

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA



ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA  
DE BIOMODULADORES DE LA RESPUESTA  
INMUNE EN LEUCOCITOS HUMANOS Y DE RATA.

PRESENTADO POR

MARCO IVAN ORDAZ SANCHEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

FEBRERO 2002

TL  
QR186  
.07  
2002  
c.1



1080124439

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



**ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD QUIMIOTÁCTICA DE  
BIOMODULADORES DE LA RESPUESTA INMUNE EN LEUCOCITOS  
HUMANOS Y DE RATA.**

*DR. RICARDO A. GÓMEZ FLORES*  
*DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA*

**PRESENTADO POR**

**MARCO IVAN ORDAZ SANCHEZ**

*SECRETARIO*  
*SUPLENTE*

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO  
PROFESIONAL DE QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.**

**FEBRERO 2002**

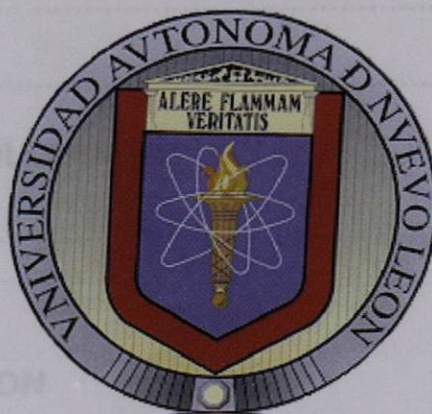
QR 186  
.07  
2002



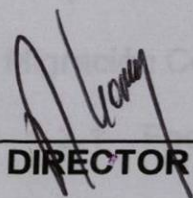
# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

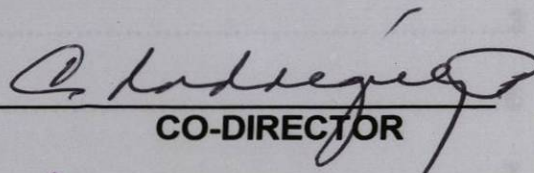
### DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA



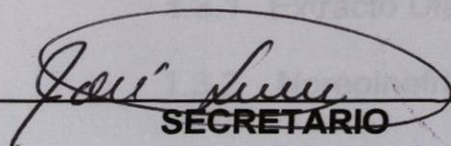
#### COMISION DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
DIRECTOR

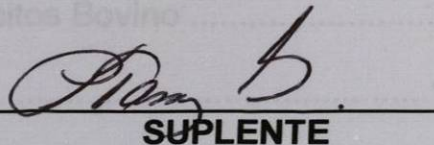
DR. RICARDO A. GOMEZ FLORES

  
\_\_\_\_\_  
CO-DIRECTOR

DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

  
\_\_\_\_\_  
SECRETARIO

Q.B.P. JOSE LUIS MENDEZ VAZQUEZ

  
\_\_\_\_\_  
SUPLENTE

DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

FEBRERO 2002

# INDICE

<b>INDICE DE FIGURAS Y CUADROS .....</b>	<b>A</b>
<b>LUGAR DE TRABAJO .....</b>	<b>C</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>D</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>E</b>
<b>ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA .....</b>	<b>F</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>G</b>

## **Capítulo I INTRODUCCION**

<b>1.1 Respuesta Inmunológica .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Migración Celular .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1 Factores Quimiotácticos .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2 Quimiocinas .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Moduladores de la Respuesta Inmune .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1 Extracto Dializable de Leucocitos Bovino .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.2 Norepinefrina .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3 Opioides .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Quimiotáxis .....</b>	<b>16</b>

<b>Capítulo II HIPOTESIS .....</b>	<b>19</b>
------------------------------------	-----------

### **Capítulo III OBJETIVO**

3.1	Objetivo General .....	20
3.2	Objetivos Específicos .....	20

### **Capítulo IV MATERIAL Y METODOS**

4.1	Reactivos .....	21
4.2	Animales .....	21
4.3	Tratamientos .....	21
4.3.1	Preparación del EDL Bovino .....	21
4.3.2	Preparación de Norepinefrina .....	22
4.3.3	Preparación de SNC80 .....	22
4.4	Obtención Celular .....	22
4.4.1	Linfocitos de Sangre Periférica Humana .....	22
4.4.2	Obtención de Linfocitos de Timo y Bazo de Rata .....	23
4.5	Determinación de la Viabilidad Celular .....	23
4.6	Protocolo de Quimiotáxis .....	24
4.7	Tinción y Fijación .....	24
4.8	Cuantificación Celular .....	25
4.9	Prueba de Tablero (Checkerboard Assays) .....	25
4.10	Análisis Estadístico .....	26



## **Capítulo V RESULTADOS**

5.1 Efecto del EDL bovino sobre la migración celular .....	<b>27</b>
5.1.1 Identificación de la actividad quimiocinética ó quimiotáctico inducida por el EDL bovino .....	<b>27</b>
5.2 Efecto de la norepinefrina sobre la migración celular.....	<b>28</b>
5.2.1 Identificación de la actividad quimiocinética ó quimiotáctico inducida por la NE .....	<b>28</b>
5.3 Efecto del SNC80 sobre migración celular.....	<b>28</b>
5.3.1 Identificación de la actividad quimiocinética ó quimiotáctico inducida por el SNC80 .....	<b>29</b>
5.4 Efecto del antagonista naloxona ( $\mu$ ) en la migración de células de sangre periférica humana y timo de rata tratadas con SNC80 .....	<b>29</b>
<b>Capítulo VI DISCUSION .....</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo VII CONCLUSION .....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo VIII BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>50</b>

## INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### FIGURAS

1. Respuesta inmunológica .....	2
2. Respuesta inflamatoria - migración celular .....	5
3. Estructura química del EDL bovino .....	10
4. Estructura química de la NE .....	12
5. Estructura química del SNC80 .....	15
6. Cámara de quimiotaxis de Wilkinson .....	24
7. Efecto del EDL bovino sobre la migración de células de sangre periférica humana .....	30
8. Efecto del EDL bovino sobre la migración de células de bazo de rata ...	31
9. Identificación del tipo de locomoción inducida por el EDL bovino a través del método de tablero de células de sangre periférica humana .....	32
10. Identificación del tipo de locomoción inducida por el EDL bovino a través del método de tablero de células de bazo de rata .....	33
11. Efecto de la NE sobre la migración de células de sangre periférica humana .....	34
12. Efecto de la NE sobre la migración de células de timo de rata .....	35
13. Identificación del tipo de locomoción inducida por NE a través del método de tablero de células de sangre periférica humana .....	36
14. Identificación del tipo de locomoción inducida por NE a través del método de tablero de células de timo de rata .....	37

15. Efecto del SNC80 sobre la migración de células de sangre periférica humana .....	38
16. Efecto del SNC80 sobre la migración de células de timo de rata .....	39
17. Identificación del tipo de locomoción inducida por SNC80 a través del método de tablero de células de sangre periférica humana .....	40
18. Identificación del tipo de locomoción inducida por el SNC80 a través del método de tablero de células de timo de rata .....	41
19. Efecto del antagonista naloxona ( $\mu$ ) en la migración de células de sangre periférica humana tratadas con SNC80 .....	42
20. Efecto del antagonista naloxona ( $\mu$ ) en la migración de células de timo de rata tratadas con SNC80 .....	43

## **CUADROS**

1. Técnica de tinción de hematoxilina .....	25
---	----

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del **Dr. Ricardo A. Gómez Flores** y la co-dirección de la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla** y del **Q.B.P. José Luis Méndez Vázquez**.

## DEDICATORIA

A Dios, por que me ha permitido vivir una vida maravillosa, brindándome la paciencia y tranquilidad para poder cruzar todos los obstáculos.

A mi Padre, **Sr. Tito Ordaz Oviedo**, por que siempre has estado junto a mí cuando te he necesitado, por tu confianza y ejemplo que fue base de mi formación académica.

A mi Madre, **Sra. Yolanda Sánchez Rodríguez**, por tu inmenso amor y comprensión que me hicieron adquirir seguridad en mi persona, me has enseñado a levantarme con firmeza cuando he tropezado.

A mis hermanos, **Marco Oliver, Lenia Gissel y Tito Everardo** por compartir mis locuras y su cariño.

A mi Tía, **Laura Sánchez**, por su enorme cariño y apoyo incondicional. A mi Nana, **Genoveva Escobar**, por sus esmerosos cuidados y comprensión. Al resto de mi familia, **Abuelos, Tíos y Primos**.

A ti **Jeannie**, por que con tu amor y comprensión me alientas a alcanzar grandes metas. Gracias BB.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Ricardo A. Gómez Flores**, por la dirección y asesoría recibida durante la presente investigación, además de haberme brindado la maravillosa oportunidad de incursionar en este fascinante mundo de la investigación.

**Al Q.B.P. José Luis Méndez Vázquez**, por haberme abierto las puertas de su laboratorio; así como su apoyo, asesoría y facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

**A la Dra. Lidia Rivera Morales**, por sus consejos, apoyo y las enseñanzas brindadas muy amablemente.

**A mis compañeros y amigos de laboratorio, Diana Caballero, Jessica Jacobi, Carolina Solís y Laura Verastegui**, por su ayuda y asesoría invaluable en el desarrollo de este trabajo de investigación.

**A mis amigos de la carrera, Alejandra Aguirre, Ericka García, Areli Herrera, ... a todos en general.** Gracias por estar cuando más los necesitaba, en los momentos buenos y malos. En especial a ti, **Jannet Salinas**, por ser como eres.

**Y todos aquellos que de alguna manera colaboraron en este proyecto.**

**GRACIAS**

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

HCl	Acido Clorhídrico	IL-1	Interleucina 1
Ab	Anticuerpo	IL-8	Interleucina 8
Ag	Antígeno	$\kappa$	<i>Kappa</i>
PBS	Buffer Salino de Fosfatos	KDa	Kilodaltones
NK	Células Asesinas Naturales	LPS	Lipopolisacárido
Células/mL	Células por Mililitro	LES	Lupus Eritematoso Sistémico
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo	$\mu\text{m}$	Micrómetros
Ctrl.(-)	Control Negativo	mg.	Miligramo
Da	Daltones	mg/mL	Miligramos por Mililitro
$\delta$	<i>Delta</i>	mL	Mililitro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono	min.	Minuto
DMSO	Dimetil sulfóxido	$\mu$	<i>Mu</i>
EDL	Extracto Dializable de Leucocitos	M	Molar
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa	NE	Norepinefrina
FT	Factor de Transferencia	N	Normalidad
°C	Grados Centígrados	NO <sub>2</sub>	Oxido Nítrico
g.	Gramos	%	Por ciento
g/mL	Gramos por Mililitro	r.p.m.	Revoluciones por Minuto
CD8	Grupos Diferenciados para Linfocitos T Citotóxico/Supresor	seg.	Segundo
CD4	Grupos Diferenciados para Linfocitos T Cooperadores	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
h.	Horas	U	Unidad
HT	Hipersensibilidad tardía	U/mL	Unidades por Mililitro
IFN- $\gamma$	Interferón gamma	SNC80	(+)-4-((alpha R)-alpha-((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl)-N, N-diethylbenzamide

## RESUMEN

Las estrategias que se han seguido para tratar de corregir las deficiencias en el funcionamiento del sistema inmunológico han sido el utilizar modificadores de la respuesta biológica conocidos también como inmunomoduladores, éstos son sustancias que directa ó indirectamente modifican uno o más componentes de la respuesta inmune del huésped para lograr la homeostasis. Uno de los parámetros inmunológicos que se pueden modular es el proceso de quimiotaxis leucocitario. En este estudio probamos el efecto *in vitro* del extracto dializable de leucocitos (EDL) bovino, norepinefrina (NE) y el opioide no peptídico de clase *delta* (+)-4-(( $\alpha$  R)- $\alpha$ -((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl)-N, N-diethyl-benzamide (SNC80) en la migración de leucocitos humanos y de rata, así como la identificación del tipo de locomoción que éstos presentan. Se observó que el EDL bovino y el SNC80 estimularon la quimiotaxis de linfocitos humanos y de rata, la cual fue dependiente de la concentración. Además se demostró que dicha actividad fue quimiotáctica en pruebas de gradientes, observándose una locomoción dirigida de manera significativa para ambos tipos celulares. Por otro lado, la NE estimuló la migración de células de sangre periférica humana en diferentes concentraciones de manera significativa y dependiente de las dosis del biomodulador; mientras que las células de rata inhibieron la quimiotaxis en forma inversamente proporcional a la concentración, la prueba de tablero en ambos casos, mostró que la migración de células ocurre de forma quimiocinética (aleatoria). El potencial inmunomodulador del EDL bovino, NE y SNC80; podrían ser aprovechado en la terapia de pacientes con compromiso inmunológico.



## Capítulo I

### INTRODUCCION

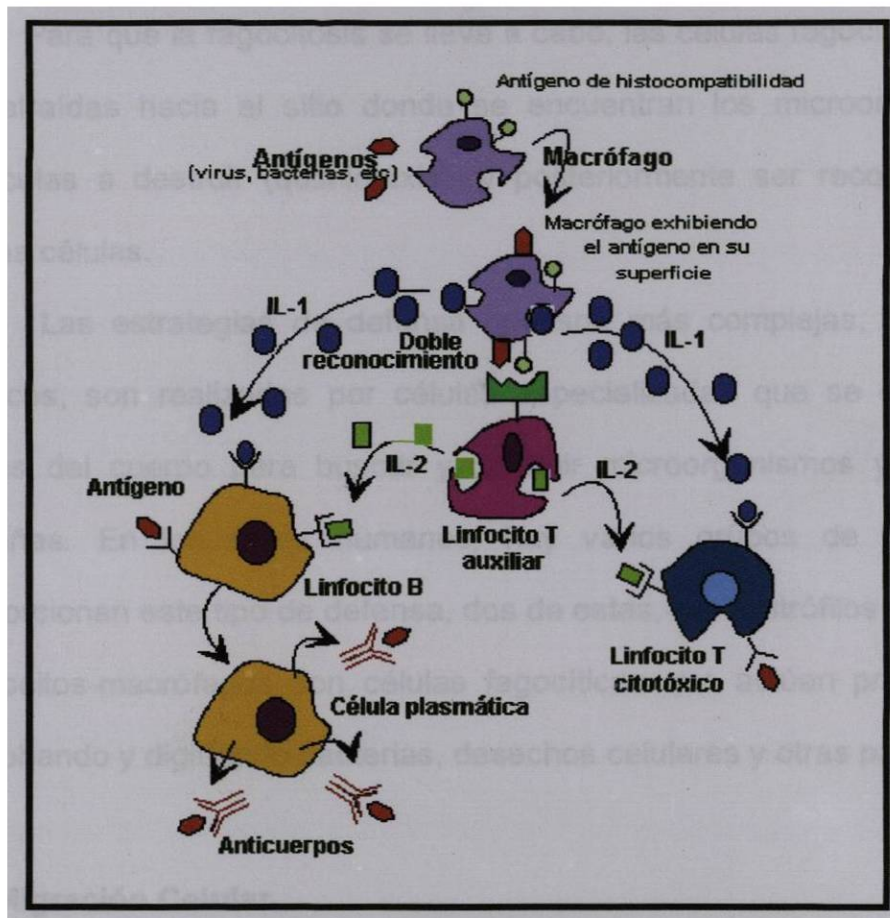
#### 1.1 Respuesta Inmunológica.

