sensitized with ovalbumin, B: those which human TF was administered, C: those which horse TF was dosed and D: those which TF was not administered. Equine TF registered an immunomodulatory effect on allergic reactions equivalent to that presented with human TF, therefore it is proposed as an alternative for the treatment of human allergies.

Keywords:

Allergies, Immunodiffusion, Leukocyte Dialyzable Extract, Transfer Factor, Ultrafiltration.

1. Introducción

Desde 1954 Lawrence et al. (1969) realizaron estudios inmunológicos a fin de encontrar factores que protegieran y que confirieran inmunidad a pacientes con padecimientos infecciosos (Lawrence y Borkowsky, 1983). En sus experimentos demostraron que las células mediadoras de inmunidad podían ser transferidas de un individuo sensibilizado a otro no sensibilizado y que existía en el plasma sanguíneo del primero, un factor de transferencia (FT) con un efecto restaurador de los mecanismos reguladores de

la actividad de linfocitos T y sus subpoblaciones (Vicuña, 2006).

En 1956, Lawrence y Pappenheimer descubrieron que leucocitos humanos de sangre periférica lisados, provenientes de individuos que tenían una hipersensibilidad cutánea de tipo tardío (HCT) a un antígeno (Lawrence et al., 1969), transferían una respuesta positiva en los receptores que anteriormente no eran reactivos (Huerta, 2002). El FT se obtiene a partir de un Extracto Dializable Leucocitario (EDL) que proviene de la lisis de leucocitos, o de células linfoides

*Autor para la correspondencia: jabbio@hotmail.com (Jesús Alarcón-Bonilla)

Correo electrónico: israelrodmel@gmail.com (Israel J. Rodríguez-Meléndez), ivan_gcm@hotmail.com (Genaro I. Cerón-Montes)

obtenidas del bazo, seguida de un proceso de diálisis, donde se obtiene la fracción de bajo PM. Puede obtenerse a partir de líneas celulares de un donante con una inmunidad celular elevada en respuesta a un antígeno de especificidad conocida. (Aldana et al., 2004).

El EDL contienen al menos 200 diferentes moléculas con PM entre 1 a 20 kDa, donde se encuentra un conjunto de proteínas con pesos moleculares entre 3.5 y 5 kDa con actividad de FT. Kirkpatrick (1993) determinó que los FT son pequeñas cadenas peptídicas, de 44 aminoácidos aproximadamente. Actualmente se conoce que son ocho aminoácidos los que se pueden combinar para crear billones de FT diferentes. Por tanto, el FT corresponde a una serie de péptidos hidrofílicos altamente polares, con partes ácidas y con dos regiones: una variable y una constante (Vicuña, 2006).

El EDL con actividad de FT son de hecho, un lenguaje celular universal y no provocan una reacción alérgica porque no son “de propiedad” de una especie en particular, por tanto, pueden cruzar la barrera interespecífica sin efectos adversos o pérdida de potencia. (Vicuña, 2006). El EDL suele operar en la parte alta de cascadas moleculares de la inmunidad mediada por células, además, provoca acciones en otros tejidos, órganos y sistemas, con efectos sobre canales de calcio, estimulando el transporte de este ion en las células (Kirkpatrick, 1993).

Sin embargo, al obtenerse el EDL con actividad de FT a partir de sangre humana, existe el riesgo potencial de contagio de enfermedades infecciosas, sobre todo virales como Hepatitis B, Hepatitis C, SIDA, entre otras (Aldana, 2004; Macías y Guaní-Guerra, 2019).

Se eligió a la sangre de caballo como fuente de suministro debido a la característica del EDL de presentar actividad entre especies diferentes (caballo – humano en específico), por un menor número de transmisión de zoonosis como Brucelosis y Encefalitis Equina (Blood, 2002), y por la mayor disponibilidad de sangre del caballo (54 a 63 L) (König, 2012) con respecto al humano (6 a 10 L) (Rodak, 2014). La selección de la ultrafiltración como método de obtención fue debido a su reproducibilidad, eficiencia y rapidez en la obtención del permeado, comparada con el método de diálisis (Homberg et al., 2013).