Nuestra salud está influenciada directamente por una respuesta inmunológica eficiente que nos permite defendernos de la invasión por entidades biológicas extrañas como virus, bacterias, hongos y parásitos, así como detectar y eliminar células tumorales <sup>48</sup>.

La inmunidad puede ser innata (no adaptativa) ó adquirida (adaptativa); en la primera las barreras físicas y químicas actúan como primer frente de ataque, siendo estas últimas las que proporcionan compuestos bioquímicos que pueden proteger al cuerpo de una amplia gama de microorganismos extraños. Estos dos tipos de barreras ó defensas innatas pueden evitar que nuestro organismo sea invadido; pero muchas veces alguno logra traspasar dichas barreras y es ahí cuando otros tipos de estrategia de defensa inmunológica se activan para evitar que los patógenos ejerzan sus funciones<sup>54</sup>. Si las defensas que proporcionan la inmunidad innata son incapaces de prevenir totalmente la infección, interviene la inmunidad adquirida que se distingue por ser específica para el inmunógeno y por tener memoria<sup>3</sup>.

Las respuestas inmunes específicas dependen de la respuesta inmune celular, en la cual intervienen los linfocitos T (CD8 y CD4), y la

respuesta inmune humoral que depende de los linfocitos B, que se encargan de la producción de anticuerpos (Figura 1).



**Figura 1. Respuesta Inmunológica**

En el sistema inmunológico también existen las respuestas inespecíficas, las cuales están formadas por las vías del complemento (vía clásica y la vía alterna), que producen una cascada de reacciones enzimáticas que pueden ser desencadenadas por las características moleculares de la superficie de algunos microorganismos, y que pueden conducir a lisis ó mediar el proceso de opsonización. Otra respuesta inespecífica es el proceso de fagocitosis, es llevado a cabo por los

macrófagos y neutrófilos, que se encargan de eliminar microorganismos ó partículas extrañas ingiriéndolas y llegando a destruirlos mediante enzimas que se encuentran en los gránulos de ellas<sup>1, 52</sup>.

Para que la fagocitosis se lleve a cabo, las células fagocíticas deben ser atraídas hacia el sitio donde se encuentran los microorganismos ó partículas a destruir (quimiotáxis), y posteriormente ser reconocidas por dichas células.

Las estrategias de defensa que son más complejas, dinámicas y eficaces, son realizadas por células especializadas que se desplazan a través del cuerpo para buscar y destruir microorganismos y sustancias extrañas. En los seres humanos, hay varios grupos de células que proporcionan este tipo de defensa, dos de estas, los neutrófilos y la serie de monocitos-macrófagos son células fagocíticas que actúan principalmente englobando y digiriendo bacterias, desechos celulares y otras partículas<sup>1, 54</sup>.

## **1.2 Migración Celular.**

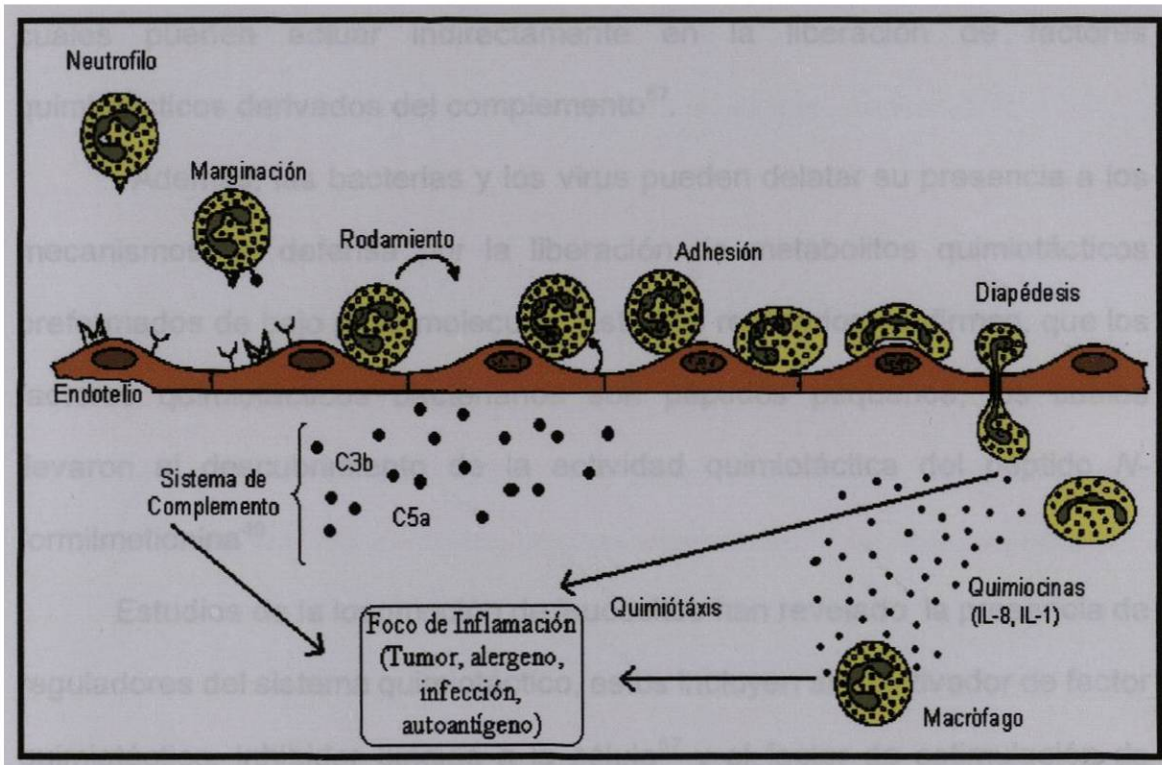
La migración celular es un mecanismo complejo el cual depende de la coordinación de una gran cantidad de procesos celulares que están estrechamente relacionados con una variedad de factores intrínsecos ó extrínsecos que la activan ó suprimen<sup>14</sup>.

Una característica importante de la fagocitosis por leucocitos es la capacidad de responder a un estímulo quimiotáctico, esta respuesta es una parte esencial en la respuesta contra infecciones<sup>62</sup>. La locomoción leucocitaria es al azar (quimiocinésis) ó dirigida (quimiotáctica). La primera

puede es estimulada y no estimulada; la estimulada, ocurre cuando un quimioattractante interacciona con un leucocito, pero en ausencia de un gradiente de concentración, es decir, las células son bañadas uniformemente por una solución que contiene el quimioattractante y bajo estas condiciones las células tienen una actividad más considerable que las que están en reposo, pero el movimiento es desorientado<sup>56</sup>. Mientras que la locomoción quimiotáctica por su parte, es un movimiento dirigido unidireccional en respuesta a un gradiente de concentración de un quimioattractante<sup>48</sup>.

El movimiento leucocitario es generalmente un movimiento de células blancas a través de los microvasos; esto es a una velocidad menor que la velocidad del movimiento de las células rojas de la sangre<sup>56</sup>. La migración de leucocitos circulantes en la sangre hacia el interior del tejido inflamado se lleva a cabo mediante un proceso que comprende tres pasos (Figura 2): un movimiento a lo largo de los vasos, activación de neutrófilos ó monocitos-macrófagos y células endoteliales, y una interacción de alta afinidad entre integrinas glicoproteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas y deslizamiento a lo largo del endotelio, diapédesis y migración al tejido, en respuesta al gradiente quimioattractante.

En el tejido inflamado el movimiento de los leucocitos frecuentemente conduce a un estado estacionario en el que permanecen firmemente unidos a la superficie celular endotelial, sin movimiento de rotación. Esta fuerte interacción es de alta afinidad y es referida a los leucocitos que denotan ausencia de movimiento a lo largo de la vénula<sup>56</sup>.



**Figura 2. Respuesta inflamatoria – migración celular**

### 1.2.2 Factores Quimiotácticos.

La fuente de factores quimiotácticos *in vivo*, es el sistema del complemento de donde se deriva el fragmento quimiotáctico C5a. Otros mediadores derivados del plasma, con actividad quimiotáctica, incluyen al factor dependiente Hageman, así como los productos de la vía del metabolismo del ácido araquidónico, de la vía de la lipooxigenasa y de la vía de la ciclooxigenasa (prostaglandinas y tromboxanos)<sup>57</sup>.

Los factores derivados de las células incluyen productos de los linfocitos, monocitos y leucocitos polimorfonucleares. Ciertos productos virales, bacterias y tejidos contienen C3 y enzimas que parten al C5, las

cuales pueden actuar indirectamente en la liberación de factores quimiotácticos derivados del complemento<sup>57</sup>.

Además, las bacterias y los virus pueden delatar su presencia a los mecanismos de defensa por la liberación de metabolitos quimiotácticos preformados de bajo peso molecular. Estudios realizados confirman, que los factores quimiotácticos bacterianos son péptidos pequeños, los cuales llevaron al descubrimiento de la actividad quimiotáctica del péptido *N*-formilmetionina<sup>49</sup>.

Estudios de la locomoción de leucocitos han revelado la presencia de reguladores del sistema quimiotáctico, estos incluyen al inactivador de factor quimiotáctico, inhibidor dirigido a la célula<sup>57</sup> y el factor de estimulación de leucocinesis<sup>40</sup>; todos estos son constituyentes normales del suero humano, encontrándose en cantidades traza<sup>49</sup>.

El inactivador del factor quimiotáctico interacciona directamente con diferentes componentes que suprimen sus actividades, lo cual fue determinado en pacientes con enfermedad de Hodgkin's, cirrosis, sarcoidosis y lupus eritematoso sistémico (LES).

El inhibidor dirigido a la célula actúa directamente en polimorfonucleares y monocitos inactivando la locomoción; elevaciones de la actividad del inhibidor dirigido a la célula en suero se han asociado con locomoción anormal de leucocitos, observado en pacientes con cirrosis, en enfermos hospitalizados y en algunos padecimientos con periodontitis recalcitrante .

El factor de estimulación de la leucocinesis es el responsable del efecto quimiotáctico del suero normal y de la locomoción de los granulocitos;

una deficiencia de este factor en suero ha sido relacionada con la pérdida de infecciones recurrentes serias ó crónicas en varios pacientes<sup>40</sup>.

### **1.2.3 Quimiocinas.**

Las quimiocinas son moléculas que presentan una actividad quimiotractante selectiva para diferentes tipos de leucocitos desempeñando un papel importante en el proceso de trans migración<sup>56</sup>. Además representan una superfamilia de aproximadamente 30 citocinas quimiotácticas que son iniciadores vitales de las reacciones inflamatorias<sup>19</sup>, su peso molecular oscila entre los 8 y 16 KDa, siendo producidas y liberadas por una amplia variedad de tipos de células en la fase inicial de la respuesta del hospedero al daño, antígenos ó a la invasión de microorganismos<sup>28</sup>. La producción es inducida por mediadores exógenos y endógenos, como son IL-1, TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ , que se unen a receptores específicos de la superficie celular<sup>56</sup>.

Las quimiocinas han sido divididas en dos subgrupos: el C-X-C (donde X es cualquier aminoácido) y C-C. Donde el grupo C-X-C es exclusivo de neutrófilos; mientras que el grupo C-C parecen atraer a monocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos (incluyendo células NK) pero no neutrófilos. Recientemente se ha encontrado un tercer grupo de quimiocinas, llamado C, donde la linfotactina es representativa de este grupo y es un factor quimiotáctico para linfocitos y células NK, pero no para monocitos ó neutrófilos<sup>56</sup>.

### **1.3 Moduladores de la Respuesta Inmune.**

Los inmunomoduladores son nuevos agentes ó compuestos que modifican directamente la función inmunitaria específica, teniendo un efecto neto positivo ó negativo en la actividad del sistema inmunitario. En la actualidad es limitada la experiencia con inmunomoduladores en estudios clínicos controlados, pero muchos de estos pueden ser efectivos para los tratamientos de trastornos neoplásicos, infecciosos e inmunitarios<sup>54</sup>.

Hoy en día, se han identificado una cantidad creciente de sustancias capaces de modular la función inmunitaria, que tienen un efecto más específico que los productos de microorganismos como el bacilo Calmette-Guérin y *Corynebacterium parvum* que se utilizaban con propósitos similares<sup>54</sup>.

Los usos potenciales de los inmunomoduladores en medicina clínica son la reconstitución de la deficiencia inmunitaria y la supresión de la función inmunitaria excesiva.

En el caso de la quimiotáxis leucocitaria, se han identificado defectos celulares que pueden ser adquiridos ó congénitos como, diabetes mellitus ó el síndrome Chediak-Higashi respectivamente, tales desordenes locomotores pueden ser debidos a anormalidades en las mismas células, por defecto en el sistema del complemento ó por niveles anormales de reguladores.

Dichos padecimientos podrían ser posibles blanco para los biomoduladores de este estudio, sin embargo la estimulación de la



quimiotaxis por biomoduladores podría ser en general de utilidad en la inducción de inflamación en contra de infecciones ó cáncer.

### **1.3.1 Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) bovino.**

El factor de transferencia (FT) es un material dializable, ribonucleopéptido de bajo peso molecular, no inmunogénico y obtenido a partir de linfocitos humanos ó de otro origen animal, que tiene la capacidad de transferir inmunidad celular medida por hipersensibilidad tardía (HT) de un individuo sensible a otro no sensible.

A partir de 1956, Lawrence y Papenheimer denominaron FT a la sustancia en el EDL cuya actividad biológica era la responsable de transferir la respuesta inmunológica específica a un antígeno<sup>32</sup>. El EDL elaborado a partir de células animales ó de humanos es capaz de transferir actividad específica de un antígeno (Ag) a través de una amplia barrera de especies<sup>18</sup>.

En estudios recientes se ha tratado de investigar la influencia que ejercen diversos biomoduladores en la respuesta quimiotáctica; es el caso del EDL bovino el cual se caracteriza por ser una preparación heterogénea con efectos demostrados en el sistema inmune. En la última década ha sido empleada como terapia inmunomoduladora inespecífica ó específica.

El EDL bovino (Figura 3), se prepara específicamente hacia un Ag determinado y tiene la capacidad de transferir inmunidad de un individuo inmune a otro con compromiso inmunológico. Wilson reportó algunas características del EDL bovino, peso molecular de 1100 a 3000 Da,

sensibilidad al calor (60°C durante 30 min.) y solubilidad en agua aunque precipita en etanol<sup>61</sup>.

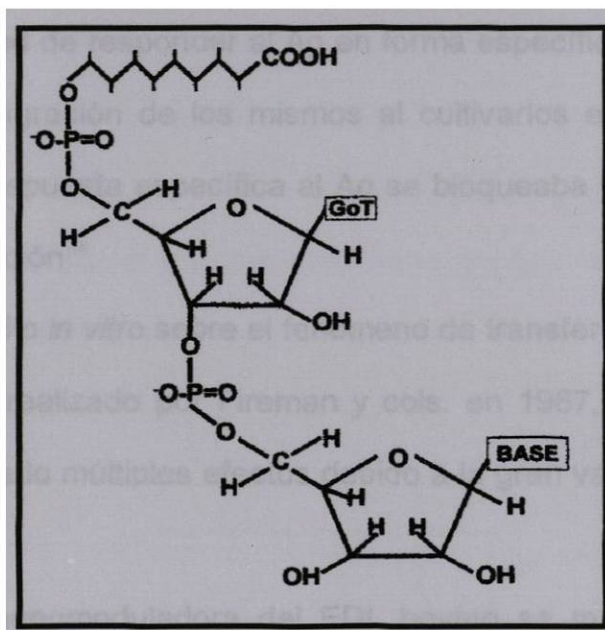


Figura 3. Estructura química del EDL bovino.

El interés del EDL bovino comenzó cuando se demostró el beneficio clínico que ofrecía su administración en ciertas enfermedades relacionadas con una deficiencia inmune y cuando existe una falta de respuesta a terapias convencionales. Sin embargo, Hamblin y Dumonde fueron los primeros en mencionar que el EDL actuaba como un expansor local de la respuesta inmunológica, además que se ha sugerido que tiene la información instruccional ó genética específica para generar en células no sensibles la capacidad de responder a ciertos antígenos y activando células previamente sensibilizadas las cuales son capaces de responder ahora a un estímulo<sup>10, 16</sup>.

Lawrence detectó dos actividades opuestas del EDL específico de un Ag, una respuesta con función inductora/cooperadora que denominó: factor

inductor; y una supresora denominada como, factor supresor. Estas actividades se observaron cuando poblaciones de leucocitos no inmunes se cultivaban en presencia del factor inductor, observándose que las células adquirían la capacidad de responder al Ag en forma específica. Mientras que la inhibición de la migración de los mismos al cultivarlos en presencia del factor supresor, la respuesta específica al Ag se bloqueaba y se prevenía la inhibición de la migración<sup>34</sup>.

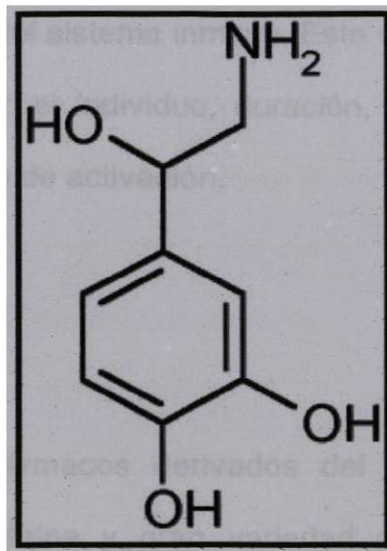
El primer estudio *in vitro* sobre el fenómeno de transferencia específica de Ag con EDL fue realizado por Fireman y cols. en 1967, a partir de esa fecha se han observado múltiples efectos debido a la gran variedad biológica de este<sup>22</sup>.

La acción inmunomoduladora del EDL bovino se manifiesta por un aumento en la actividad fagocítica de los neutrófilos y macrófagos, un aumento en la población y en la síntesis de receptores de linfocitos T para la formación de rosetas y un aumento en el número de células formadoras de anticuerpo (Ab)<sup>29, 30</sup>.

### **1.3.2 Norepinefrina (NE).**

La NE es una clase de catecolamina que comparte con la dopamina y la epinefrina roles importantes de la función del sistema nervioso (Figura 4). Estos compuestos que actúan como neurotransmisores, se producen de manera importante en dos sitios del organismo: médula adrenal (mayoritariamente la epinefrina), y en los nervios periféricos (dopamina y norepinefrina).

Existe una relación entre el sistema nervioso con el sistema inmune, se sabe que el estrés activa tanto la vía hipotalámica-pituitaria-adrenal como la simpática. En la primera se producen los glucocorticoides, mientras que en la segunda se estimula la producción de las catecolaminas, norepinefrina y epinefrina. Ambos sistemas se caracterizan por una diversidad de tipos celulares y transmisión de información célula a célula mediante factores solubles como linfocinas (en el sistema inmunitario) y neurotransmisores (en el sistema nervioso), además de tener la capacidad de memoria corta y de larga duración<sup>54</sup>.



**Figura 4. Estructura química de la NE.**

La NE modula la actividad de sus células blanco al unirse a receptores adrenergicos expresados en la superficie de estas, uno de sus blancos pueden ser las células del sistema inmune. Una observación adicional ha sido la de la innervación del sistema inmune, si ambos hechos son mas que casuales, puede sugerirse que el sistema nervioso y sus moléculas tienen

presencia y probablemente juegan un papel en la regulación de la respuesta inmune.

Se ha observado que las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina (en otros tiempos asignadas exclusivamente al sistema nervioso) son capaces de influir sobre la respuesta inmunológica en fases que van desde la inducción, activación y funciones efectoras de las células inmunes<sup>15</sup>, pero también suprimiendo las funciones inmunológicas<sup>7, 11, 25</sup>.

Sin embargo los hallazgos más recientes retan este modelo al proponer una influencia más versátil ó bimodal que si bien puede involucrar inmunosupresión, también en forma contraria puede implicar un aumento en la capacidad de respuesta del sistema inmune. Esto va a depender en gran manera de aspectos como: el individuo, duración, tipo de estrés, nivel celular evaluado y su estado de activación.

### **1.3.3 Opiodes.**

Los opiáceos son fármacos derivados del opio, entre estos se encuentran la morfina, codeína y gran variedad de compuestos semi-sintéticos derivados de estos y de la tebaína, otro componente del opio. El termino *opioide* es más amplio, pues se aplica a todos los agonistas y antagonistas con actividad del tipo de la morfina, lo mismo que a los péptidos opioides naturales, sintéticos y semi-sintéticos<sup>47</sup>.

Los opioides se han utilizado extensamente como analgésicos en el tratamiento del dolor debido a cáncer y otras condiciones clínicas. Esta práctica, común desde ya hace tiempo, ha visto incrementar su popularidad

recientemente, por lo que también ha aumentado la importancia del conocimiento y comprensión de las interacciones de los opioides con los diversos sistemas funcionales en un amplio rango de condiciones. Algunos aspectos de gran interés se refieren a la eficacia, tolerancia, potencial de abuso y los efectos secundarios de estos compuestos; estos últimos, han ganado gran relevancia en la actualidad ya que numerosos estudios han demostrado que la administración de opioides tiene diversos efectos en el sistema inmune, entre ellos la supresión del mismo<sup>50</sup>.

Recientemente los únicos opioides disponibles para ser evaluados eran compuestos peptídicos endógenos, con resultados que van desde la estimulación, supresión ó ausencia de efectos sobre el sistema inmune, sin embargo, los compuestos peptídicos presentan la desventaja de ser proteolíticamente inestables y no ser capaces de atravesar la barrera hematoencéfalica lo que limita su aplicación clínica<sup>43</sup>. Por ello se realizan esfuerzos por desarrollar compuestos opioides no peptídicos que sean selectivos, eficaces y seguros clínicamente.

El SNC80 forma parte de una serie de prometedores compuestos sintetizados por Calderón y cols. (Figura 5) ya que parecen tener una selectividad mucho mayor por los receptores opioides *delta* ( $\delta$ ) y *mu* ( $\mu$ ) que el compuesto original (hasta 500 veces mayor), esta selectividad además es muy parecida a la de los agonistas opioides más selectivos<sup>8</sup>. Los hallazgos obtenidos de los estudios *in vivo* sugieren que el SNC80 puede ser más selectivo, eficaz y seguro que otros compuestos opioides, lo cual puede representar un avance prometedor en el desarrollo de analgésicos<sup>43</sup>.

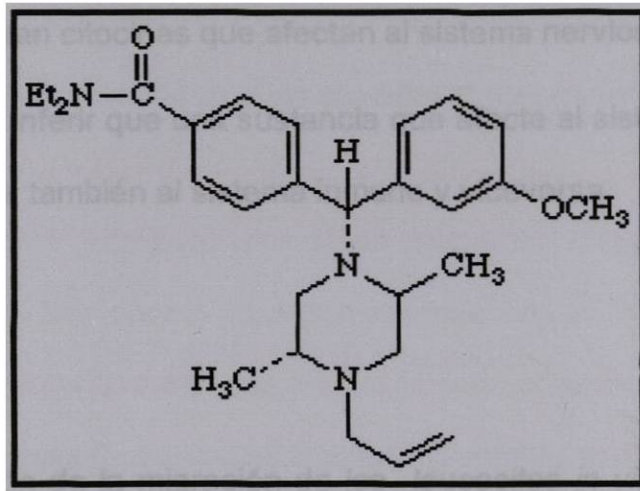


Figura 5. Estructura química del SNC80

El SNC80 es un nuevo opioide no peptídico de clase  $\delta$  que muestran efectos potenciadores en la respuesta proliferativa de linfocitos tímicos *in vivo*<sup>44</sup> y en las funciones de macrófagos peritoneales<sup>25</sup>, estas observaciones pueden tener impacto clínico en el tratamiento de enfermedades. La comprensión de la actividad moduladora de estos opioides, peptídicos y no peptídicos, endógenos y exógenos, en la función inmune puede proporcionar beneficios clínicos y terapéuticos a pacientes inmunocomprometidos que sufren de enfermedades infecciosas como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y hepatitis B, y cáncer. La actividad de los opioides depende de su unión a receptores de alta afinidad llamados  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  presentes en el cerebro y en las células del sistema inmune<sup>27, 36</sup>.

Se ha demostrado que el uso de opioides afecta tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Durante el estrés, el cerebro induce la liberación de hormonas, como los glucocorticoides, que no sólo producen analgesia, sino también causan inmunosupresión<sup>3, 9, 49</sup>. A su vez, las células del

sistema inmune liberan citocinas que afectan al sistema nervioso central <sup>4, 21</sup>.

Se puede entonces inferir que una sustancia que afecte al sistema nervioso central podría alterar también al sistema inmune y viceversa.

#### **1.4 Quimiotáxis.**

La evaluación de la migración de los leucocitos *in vitro* se realiza para determinar el grado en el cual los leucocitos pueden responder al quimioattractante. Desordenes en la locomoción son frecuentemente fundadas en pacientes con historia de infecciones bacteriales recurrentes crónicas, al igual que por anomalías internas en los leucocitos ó defectos en el plasma (deficiencias del complemento) ó por niveles anormales de los reguladores, como ya se mencionó con anterioridad. Las ventajas de estas técnicas incluyen la naturaleza del ensayo *in vitro* y la preparación del material a muestrear. La mayor desventaja es el requerimiento de personal de laboratorio con experiencia y el tiempo que se requiere para la realización de cada ensayo<sup>2</sup>.

Existen pruebas clínicas adecuadas para medir solo algunas de esas funciones, por ejemplo: locomoción y quimiotáxis, fagocitosis y actividad microbicida; la medición del número de células que se han movido a través de un filtro ó la distancia que ellos han recorrido es útil clínicamente.

La locomoción direccional de células hacia diversos estímulos, se cuantifican mediante el uso de la cámara de Boyden ó Wilkinson. Aunque este método es en teoría simple hay muchas dificultades teóricas, como la falta de disponibilidad de filtros de tamaño estandarizado del poro,



predisposición del observador a cuantificar las células que migran en el microscopio, pérdida de células que se eliminan ó atraviesan totalmente el filtro.

Boyden, en 1962 introduce un método para el estudio de quimiotáxis el cual es aún usado, éste consta de una membrana de celulosa que separa una cámara superior de una cámara inferior la cual contiene una solución quimiotáctica, un gradiente de concentración se establece a lo largo de la membrana y estimula el movimiento de las células a través de la membrana<sup>6</sup>.

Por otro lado Snyderman y cols. mencionan que se han hecho modificaciones a la técnica de las cámaras de Boyden en las cuales las células migran a través de filtros de policarbonato con poros de 15  $\mu\text{m}$  y son difundidas a la parte de abajo del filtro<sup>5, 53</sup>.

Wilkinson, en 1974 describe cámaras simples para quimiotáxis las cuales constan de una membrana pegada a la boca de un tubo de plástico<sup>59</sup>.

Maderazo, en 1978 describe tres tipos de medición de los resultados de la migración celular; el primer método involucra el conteo del número de células que llegan a una distancia preseleccionada, el segundo mide la distancia migrada por las células, y en el tercer método las células son contadas a intervalos de 10  $\mu\text{m}$  de la monocapa celular desde la superficie proximal a la superficie distal, el número de células contadas en cada nivel es multiplicado por la distancia del nivel de la superficie proximal, los productos obtenidos son sumados y divididos por el número total de las células contadas, el número obtenido es la distancia promedio migrada por célula, este es llamado índice de locomoción o factor quimiotáctico<sup>39</sup>.

Fantone y Kreutzer, en 1979 mencionan que la cuantificación de la respuesta quimiotáctica también puede ser realizada por medición de la liberación de enzimas lisosomales durante la interacción de los neutrófilos y el quimiotactante<sup>20, 31</sup>.

## Capítulo II

# HIPOTETESIS

Los biomoduladores, extracto dializable de leucocitos (EDL) bovino, norepinefrina (NE) y (+)-4-(( $\alpha$  R)- $\alpha$ -((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl)-N, N-diethyl-benzamide (SNC80) son capaces de alterar la migración de leucocitos humanas y de rata.

## Capítulo III

### OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo General.

Evaluar la actividad quimiotáctica *in vitro* de biomoduladores de la respuesta inmune sobre leucocitos humanos y de rata.

#### 3.2 Objetivos Específicos.

Evaluar los compuestos, EDL bovino, NE y SNC80, en los siguientes parámetros:

- a) Migración de células de sangre periférica humana.
- b) Migración de linfocitos de bazo y timo de rata.
- c) Identificación del tipo de locomoción (quimiotaxis ó quimiocinésis) de células de sangre periférica humana.
- d) Identificación del tipo de locomoción (quimiotaxis ó quimiocinésis) de linfocitos de timo y bazo de rata.

## Capítulo IV

### MATERIAL Y METODOS

#### 4.1 Reactivos.

La solución penicilina-estreptomicina y el medio RPMI-1640 se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El PBS, DMSO, metanol, el buffer de lisis para células eritrocíticas, la caseína, la tinción de hematoxilina y el Histopaque-1077 se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los filtros de ocho micras de tamaño de poro se obtuvieron de Milipore, CO. (Bedford, MA).