1.1 Reacciones de hipersensibilidad tipo I

Una reacción inmunitaria moviliza una gran cantidad de moléculas efectoras que tienen como finalidad remover el antígeno mediante diversos mecanismos. En general estas moléculas efectoras inducen una reacción inflamatoria localizada que elimina el antígeno sin lesionar de manera extensa los tejidos del huésped. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias esta reacción inflamatoria puede tener efectos nocivos y producir lesión tisular grave e incluso la muerte (Abbas et al., 2014).

El término anafilaxis, traducción laxa del griego para indicar lo contrario a profilaxis, describe una serie de reacciones excesivas. En el transcurso de una reacción inmunitaria humoral o una mediada por células pueden

presentarse reacciones de hipersensibilidad. Las reacciones anafilácticas iniciadas por anticuerpo o por complejos antígeno-anticuerpo se denominan hipersensibilidad inmediata porque los síntomas se manifiestan en minutos u horas después que el receptor sensibilizado hace contacto con el antígeno. La hipersensibilidad tardía (DTH) se denomina así para reconocer el retraso de los síntomas hasta días después de la exposición (Abbas et al., 2014).

Ciertas clases de antígenos conocidos como alérgenos inducen una reacción de hipersensibilidad tipo I y este fenómeno manifiesta todas las características de una reacción humoral normal. El alérgeno promueve una reacción humoral de anticuerpo para otros antígenos solubles, lo que resulta en la generación de células plasmáticas y células de memoria secretoras de anticuerpo. Prausnitz y Kustner demostraron por primera vez en 1921 la existencia de un factor sérico humano que reacciona con los alérgenos. Aunque la especificidad de esta reacción (llamada reacción P-K) para un alérgeno dado condujo a la hipótesis de que anticuerpos reagínicos o “fijadores a la piel” causaban la reacción, ello no se demostró sino hasta que se reveló la existencia de la clase de anticuerpo responsable de las reacciones alérgicas. Ishizaka et al., denominaron IgE a este nuevo isotipo en alusión al antígeno E de la ambrosía que emplearon para caracterizarlo (Murphy et al., 2017).

En individuos normales, la concentración sérica de IgE es la más baja de todas las clases de anticuerpo, en el intervalo de 0.1 a 0.4 g/mL; los individuos atópicos a menudo tienen 10 veces la concentración normal de IgE en su circulación. Aunque la vida media de la IgE en el suero es apenas de dos a tres días, una vez que esta inmunoglobulina se fija a su receptor en mastocitos y basófilos se mantiene estable en ese estado durante varias semanas. La persistencia de IgE en la superficie del mastocito puede atribuirse a la producción local de IgE en el tejido mucoso en caso de enfermedad alérgica y a la fuerte unión de la IgE con su receptor. Lo que distingue una reacción de hipersensibilidad tipo I de una reacción humoral normal es que las células plasmáticas secretan IgE en respuesta a la activación de células T2 específicas de alérgeno (Abbas et al., 2014).

El anticuerpo de esta clase se fija con gran afinidad a los receptores Fc sobre la superficie de los mastocitos tisulares y los basófilos sanguíneos; se dice que los mastocitos y basófilos cubiertos por IgE están sensibilizados. La exposición ulterior al mismo alérgeno enlaza de manera cruzada la IgE de membrana de los mastocitos y los basófilos, lo que produce desgranulación de estas células. Los mediadores con actividad farmacológica que se liberan de los gránulos actúan sobre los tejidos circundantes. Los efectos principales —vasodilatación y contracción del músculo liso— pueden ser generales o localizados según la magnitud de la liberación de mediadores (Abbas et al., 2014).