#### 4.2 Animales.

Ratas macho de 6-8 semanas de edad *Sprague-Dawley* (200-250 g) se obtuvieron de Harlan *Sprague-Dawley* Inc. (Indianapolis, IN). Se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24 °C, bajo un ciclo luz-oscuridad (fase lumínica, 06:00-18:00 h), y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

#### 4.3 Tratamientos.

##### 4.3.1 Preparación de EDL bovino.

El EDL bovino se preparó bajo el método de Lawrence<sup>33</sup>. Brevemente, se obtuvo el bazo de un bovino recién sacrificado y se homogeniza para ser

tratado en un proceso de congelamiento-descongelamiento con alcohol/acetona y baños en agua a temperatura de 37°C (doce ciclos). El lisado obtenido se dializó con membranas de 12 KDa de tamaño de poro (cutoff) por 48 h a 4°C, seguida de una esterilización del mismo con filtros de 0.2 µm y su posterior liofilización (1U = 1 x 10<sup>9</sup> células).

#### **4.3.2 Preparación de NE.**

Una solución stock de NE (2 x 10<sup>-3</sup> M) se preparó disolviendo 0.67 mg de este compuesto en agua destilada estéril.

#### **4.3.3 Preparación de SNC80.**

Una solución stock de SNC80 (1 x 10<sup>-3</sup> M) se preparó al disolver 0.9 mg de este compuesto en agua destilada estéril que contiene 5% DMSO mas 2.5 % de HCl 0.1 N, y las diluciones se prepararon en solución salina libre de pirógenos en las concentraciones apropiadas.

#### **4.4 Obtención de Células.**

##### **4.4.1 Linfocitos de Sangre Periférica Humana.**

Se empleó sangre completa obtenida de donadores sanos para el aislamiento de la capa de células mononucleares humanas de una muestra de sangre periférica bajo la técnica de separación de leucocitos mediante un gradiente de densidad. Brevemente, se mezclaron de 15-20 mL de la sangre

periférica colectada con un volumen similar de la solución de PBS. Esta mezcla es vertida cuidadosamente sobre un volumen de Ficoll Hypaque-1077 el cual representa una tercera parte de la mezcla inicial; este volumen final es centrifugado a 2000-3000 r.p.m. por 30 min. Posteriormente es colectada la interfase formada de linfocitos y lavada en tres ocasiones con medio RPMI-1640 a 1600 r.p.m. por 5 min., ajustándose enseguida a una concentración celular de  $1 \times 10^6$  células por mililitro (células/mL) en el caso del EDL bovino,  $2 \times 10^6$  células/mL para SNC80 y  $6 \times 10^6$  células/mL en NE.

#### **4.4.2 Obtención de Linfocitos de Timo y Bazo de Rata.**

El timo y/o bazo de ratas macho de aproximadamente 200-250 g. de peso se removieron inmediatamente después de matar al animal por asfixia con CO<sub>2</sub>. Suspensiones celulares se prepararon al disgregar el timo y/o el bazo en medio RPMI-1640 suplementado con una solución 0.5% de penicilina-estreptomicina. Las suspensiones de linfocitos se lavaron tres veces en este medio a 1600 r.p.m. por 5 min., ajustándose enseguida de igual manera que el punto 4.4.1.

#### **4.5 Determinación de la Viabilidad Celular.**

La viabilidad de las células utilizadas en todos los experimentos se determinó mediante el método de exclusión de azul tripano<sup>42</sup>, y esta fue superior al 95%.

#### 4.6 Protocolo de Quimiotáxis.

Para la prueba de quimiotáxis se utilizó la prueba de migración en filtros desarrollada por Wilkinson<sup>26, 58</sup>. Brevemente, se prepararon filtros de 8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro los cuales se adhirieron en el extremo de jeringas insulínicas previamente cortadas en uno de sus extremos. El compartimiento inferior de cada cámara contenía sólo el material de prueba en un volumen final de 5 mL del agente quimiotáctico a probar, contenido esto dentro de un vaso de precipitados de 10 mL de volumen. El compartimiento superior de cada cámara contenía 0.20 mL de las suspensiones celulares a la concentración determinada en medio RPMI-1640, contenido esto en las jeringas previamente preparadas (Figura 6). Las cámaras se incubaron a 37°C por tres horas.

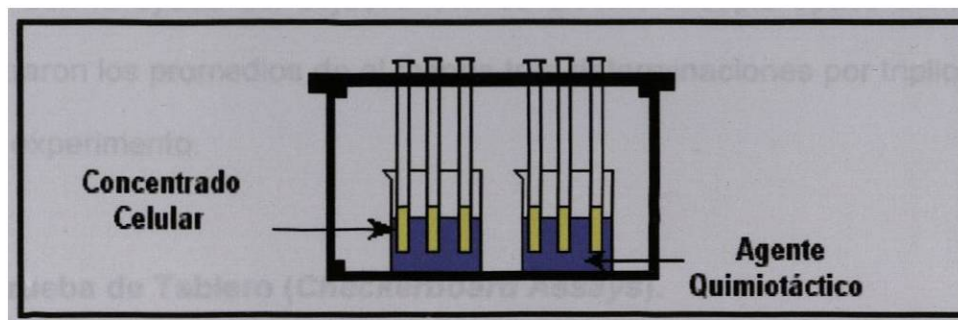


Figura 6. Cámara de quimiotáxis de Wilkinson.

#### 4.7 Tinción y Fijación.

Al finalizar el período de incubación, los filtros se separaron de las jeringas con la ayuda de etanol absoluto y se tiñeron según las indicaciones



de la tabla 1. Por último, se montaron los filtros entre un portaobjetos y cubreobjetos después de que estos se han secado, y finalmente se sellaron con resina sintética o parafina en su contorno.

Reactivo	Tiempo
Agua destilada	1 min.
Hematoxilina	30 seg. – 1 min.
Agua destilada	1 min.
Agua corriente	10 min.
Etanol 70%	2 min.
Etanol 95 %	3 min.
Mezcla (Butanol 20% + Etanol 80%)	5 min.
Xilol	10 min.

#### **4.8 Cuantificación Celular.**

Se cuantificaron las células que migraron a la superficie externa de los filtros con la ayuda del objetivo 40x de un microscopio óptico común. Se registraron los promedios de al menos tres determinaciones por triplicado en cada experimento.

#### **4.9 Prueba de Tablero (*Checkerboard Assays*).**

Para definir si el tipo de actividad encontrada en los biomoduladores era quimiotáctica ó quimiocinética se desarrollaron pruebas de tablero en gradientes, en donde el biomodulador a una determinada concentración se colocó sólo en el compartimiento inferior (gradiente positivo hacia el factor quimiotáctico), en ambos compartimentos (ausencia de gradiente

quimiotáctico) y sólo en el compartimiento superior (gradiente negativo hacia el factor quimiotáctico); esto de acuerdo al método del “checkerboard assays” desarrollado por Zigmod y Hirsch<sup>63</sup>.

#### **4.10 Análisis Estadístico.**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media de determinaciones por triplicado por tratamiento de tres experimentos independientes para un total de nueve repeticiones por grupo. Se utilizó la prueba *t* de Student para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas entre el grupo tratado y el control.

## Capítulo V

### RESULTADOS

#### 5.1 Efecto del EDL bovino sobre la migración celular.

Los resultados que se muestran en las figuras 7 y 8, indican que el EDL bovino incrementó la migración de linfocitos humanos (0.012 – 0.2 U/mL) y rata (0.1 – 0.2 U/mL) en forma significativa ( $P < 0.05$ ) y dependiente de la concentración del biomodulador. Ambas figuras, muestran una tendencia progresiva de movimiento celular, siendo las células de bazo de rata las que en mayor cantidad migraron con una media de 81 células por filtro en la concentración de 0.2 U/mL, comparado esto, con las 48 células de sangre periférica humana en la misma dosis.

##### 5.1.1 Identificación del tipo de locomoción provocada por el EDL bovino.

A través de la prueba de tablero, se identificó el movimiento ocasionado por el EDL bovino como una locomoción dirigida ó quimiotáctica, lo cual se corroboró al observándose un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) del gradiente positivo en contra de los demás gradientes, esto tanto en células de sangre periférica humana (Figura 9) como de células de bazo de rata (Figura 10) .

## **5.2 Efecto de la NE sobre la migración celular.**

Se demostró que la NE estimuló la migración de células de sangre periférica humana (Figura 11) estimuladas con cinco diferentes concentraciones de NE de manera significativa ( $P < 0.01$ ) y dependiente de las dosis del biomodulador; mientras que las células de timo de rata (Figura 12) se inhibieron ( $P < 0.01$ ) en forma inversamente proporcional a la concentración de NE.

### **5.2.1 Identificación del tipo de locomoción provocada por la NE.**

Por otro lado, la prueba de tablero muestra un pequeño aumento de células en la columna sin gradiente esto por igual, tanto en células de sangre periférica humana ( $P < 0.01$ ) (Figura 13) como células de timo de rata ( $P < 0.05$ ) (Figura 14), lo cual nos indica que la migración de células ocurre de forma quimiocinética en ambos casos.

## **5.3 Efecto del SNC80 sobre migración celular.**

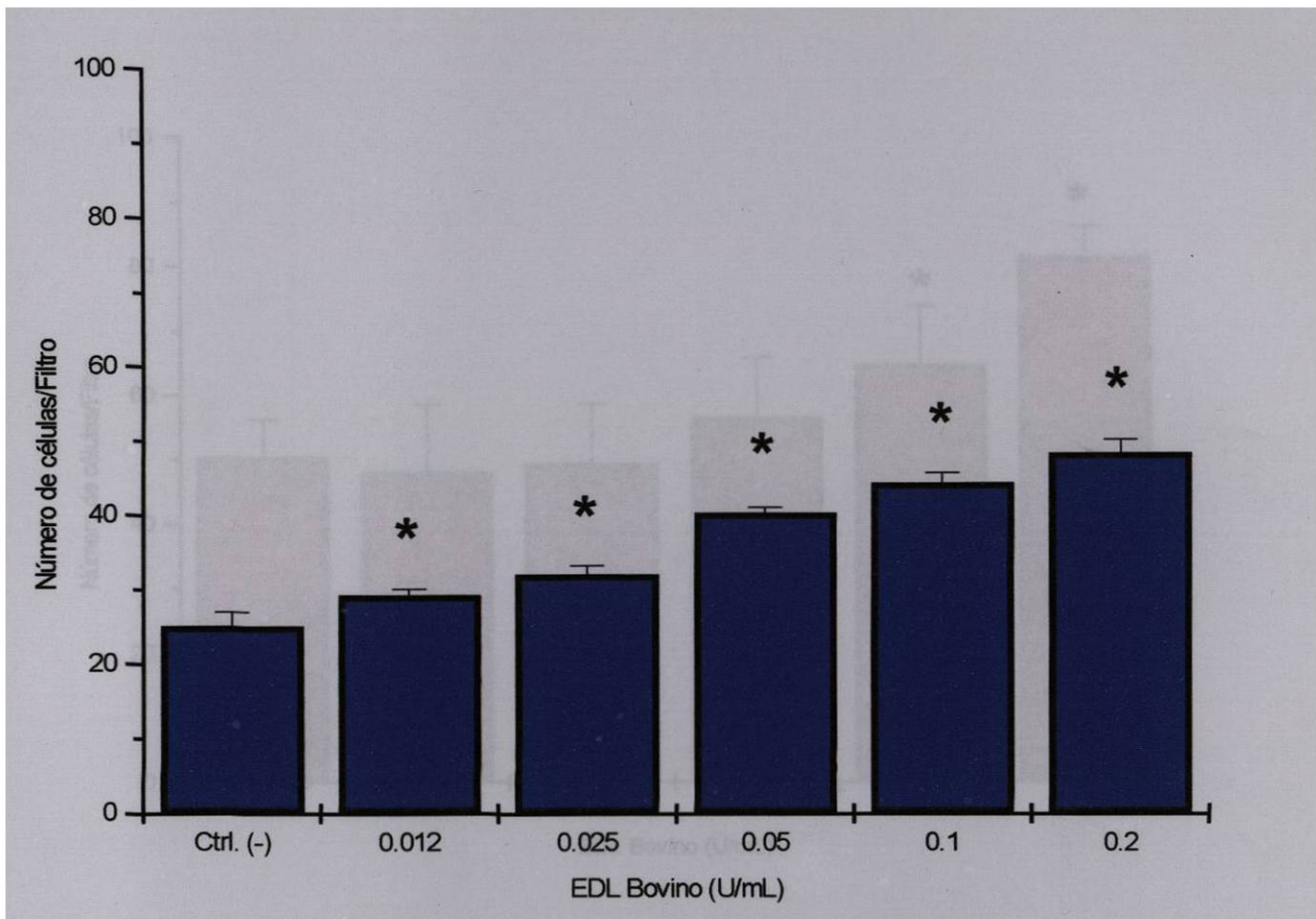
Las células de sangre periférica humana (Figura 15) y células de timo de rata (Figura 16) fueron tratadas con cinco diferentes concentraciones de SNC80, observándose una estimulación de la quimiotaxis de manera significativa ( $P < 0.01$ ) y en forma dependiente de la dosis observándose una dosis-respuesta en el uso del biomodulador.

### **5.3.1 Identificación del tipo de locomoción provocada por el SNC80.**

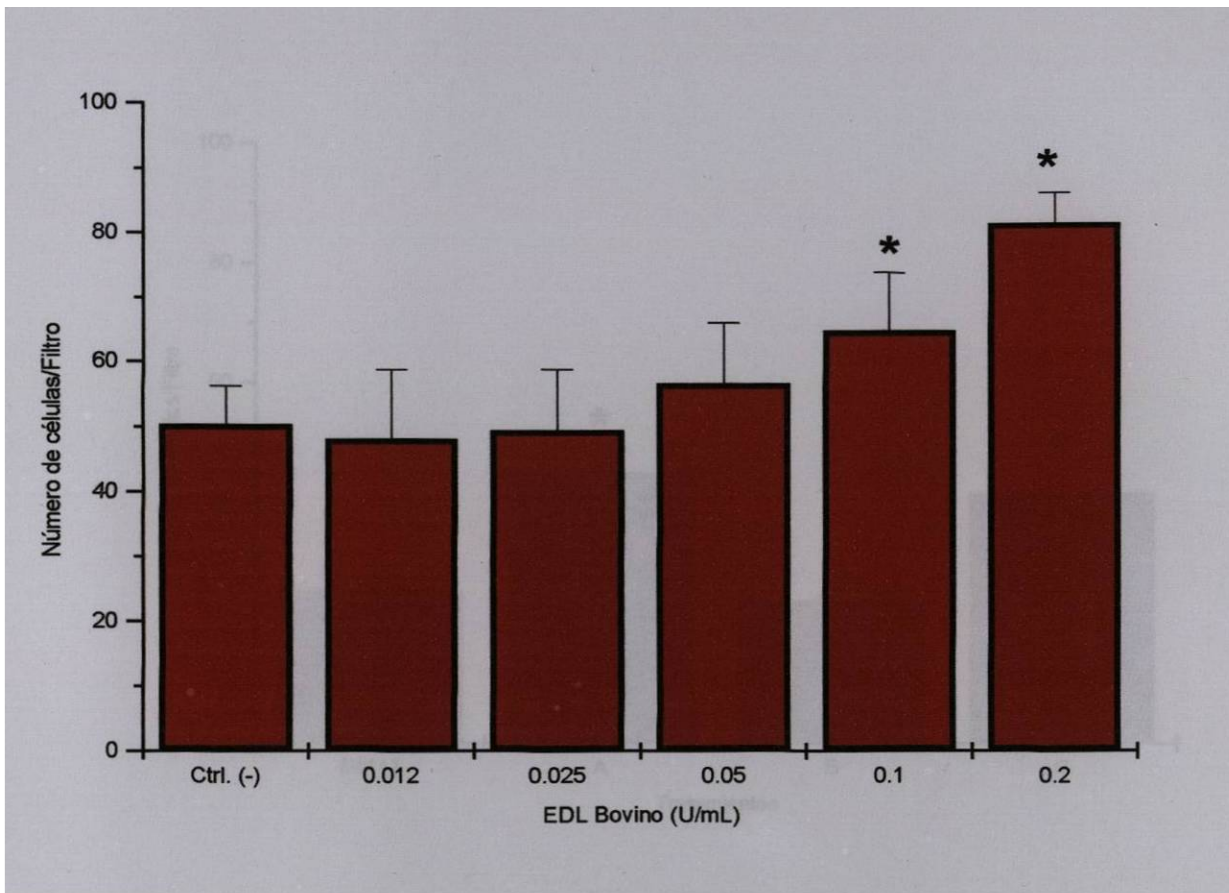
Se demostró la actividad quimiotáctica en pruebas de gradientes, la mayor respuesta de células de sangre periférica humana (Figura 17) y células de timo de rata (Figura 18) se encontró en el gradiente positivo con una significancia en ambos casos de  $P < 0.05$ , mientras que la respuesta hacia los demás gradientes fue menor.

### **5.4 Efecto del antagonista naloxona ( $\mu$ ) en la migración de células de sangre periférica humana y timo de rata tratadas con SNC80.**

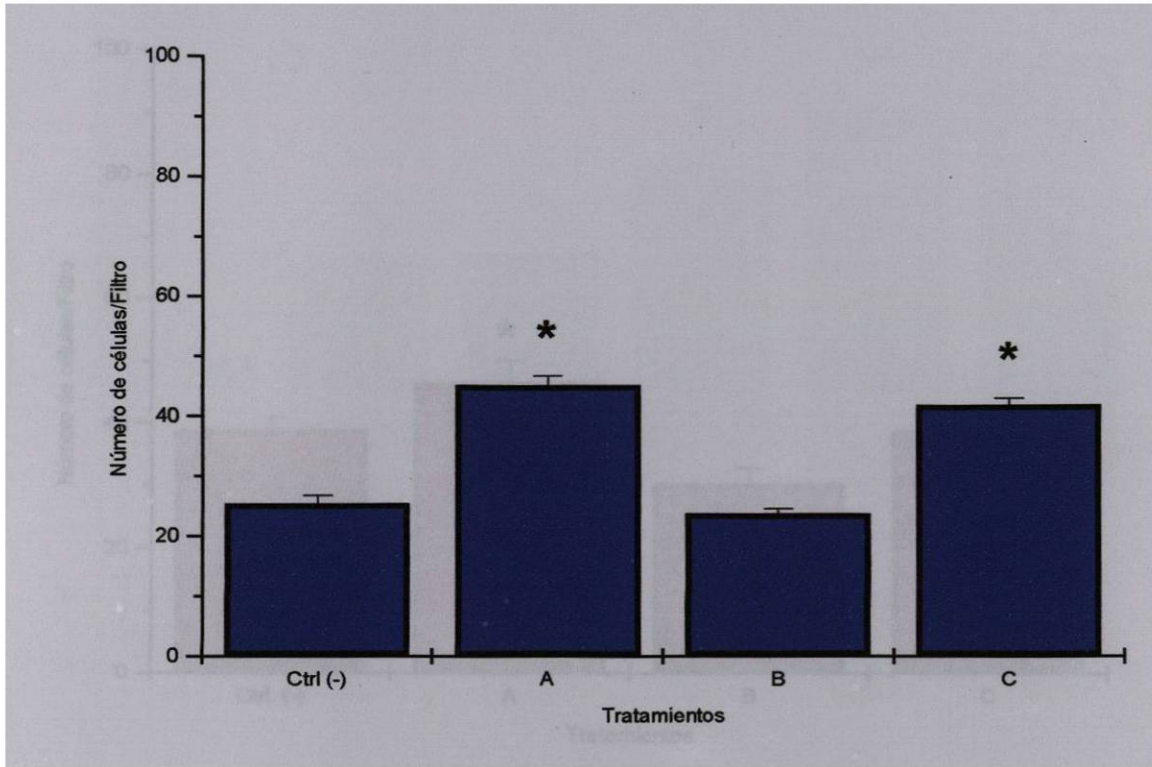
Se demostró que la actividad quimiotáctica inducida por el SNC80 en dosis óptimas de  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$  M, fue inhibida por el antagonista naloxona ( $\mu$ ) en pruebas de gradientes. El grupo tratado con naloxona + SNC80 presentó una inhibición de la migración celular de aproximadamente un 80% respecto al grupo tratado solo con SNC80, esto tanto en células de sangre periférica humana (Figura 19) como de timo de rata (Figura 20). En ambos casos de  $P < 0.05$ .



**Figura 7. Efecto del EDL bovino sobre la migración de células de sangre periférica humana.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde células de sangre periférica se aislaron mediante la técnica de Ficoll Hypaque-1077 y concentradas a  $1 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con varias concentraciones de EDL bovino y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tifen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.01$  comparado con el control negativo.

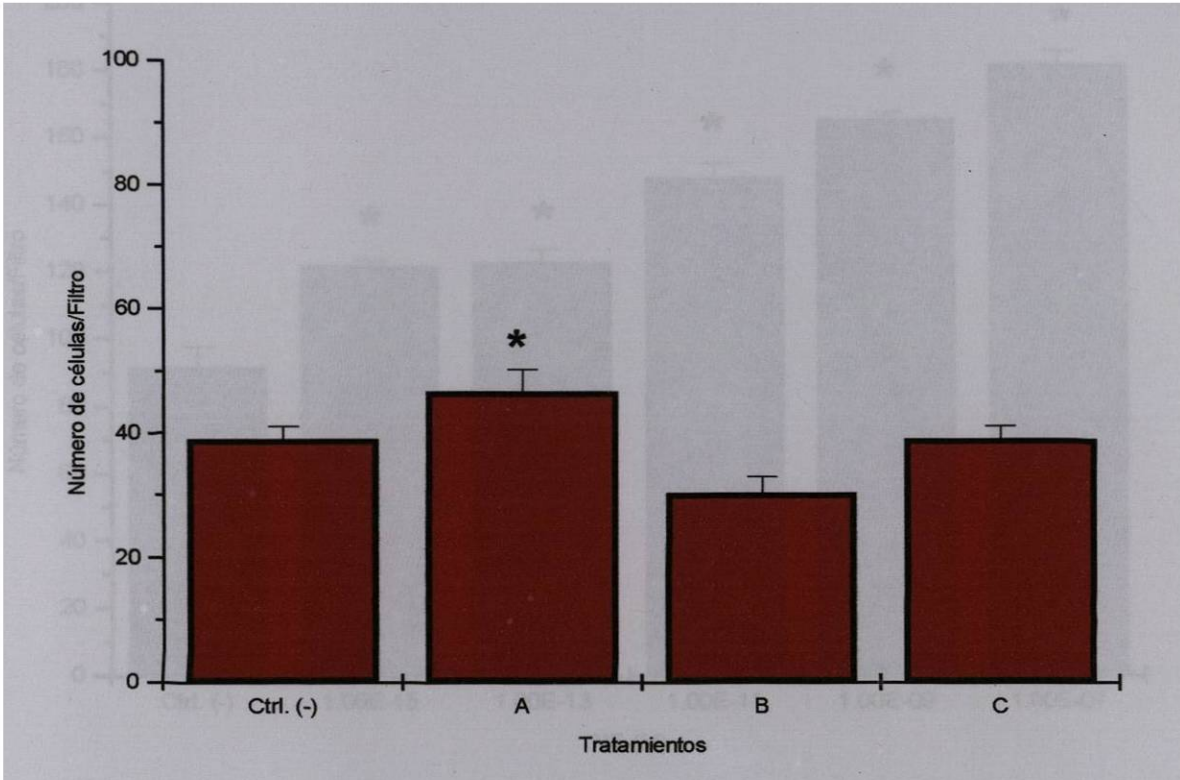


**Figura 8. Efecto del EDL bovino sobre la migración de células de bazo de rata.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde el bazo de rata se aisló, maceró y lavó con medio RPMI-1640 y concentradas las células después a  $1 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con varias concentraciones de EDL bovino y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tifen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.

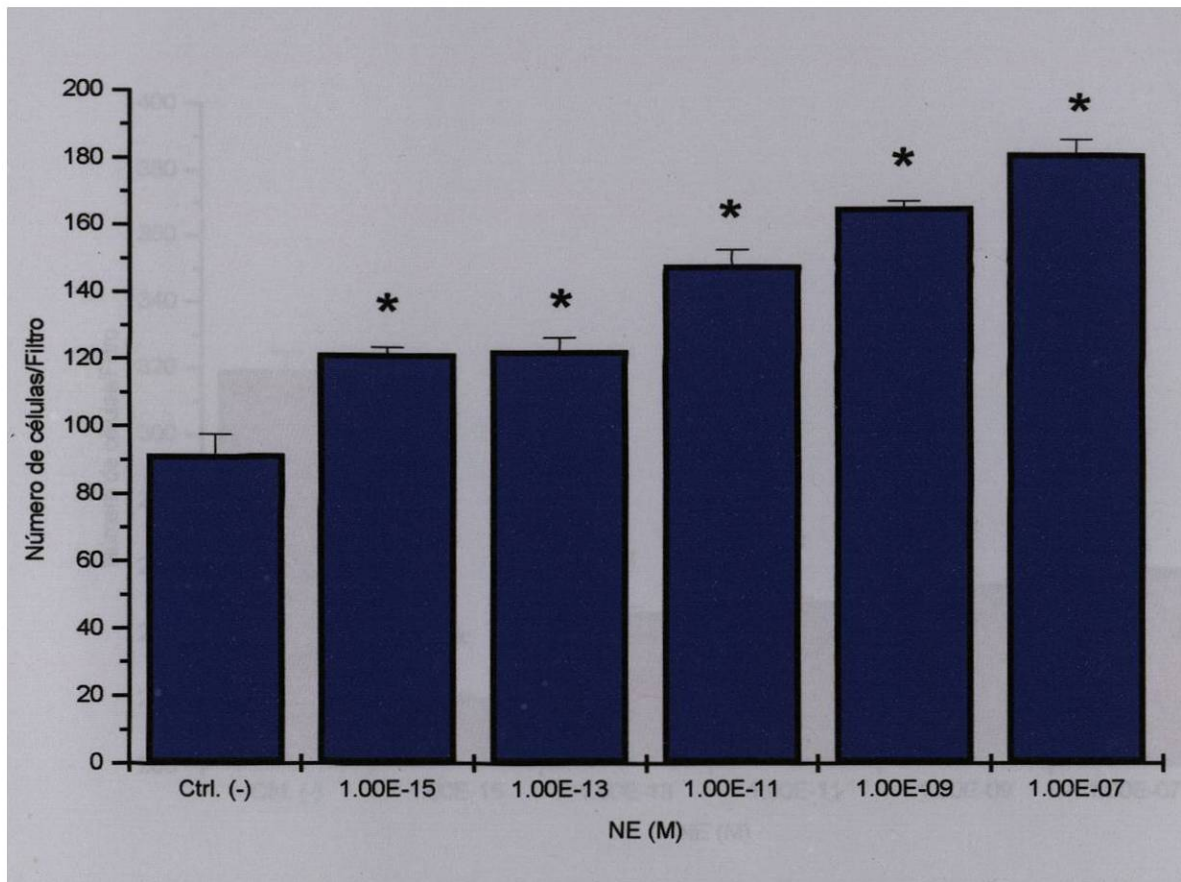


**Figura 9. Identificación del tipo de locomoción inducida por el EDL bovino a través del método de tablero de células de sangre periférica humana. Se utilizan pruebas de tablero (checkerboard assays), en donde células de sangre periférica humana se aislaron mediante la técnica de Ficoll Hypaque-1077 y concentradas a  $1 \times 10^6$  células/mL. Utilizando tres diferentes gradientes: A) Gradiente positivo, B) Sin Gradiente y C) Gradiente negativo, utilizando una dosis óptima de 0.2 U/mL, y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a 37°C por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.**