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata se manifiestan de varias formas, tales como alergias cutáneas y mucosas, alergias alimentarias, asma y anafilaxia sistémica. En la forma más extrema de anafilaxia, los mediadores elaborados por los mastocitos pueden provocar una contracción de las vías respiratorias que conduzcan a la

asfixia o a un colapso cardiovascular mortal (Abbas et al., 2014)

1.2 Reacciones de hipersensibilidad tipo I en cobayos

Durante el choque anafiláctico (hipersensibilidad inmediata) existen diversas reacciones que se manifiestan en cobayos que posean anticuerpos citotrópicos (inmunoglobulina tipo E) los cuales se fijan a las células cebadas y basófilas por medio del fragmento Fc. La unión con el antígeno específico induce la desgranulación de la célula con la liberación consecuente de mediadores químicos que provocan alteraciones vasculares, contraen músculo liso, atraen eosinófilos y aglutinan plaquetas, hasta llegar a la muerte (Kindt et al., 2007). El órgano de choque es el pulmón, por lo que la contracción del músculo liso bronquial provoca la asfixia y muerte del animal. Externamente durante el choque anafiláctico los cobayos presentan inquietud, erizamiento de pelo, prurito nasal, estornudos, tos, respiración espasmódica, relajación de esfínteres, convulsiones y por último la muerte (Mendoza et al., 2008).

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de la sangre de caballo como fuente de suministro y la ultrafiltración como método de obtención del EDL con actividad de FT, así como validar su efecto inmunomodulador en reacciones de hipersensibilidad tipo I (Rosenberg, 2005).

2. Metodología

Se obtuvo un volumen de 450 mL de sangre de caballo por punción venosa cervical en bolsas de plasmaféresis estériles (PISA) con anticoagulante. Se realizó a cada unidad de sangre (450 mL) la detección de *Brucella* por la prueba de rosa de Bengala. De las unidades negativas a *Brucella* se separaron los eritrocitos del plasma con la fracción leucocitaria por reposito.

Este último se centrifugó a baja temperatura para la obtención del paquete de leucocitos. La lisis celular se realizó por choque térmico en baño de agua a 37°C seguido de baño de hielo seco - acetona. Posteriormente se eliminaron los detritos celulares por microfiltración en membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro (Millipore). El filtrado se sometió a ultrafiltración por membranas de celulosa de 20 kDa (Pellicon XL Biomax 10). Al permeado obtenido por ultrafiltración que contiene al FT, se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y se comprobó su PM por medio de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (PAGE).

Para la evaluación del efecto inmunomodulador del EDL con actividad de FT en reacciones de hipersensibilidad tipo I, se crearon 4 grupos de 5 cobayos cada uno de 300 a 400 g de peso, bajo las condiciones de confinamiento primario especificadas en la NOM-062-ZOO-1999, los cuales son A: control, B: de referencia con FT humano, C: de prueba con FT equino y D: testigo negativo sin dosificación de FT. A los grupos B y C se les suministro 5 dosis cada 3 días del FT correspondiente y a los grupos A y B no se les suministró FT. Pasados 11 días posteriores a la dosificación del FT se indujo una reacción alérgica en los animales de los grupos B, C y D

mediante la inoculación de 0.5 mL de ovoalbúmina al 10% por vía intraperitoneal. Después de unos minutos se observaron los signos característicos del choque anafiláctico.

En la Tabla 1 se muestran las ponderaciones de signos presentados por los animales de prueba durante la sensibilización e inducción del choque anafiláctico.

Tabla 1: Ponderación de signos presentados por los cobayos de prueba

Valor	Signo
2	Aletargamiento
3	Molestia en nariz
4	Estornudo
5	Tos
10	Insuficiencia respiratoria

3. Resultados y discusión

El FT comercial de origen humano registró una concentración de 135.39 µg/mL y el EDL con actividad FT de origen equino registró una concentración de 205.6 µg/mL. Esto debido a que, al sustituir la diálisis en el método tradicional por ultrafiltración, se logró un incremento en la concentración en un 52%.

En la Figura 1. Se aprecia el patrón electroforético del EDL con actividad FT de caballo con respecto al FT comercial de origen humano.

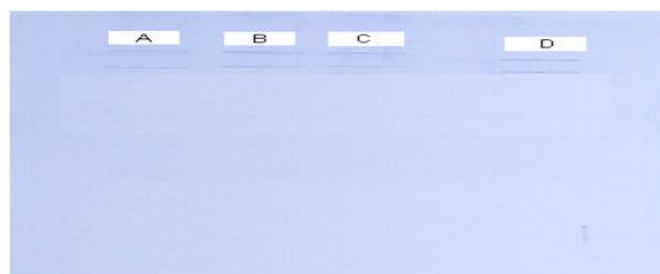


Figura 1: Patrón electroforético del FT comercial de origen humano (A) y del EDL con actividad FT de origen equino (B, C y D).

Como se aprecia son molecularmente equivalentes el FT comercial humano (de referencia) y el EDL con actividad FT equino (de prueba).

A partir de las ponderaciones por signo de la tabla 1 se procedió a evaluar los signos presentados por grupo de prueba durante la sensibilización con ovoalbúmina al 1% que se aprecian en la Figura 2.

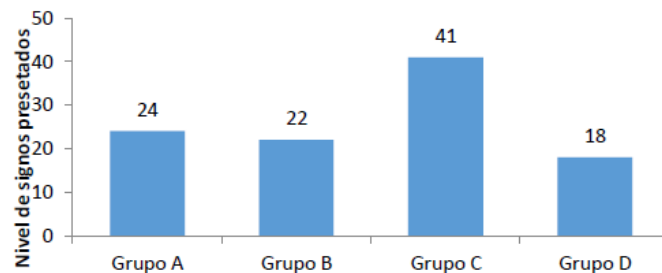


Figura 2: Signos acumulados por grupo experimental de cobayo durante la sensibilización con ovoalbúmina al 1%. A: grupo control, B: Testigo (+) FT comercial humano (de referencia), C: Testigo (+) FT de origen equino (de prueba) y D: Testigo (-)

Cabe señalar que en el caso del grupo C al cual se le suministró EDL con actividad de FT de origen equino se incrementaron los signos debido a que no se utilizó en su formulación agua libre de pirógenos. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 3 después de la administración de la ovoalbúmina al 10% como alérgeno en todos los tratamientos se aprecia un incremento de los signos presentados a excepción del grupo A (control). Este aumento fue del 227% en el grupo que se le administro el FT comercial, un 115% de incremento de signos en el grupo que se le suministro previamente el FT de origen equino y un 722% de incremento en el grupo D Testigo (-) que no se le suministro ningún FT como inmunomodulador.

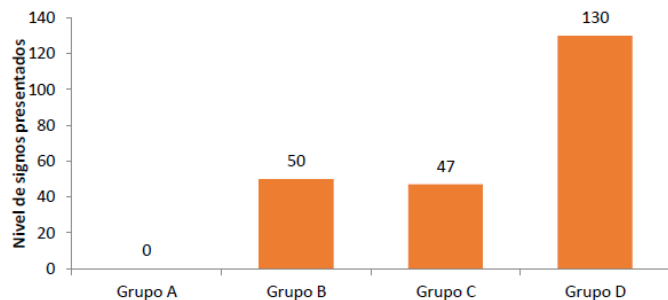


Figura 3: Signos acumulados por grupo experimental de cobayos posterior a la inducción del choque anafiláctico con ovoalbúmina al 10% A: grupo control, B: Testigo (+) FT comercial humano (de referencia), C: Testigo (+) FT de origen equino (de prueba) y D: Testigo (-)

Tabla 2: Sobrevivencia de cobayos por grupo después de la administración de ovoalbúmina al 10% (alérgeno)

Grupo	Sobrevivencia (%)
A	100
B	80
C	100
D	0

A: Control, B: Testigo (+) FT. Comercial, C. Prueba, FT. de caballo y D: Testigo (-) sin FT.