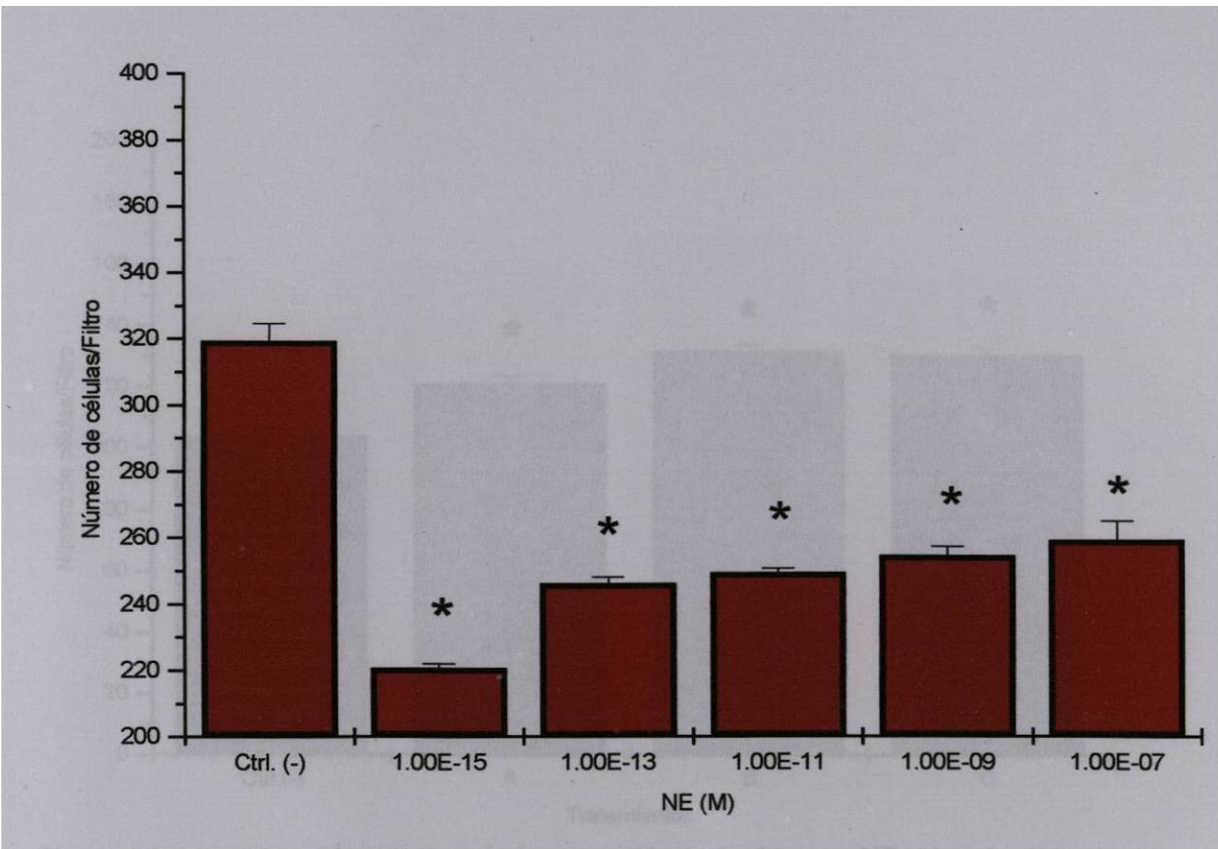




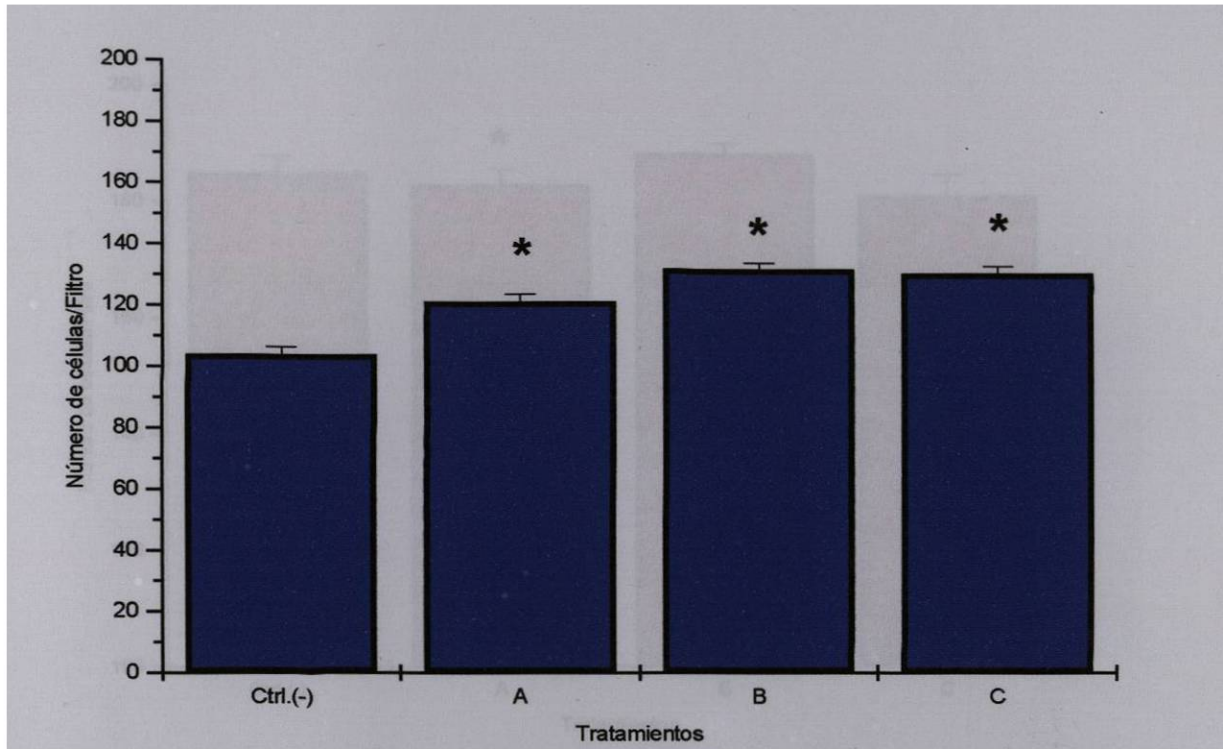
**Figura 10. Identificación del tipo de locomoción por el método de tablero de células de bazo de rata.** Se utilizan pruebas de tablero (checkerboard assays), en donde células de bazo de rata se aislaron, maceraron y lavaron con medio RPMI-1640 y concentradas a  $1 \times 10^6$  células/mL. Utilizando tres diferentes gradientes: A) Gradiente positivo, B) Sin Gradiente y C) Gradiente negativo, utilizando una dosis óptima de 0.2 U/mL, y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a 37°C por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.



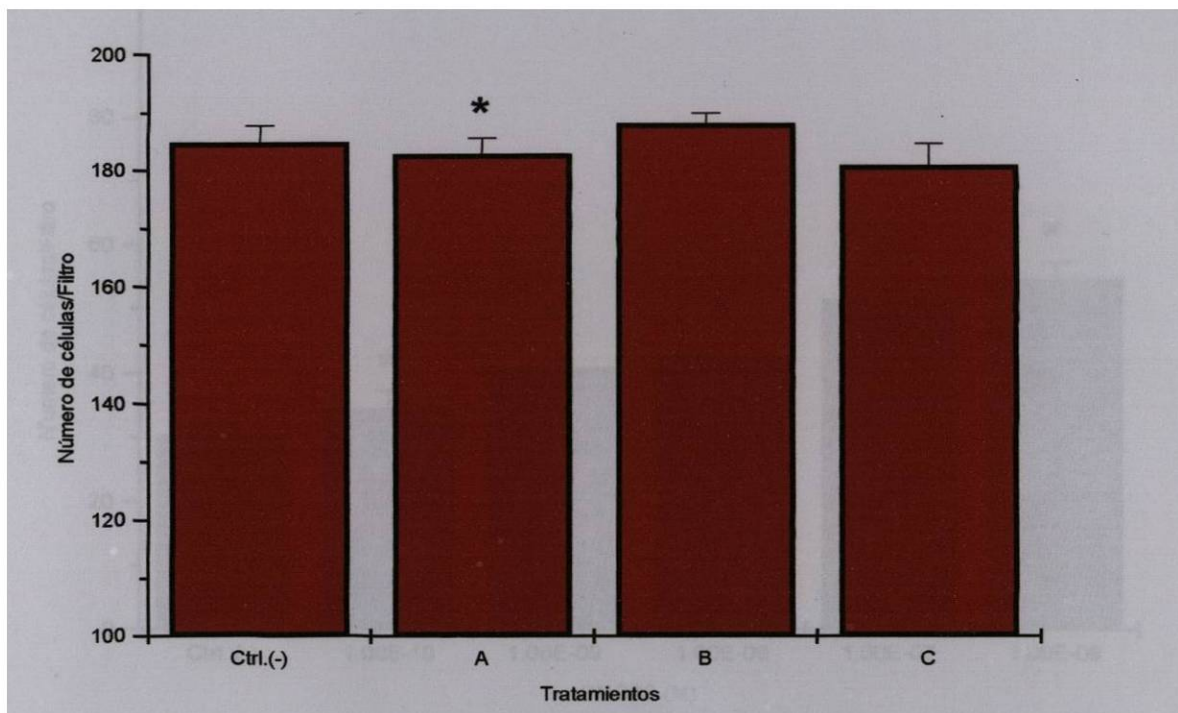
**Figura 11. Efecto de la norepinefrina sobre la migración de células de sangre periférica humana.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde células de sangre periférica humana se aislaron mediante la técnica de Ficoll Hypaque-1077 y concentradas a  $6 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con varias concentraciones de NE y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.01$  comparado con el control negativo.



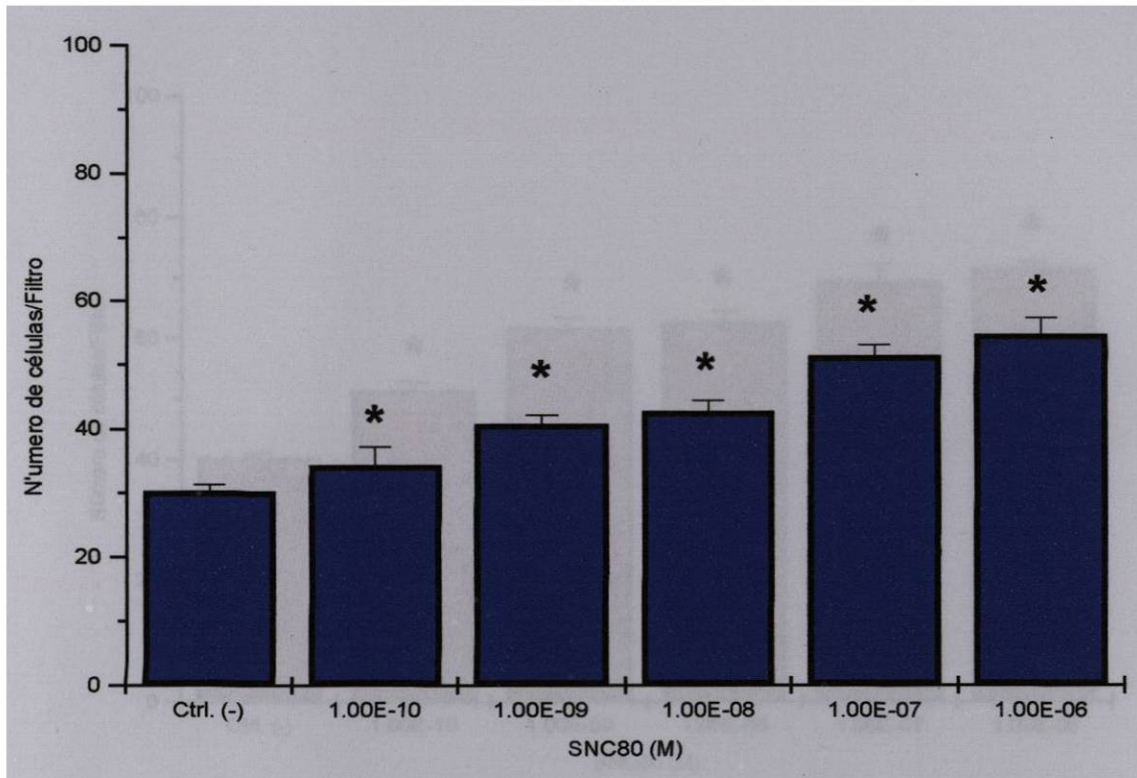
**Figura 12. Efecto de la norepinefrina sobre la migración de células de timo de rata.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde el timo de rata se aisló, maceró y lavó con medio RPMI-1640 y concentradas las células después a  $6 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con varias concentraciones de NE y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.01$  comparado con el control negativo.



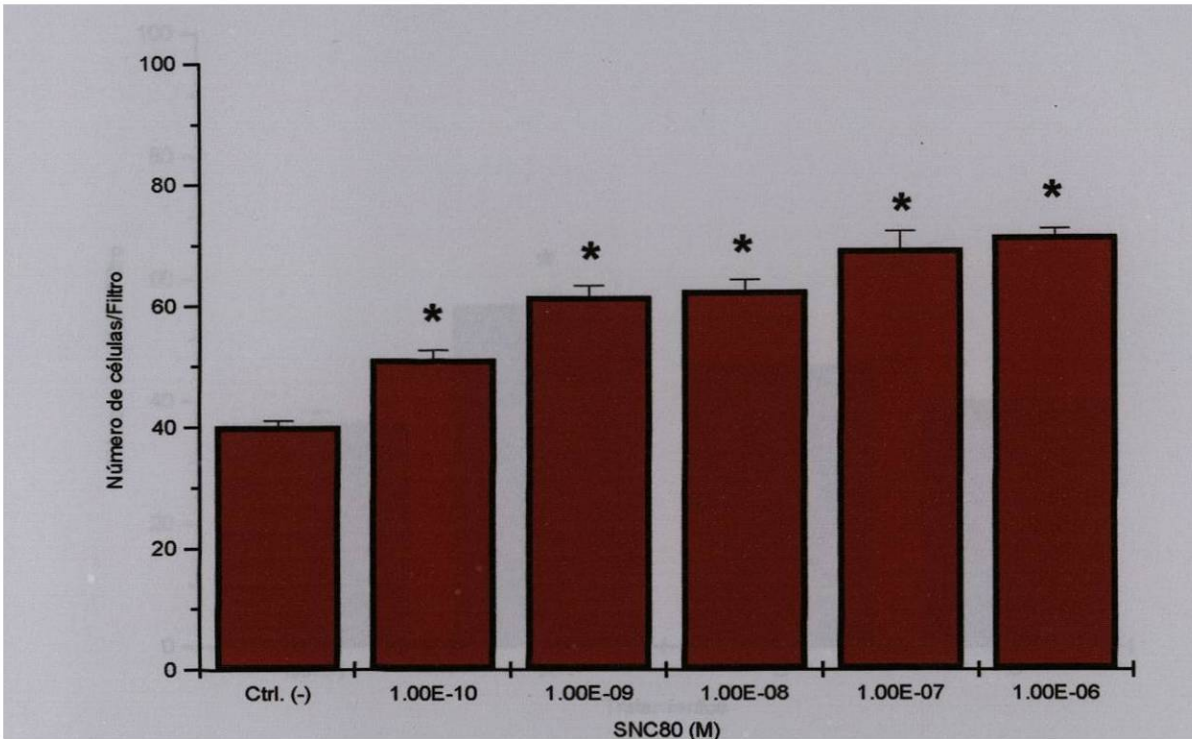
**Figura 13. Identificación del tipo de locomoción inducida por NE a través del método de tablero de células de sangre periférica humana. Se utilizan pruebas de tablero (checkerboard assays), en donde células de sangre periférica se aislaron mediante la técnica de Ficoll Hypaque-1077 y concentradas a  $6 \times 10^6$  células/mL. Utilizando tres diferentes gradientes: A) Gradiente positivo, B) Sin Gradiente y C) Gradiente negativo, utilizando una dosis óptima de  $10^{-7}$  M y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tifen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.01$  comparado con el control negativo.**



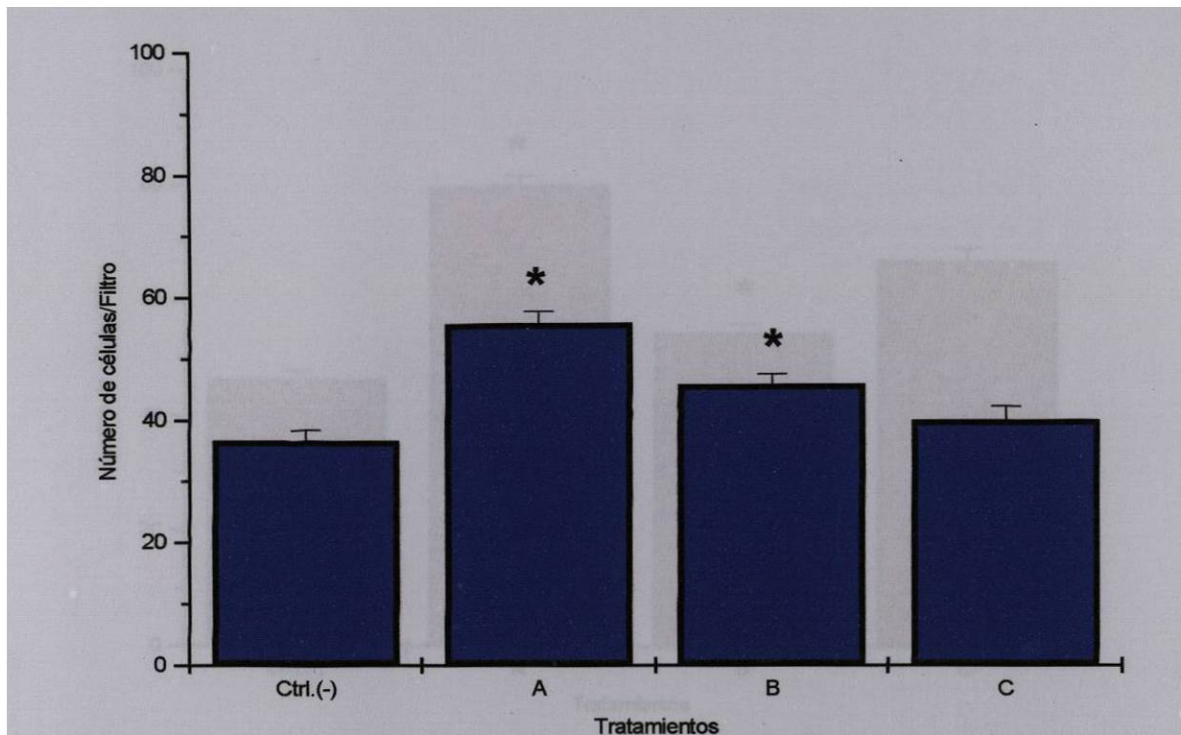
**Figura 14. Identificación del tipo de locomoción inducida por NE a través del método de tablero de células de timo de rata. Se utilizan pruebas de tablero (checkerboard assays), en donde células de timo de rata se aislaron, maceraron y lavaron con medio RPMI-1640 y concentradas a  $6 \times 10^6$  células/mL. Utilizando tres diferentes gradientes: A) Gradiente positivo, B) Sin Gradiente y C) Gradiente negativo, utilizando una dosis óptima de  $10^{-7}$  M y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.**



**Figura 15. Efecto DEL SNC80 sobre la migración de células de sangre periférica humana.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde células de sangre periférica se aislaron mediante la técnica de Ficoll Hypaque-1077 y concentradas a  $2 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con varias concentraciones de SNC80 y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tifen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.01$  comparado con el control negativo.

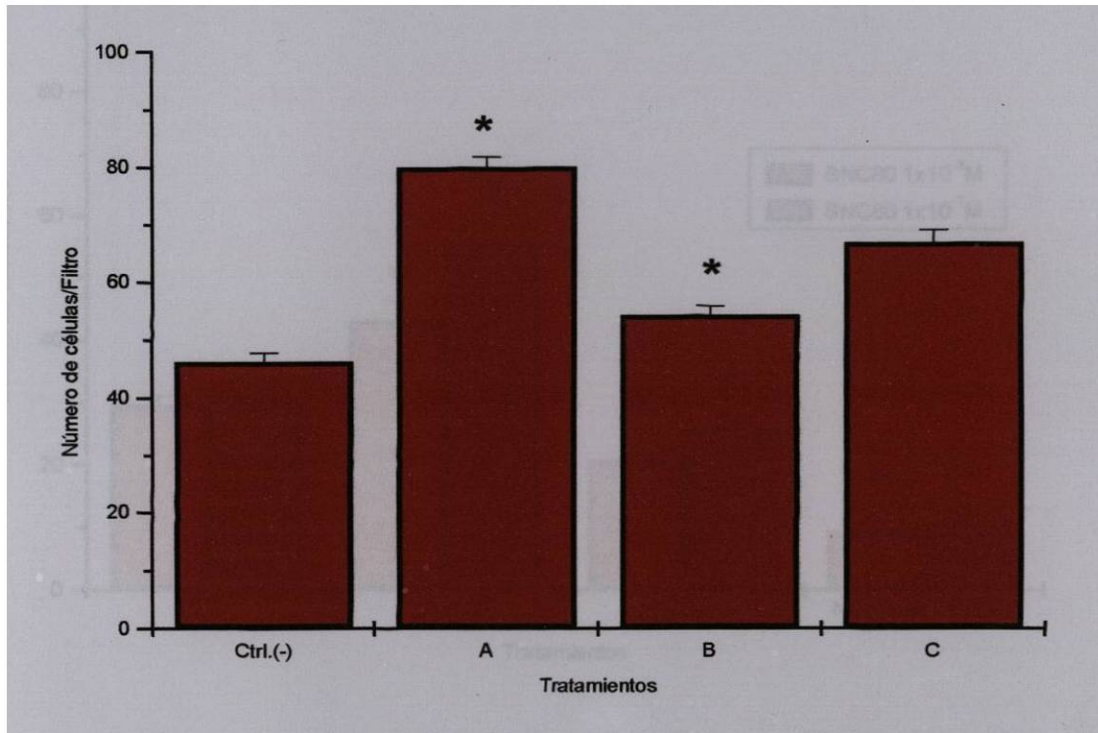


**Figura 16. Efecto del SNC80 sobre la migración de células de timo de rata.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde el timo de rata se aisló, maceró y lavó con medio RPMI-1640 y concentradas las células después a  $2 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con varias concentraciones de SNC80 y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.01$  comparado con el control negativo.



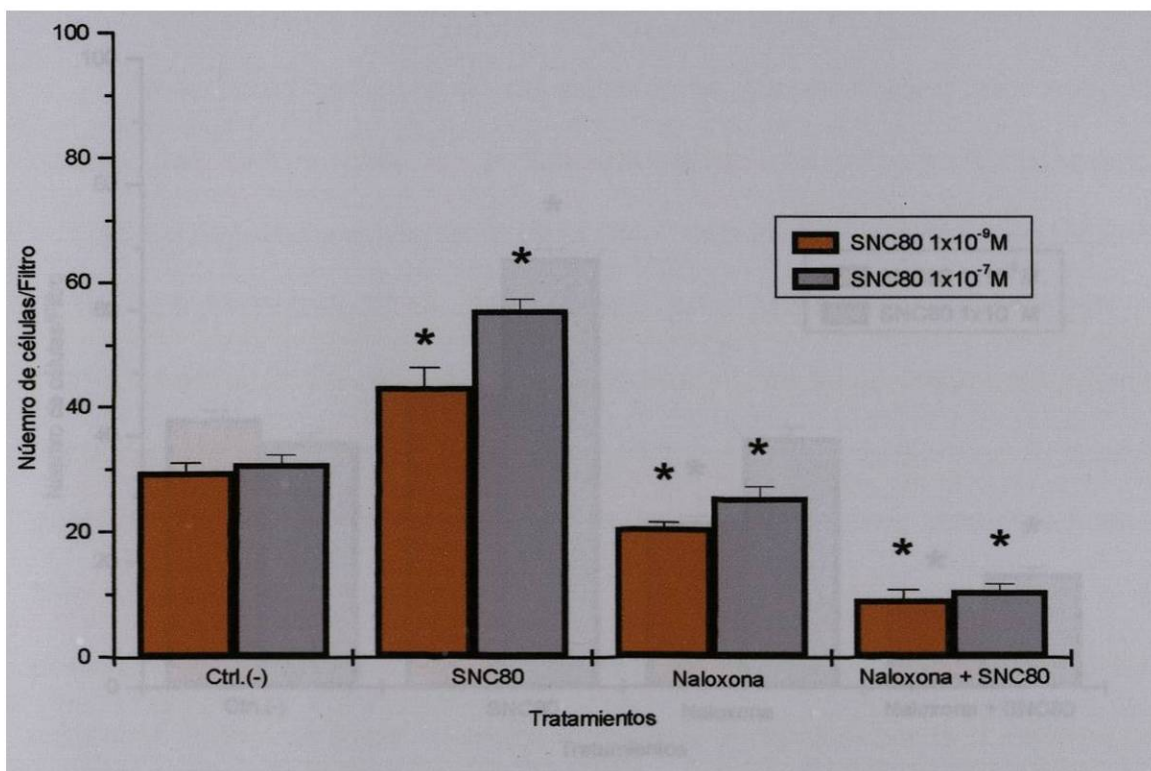
**Figura 17. Identificación del tipo de locomoción inducida por SNC80 a través del método de tablero de células de sangre periférica humana. Se utilizan pruebas de tablero (checkerboard assays), en donde células de sangre periférica se aislaron mediante la técnica de Ficoll Hypaque-1077 y concentradas a  $2 \times 10^6$  células/mL. Utilizando tres diferentes gradientes: A) Gradiente positivo, B) Sin Gradiente y C) Gradiente negativo, utilizando una dosis óptima de  $10^{-6}$  M y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.**



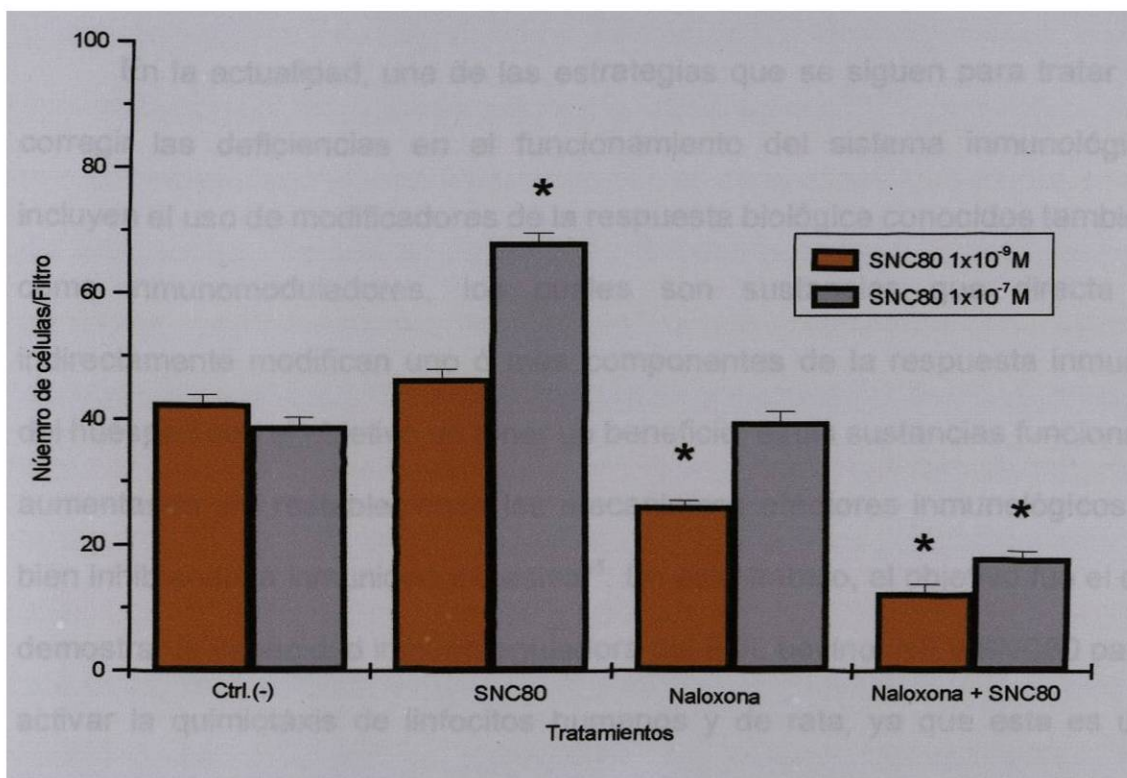


**Figura 18. Identificación del tipo de locomoción inducida por el SNC80 a través del método de tablero de células de timo de rata. Se utilizan pruebas de tablero (checkerboard assays), en donde células de timo de rata se aislaron, maceraron y lavaron con medio RPMI-1640 y concentradas a  $2 \times 10^6$  células/mL. Utilizando tres diferentes gradientes: A) Gradiente positivo, B) Sin Gradiente y C) Gradiente negativo, utilizando una dosis óptima de  $10^{-6}$  M y medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h. y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo.**

\*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.



**Figura 19. Efecto del antagonista naloxona ( $\mu$ ) en la migración de células de sangre periférica humana tratadas con SNC80.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde células de sangre periférica se aislaron mediante la técnica de Ficoll Hypaque-1077 y concentradas a  $2 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con dos concentraciones óptimas en tres diferentes tratamientos, 1) solo el SNC80 2) solo la naloxona 3) SNC80 + naloxona; además de medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h y tifen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.



**Figura 20. Efecto del antagonista naloxona ( $\mu$ ) en la migración de células de timo de rata tratadas con SNC80.** Se utiliza la técnica de Wilkinson, en donde el timo de rata se aisló, maceró y lavó con medio RPMI-1640 y concentradas las células a  $2 \times 10^6$  células/mL. Estas se estimularon con dos concentraciones optimas en tres diferentes tratamientos, 1) solo el SNC80 2) solo la naloxona 3) SNC80 + naloxona; además de medio RPMI-1640 como control negativo. Se incuban a  $37^\circ\text{C}$  por 3h y tiñen mediante la técnica de hematoxilina, para finalmente cuantificar el número total de células en la superficie externa de los filtros. La figura representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo. \*  $P < 0.05$  comparado con el control negativo.