De acuerdo a los resultados de sobrevivencia de cobayos después de la inducción del choque anafiláctico con ovoalbúmina al 10% presentados en la Tabla 2. Se comprueba que tanto el FT comercial de origen humano al igual que el FT de prueba de origen equino, tuvieron un efecto inmunomodulador relacionado con el porcentaje de sobrevivencia, comprobado con el 100% de letalidad en el grupo D por choque anafiláctico debido a la ausencia del efecto inmunomodulador del FT no suministrado. Complementariamente con el Grupo A o control se demostró que la solución de sensibilización (ovoalbúmina al 1%) no tuvo efecto letal alguno sobre los animales de experimentación además de demostrar su estado de salud.

4. Conclusiones

En el proceso de ultrafiltración utilizado para la obtención del Factor de Transferencia de caballo registro pesos moleculares similares observados en el patrón electroforético registrado. Además, tuvo un incremento en su concentración del 51.3 % comparado con el FT de origen humano obtenido por diálisis. Cabe señalar que el tiempo de procesamiento se reduce a un 10% ya que en lugar de utilizar 24 h. durante la diálisis se redujo de 2 a 3 h. por ultrafiltración.

Con base al efecto inmunomodulador en reacciones de hipersensibilidad tipo I en los diferentes grupos de cobayos como animales de prueba se registró 112% de mayor protección en el FT de caballo con respecto al FT de referencia (comercial) de origen humano.

5. Referencias

Abbas, A.K., Lichtman, H., & Pillai, S. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid: Elsevier.

Aldana Velazco L., Cosme Díaz K., Porras Castellanos D., Merino García N., Valenzuela Silva C., Amaya Izquierdo R., Suárez Alba J., Vázquez Bonachea A., Bacardí Fernández D., Milá Cáceres L., y Sánchez Álvarez K., *Ensayo de Primera Ola del Factor de Transferencia (Hebertrans)*, CENIC Ciencias Biológicas, 2004: No. 3, Vol. 35, pág. 197-200.

Blood, C. D. (2002). *Manual de Medicina Veterinaria*. 9ª. Ed. Mc. Graw Hill. México, D.F.

Homborg, Lara, Perez-Tapia y Jiménez. *Dialyzable leukocyte extracts as adjuvant treatment for allergic rhinitis*. World Allergy Organization Journal 2014, 7(Suppl 1): P5

Huerta López José G., *Factor de Transferencia. Una alternativa en el tratamiento de las enfermedades alérgicas*. 2002, Vol. 11, Núm. 1.

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. México: McGraw Hill Interamericana.

Kirkpatrick, C.H. *Structural Nature and Functions of Transfer-Factors*. Annals of The New York Academy of Sciences. 1993.

Konig (2012). *Anatomía de los animales domésticos*. México: Editorial Médica Panamericana

Lawrence, H. S. *Transfer Factor*. Advances in Immunology 1969. Vol. 11. 195-266.

Lawrence, H. S., Borkowsky, W. *A New Basis for the Immunoregulatory Activities of Transfer Factor – an Arcane Dialect in the Language of Cells*. Cell Immunol 1983

Macías, A.E y Guaní-Guerra E. *Transfer Factor: Myths and Facts*. Archives of Medical Research - (2020)

Mendoza Yanavilca, A., Fuentes Paredes, F., Rosales Fernández, A., & Cisneros Tameño, R. (2008). *Guía y manejo de animales de laboratorio*. Lima, Perú: Centro nacional de productos biológicos.

Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2017). *Inmunobiología de Janeway*. México: El Manual Moderno

DOF. NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.

Rodak, Fritsma y Keohane (2014). *Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. México: Editorial Médica Panamericana.

Rosenberg, I.M. (2005). *Protein Analysis and Purification*. Boston Birkhäuser

Vicuña F. Herbert (2006). *Informe bibliográfico sobre el factor de transferencia (Transfer Factor™)*, USA: Woodland Publishing.