## Capítulo VI

### DISCUSION

En la actualidad, una de las estrategias que se siguen para tratar de corregir las deficiencias en el funcionamiento del sistema inmunológico incluyen el uso de modificadores de la respuesta biológica conocidos también como inmunomoduladores, los cuales son sustancias que directa o indirectamente modifican uno ó más componentes de la respuesta inmune del huésped con el objetivo de tener un beneficio; estas sustancias funcionan aumentando y/o restableciendo los mecanismos efectores inmunológicos ó bien inhibiendo la inmunidad excesiva<sup>35</sup>. En este trabajo, el objetivo fue el de demostrar la capacidad inmunoreguladora del EDL bovino, NE y SNC80 para activar la quimiotáxis de linfocitos humanos y de rata, ya que esta es un importante fenómeno de la respuesta inmune y esencial en la respuesta contra infecciones<sup>62</sup>

La utilidad que tiene el EDL bovino como inmunomodulador en el tratamiento de enfermedades se basa en la capacidad que posee para desencadenar de una manera selectiva una respuesta inmune celular específica hacia un Ag dado. El EDL bovino induce efectos biológicos *in vitro* como, el incremento de CD2 en linfocitos T, la activación de monocitos-macrófagos, y la producción de IL-1. Por el contrario inhibe la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), mejora la actividad defectuosa de la quimiotáxis de leucocitos, al igual que la función de las células asesinas naturales (NK). En estudios *in vivo*, aumenta la reacción contra

injerto en pacientes inmunodeprimidos y aumenta la ADCC y la actividad de las células NK<sup>17, 18</sup>. Previamente se ha demostrado que el EDL tiene como efecto la inhibición de la migración de células de rata, según el método de placas de agarosa y se identifico que esta estrechamente relacionado con la concentración del factor de transferencia ó EDL bovino<sup>60, 62</sup>. En cambio, en el trabajo desarrollado en este laboratorio hemos demostrado que en presencia del EDL bovino, las células de sangre periférica humana y de bazo de rata presentan un incremento significativo de la quimiotáxis de manera dependiente a la dosis del inmunomodulador y de forma quimiotáctica en su locomoción, confirmando lo señalado por otros autores que han descrito que la quimiotáxis de monocitos humanos se incrementa significativamente al estar bajo él estímulo del EDL, esto aplicado en terapia médica<sup>37</sup>. Mientras que otros, han demostrado usando el método de agarosa en placas, que la actividad del EDL en la quimiotáxis de células mononucleares es dependiente expresamente de la concentración del agente quimiotáctico, siendo además una locomoción dirigida<sup>61</sup>. Por otra parte la composición variable del EDL y la obtención de un principio activo no estandarizado puede explicar diferencias en los resultados entre los diversos estudios realizados, lo cual sigue siendo un problema aun no resuelto.

Mientras que en muchos estudios *in vitro* se ha encontrado que las catecolaminas modulan la capacidad funcional de los linfocitos, poco es aun lo que se conoce acerca del efecto de estos neurotransmisores en células del sistema inmunológico<sup>41</sup>. En nuestros resultados obtenidos de tres experimentos independientes, se observó que la NE suprimió la migración de las células de timo de rata en forma inversamente proporcional a la

concentración, supresión que se revertía conforme aumentaba la dosis empleada; esto coincide con investigaciones previas que señalan que altas concentraciones ( $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  M) inhiben la migración de macrófagos de ratones adultos de más de seis semanas de edad, esto bajo la técnica de Boyden<sup>45</sup>. Mientras que con las células de sangre periférica humana, en nuestro trabajo, la NE potencia la migración de manera dependiente a la dosis del biomodulador, reafirmado esto, con estudios realizados con anterioridad donde macrófagos ó monocitos humanos estimulados con NE identifican a este, como un fuerte quimioattractante para estas células a bajas concentraciones y de manera quimiotáctica en su movimiento, lo cual difiere con nuestros resultados donde la migración fue observada de manera quimiocinética<sup>55</sup>. Otros estudios han mostrado que la quimiotaxis de neutrófilos humanos se reduce después de seis horas de exposición con el biomodulador<sup>12, 38</sup>.

Como ya se ha mencionado, los macrófagos tienen numerosas funciones inmunológicas incluyendo la producción de citocinas, fagocitosis de organismos extraños, y quimiotaxis en sitios de inflamación. Dada su importancia funcional en la defensa de los organismos también han sido objeto de diversos estudios sobre la actividad moduladora de compuestos opioides. Por otro lado, de acuerdo a Deitch y cols., la morfina tiene un efecto profundo en la función de los neutrófilos *in vivo* al disminuir la quimiotaxis por neutrófilos, si bien aumenta la actividad bactericida de estos, otros opioides (naloxona y met-encefalina) no tienen efecto en los neutrófilos. Solo la *beta*-endorfina logró alterar la sensibilidad de los linfocitos a la estimulación mitogénica. Estos resultados muestran que los opioides

pueden modular la función *in vitro* de linfocitos y neutrófilos, lo que apoya el concepto de que los cambios en la actividad neuroendocrina pueden potencialmente alterar la función inmune<sup>13</sup>. Los opioides pueden incrementar, suprimir, o no tener efecto alguno en las funciones de las células del sistema inmune; dichas diferencias se relacionan con el origen de las células, el tipo y dosis del opioide, la vía de administración, y la duración del tratamiento<sup>24</sup>. En cuanto a los efectos del SNC80 sobre el sistema inmune, Nowak y cols. encontraron que la inyección intracerebroventricular del opioide no afecta la actividad de las células NK, la proliferación de linfocitos tímicos, la producción de IL-2, de óxido nítrico (NO<sub>2</sub>) y TNF- $\alpha$  inducido por interferón- $\gamma$  ó lipopolisacárido (LPS)<sup>44</sup>. A su vez, Gómez-Flores y cols. observaron que el SNC80 activa la producción *in vitro* del TNF- $\alpha$  y el NO<sub>2</sub> producidos por macrófagos peritoneales residentes de rata estimulados con LPS<sup>25</sup>. Nosotros hemos demostrado un incremento significativo en la migración celular tanto en células de sangre periférica humana como de timo de rata bajo el efecto del SNC80 y de manera quimiotáctica en su locomoción en ambos casos; esto es confirmado por trabajos presentados con anterioridad, donde opioides *kappa* inducen la quimiotaxis de neutrófilos de medula ósea de ratón, al igual que opioides peptídicos como, *D*-ala-*D*-leuencefalina y *beta*-endorfina los cuales estimulan la migración de células mononucleares humanas en una dosis óptima de 10<sup>-8</sup> M en forma quimiotáctica<sup>51</sup>, al igual que Simpkins y cols., que muestran un potenciamiento en la quimiotaxis de neutrófilos humanos en una dosis óptima de 10<sup>-9</sup> M usando la técnica en placas de agarosa<sup>52</sup>. Además, se demostró en nuestro trabajo, que la actividad quimiotáctica

inducida por el SNC80 en dosis óptimas de  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$  M fue inhibida significativamente por el antagonista naloxona ( $\mu$ ) tanto en células de sangre periférica humana, como de timo de rata. Por otro lado en situaciones clínicas, se ha identificado que individuos que abusan de drogas intravenosas muestran defectos en la actividad quimiotáctica de monocitos, pues estos al ser incubados con morfina y heroína a tres diferentes concentraciones en el rango de  $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  M donde en todos los casos se identifica una inhibición de la quimiotaxis<sup>46</sup>.

Las observaciones hechas en este estudio, indican que los biomoduladores utilizados podrían ser una alternativa terapéutica en el tratamiento de varias enfermedades relacionadas con procesos de tipo inflamatorio, donde la potenciación ó inhibición la migración celular podría marcar una evolución clínica favorable.



## **Capítulo VII**

### **CONCLUSIONES**

- El EDL bovino estimula la migración de células de sangre periférica humana y de bazo de rata.
- El movimiento generado por el EDL bovino es del tipo dirigido ó quimiotáctico.
- La NE estimula la migración de células de sangre periférica humana e inhibe la migración de células de timo de rata inversamente proporcional a la concentración de este.
- La actividad inducida por la NE en las células de sangre periférica humana y de timo de rata es de tipo quimiocinético ó aleatorio.
- El SNC80 estimula la migración de células de sangre periférica humana y de timo de rata.
- El tipo de locomoción identificada para el SNC80 es del tipo dirigida o quimiotáctica.

## Capítulo VIII

### BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (1997). Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Co.
2. Addison I.E. and Babbage J.W., 1976. A raft technique for chemotaxis: a versatile method suitable for clinical studies. *Journal of Immunological Methods*. pp. 385 - 388.
3. Adler, M.W., Geller, E.B., Rogers, T.J., Henderson, E.E., and Eisenstein, T.K. (1993). Opioids, receptors, and immunity. *Adv.Exp.Med.Biol.* 335, 13-20.
4. Blatteis, C.M., Xin, L., and Quan, N. (1991). Neuromodulation of fever: apparent involvement of opioids. *Brain Res. Bull.* 26, 219-223.
5. Boetcher, D.A. and E.J. Leonard, 1974. *Cancer Inst.* 52, 1091.
6. Boyden, S.W., 1962, *J. Exp. Med.* 115, 453.
7. Caballero-Hernández, D., R. Taméz-Guerra, C. Rodríguez-Padilla, P. Taméz-Guerra, R. J. Weber, R. Gómez-Flores. 2001. Regulación neuroendocrina del sistema inmune. *Ciencia UANL, México.* 4(2):205-214.

(Htlo?)

8. Calderon, S.N.; Rothman, R.B.; Porreca, F.; Flippen-Anderson, J.L.; McNutt, R.W.; Xu, H.; Smith, L.E.; Bilsky, E.J.; Davis, P.; Rice, K.C.(1994). Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+) (+)-4-((alpha R)9-alpha-((2S, 5R)-4-allyl-2, 5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl)-N, N-diethyl-benzamide (SNC 80): A highly selective, nonpeptide opioid receptor. *J Med Chem* 37:2125-2128
9. Carr, D.J.J., Rogers, T.J., and Weber, R.J. (1996). The relevance of opioids and opioid receptors on immunocompetence and immune homeostasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 213, 248-257.
10. Cohen, L; Holzam, R.S., Valentine, F.T., Lawrence, H.S. (1976). Requiriment of precommitted cells as targets for the augmentation of lymphocyte proliferation by leucocyte dialisates. *J Exp Med* 143:171-174.
11. Dafny, N.; Prieto-Gomez, B.; Reyes-Vazquez, C. (1985). *J Neuroimmunol.* <sup>↑, title?</sup> 9, 1.
12. Davis, J.M., Albert, J.D., Tracy, K.J., Calvano, S.E., Lowry, S.F., Shires, S.F., Yurt, R.W. (1991). Increased neutrophil mobilitation and decreased chemotaxis during cortisol and epinephrine infusions. *J Trauma.* 31:725-731.
13. Deitch, E.A.; Xu, D.; Bridges, E.M. (1988). Opioids modulate human neutrophil and lymphocyte function: thermal injury alters plasma beta-endorphin levels. *Surgery* 104: 1 41-8

14. Downey, G. P., 1994, Mechanisms of leukocyte motility and chemotaxis, *Current Opinion in Immunology*. 6:113-124.
15. Downing J.E.G.; Miyan J.A. (2000), *Immunol Today*, 21, 281-289 *Table ?*
16. Dumonde, D.C., Hamblin, A. (1976). Transfer factor: Basic properties and clinical applications (Asher, M.S., Gottlieb, A.A., and Kirkpatrick, C.H.) Academic Press N.Y. 49p.
17. Dupont, B., Bellow, M., and Hansen J. (1974). Effect of transfer factor therapy on mixed lymphocyte culture reactivity. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 71:867-871.
18. Dwyer, J.M. (1996). Transfer factor in the age of molecular biology: a review. *Biotherapy* 9:7-11.
19. Faber J.M. 1998. Chemokines, lymphocytes, and HIV. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. vol. 31 pp. 11 - 17.
20. Fantone, J., R.M. Senior, D.L. Kreutzer, M. Jones, P.A. Ward. 1979. Biochemical quantitation of the chemotactic factor inactivator activity in human serum. *J. Lab. Clin. Med.* 93: 17-24.
21. Felten, D.L. (1991). Neurotransmitter signaling of cells of the immune system: important progress, major gaps. *Brain Behav. Immun.* 5, 2-8.

22. Fireman, P., Boesman, M., Haddad, Z.H. and Gitlin, D. (1967). Passive transfer of tuberculin activity *in vitro*. *Science* 155:337-340.
23. Gallin, J. and Kirpatrick C.H. (1974). Chemotactic activity in dializable transfer factor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 71:498-502.
24. Gómez-Flores, R.; Calderón S.N.; Rice, K.C.; Weber R.J. 2001. Increased tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production by rat macrophage following *in vitro* stimulation and intravenous administration of the delta-opioid agonist SNC80. *Life Sciences* 68(24):2675-2684.
25. Gomez-Flores, R., and R. J. Weber. Opioids, opioids receptors, and the immune system. In: *Cytokines-Stress and Immunity*, N. Plotnikoff, R. Faït, A. Murgo, and R. Good, Eds., pp 281-314, CRC Press, Boca Raton, 1999.
26. Gómez-Flores, R., C. Rodríguez-Padilla and R. Tamez-Guerra. 1990. Early production of a chemotactic factor to T lymphocytes by peritoneal macrophages. *Cellular Immunology* 126:1-15.
27. Grimm, M.C., Ben-Baruch, A., Taub, D.D., Howard, O.M., Resau, J.H., Wang, J.M., Ali, H., Richardson, R., Snyderman, R., and Oppenheim, J.J. (1998). Opiates transdeactivate chemokine receptors: delta and mu opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *J. Exp. Med.* 188, 317-325.
28. Harrada, A et al., 1995. *J. Leuk. Biol.* 56, 559 - 564.

29. Holzman, R.S. and Lawrence (1977). In vitro augmentation of lymphocyte sheep cell rosette formation by leukocyte dialysates. *J Immunol* May 118(5):1672-1676.
30. Lushkova, T.A. and Lushkov (1988). The immunomodulating activity of a transfer factor preparation transflavin, specific to tick-borne encephalitis virus. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* Mar-Apr (2):83-85.
31. Kreutzer, D.L., J.T. O'Flaherty, F.W. Orr, H.J. Showell, E.L. Becker and P.A. Ward. 1979. Quantitative comparison of various biological responses of leucocytes to different chemotactic factors. *Immunopharmacology*. 1: 39 - 47.
32. Lawrence, H.S. (1956). Transfer of delayed hypersensitivity to diphtheria toxin in man. *Am. J. Med.* 20:248.
33. Lawrence, H. S., and S. Al-Askari. 1971. In *In vitro Methods in Cell-Mediated Immunity*. B. R. Bloom, and P. R. Glade, eds. Academic Press, New York, p. 531.
34. Lawrence, H.S. and Borkowsky (1996). Transfer factor-current status and future prospects. *Biotherapy*. 9:1-5.
35. López-Pérez, G. (1996). Modificadores de la respuesta biológica. Un uso racional. *Alergia, asma e inmunología pediátrica*. 5(5):146-147.

36. Lord, J.A., Waterfield, A.A., Hughes, J., and Kosterlitz, H.W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495-499.
37. Lukacs K., Kawai, M., Berenyi, E., Frenzl, G., Schroder, I., Szegedi, G., 1985, Effect of DLE's on the mononuclear leukocytes in Hodgkin's disease, *Haematology*. 18(2): 105-113.
38. McCorkle, F.M., Taylor R.L., Denno, K.M., Jabe, J.M. (1990). Monoamines alter in vitro migration of chicken leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 14:85-93.
39. Maderazo, E.G. and C.L. Woronick. 1978. Micropore filter assay of human granulocyte locomotion: problems and solutions. *Clin. Immunol. Allergy*. 11:196 - 211.
40. Maderazo, E.G., C.L. Woronick, and P.A. Ward. 1979. Leukokinesis-enhancing factor in human serum: partial characterization and relationship to disorders of leukocyte migration. *J. Clin. Invest.* 83: 382 - 395.
41. Madden, K.S., Livnat S. (1991). Catecholamine action and immunologic reactivity. *Psychoneuroimmunology* Academic Press, San Diego, pp 283-310.
42. Mishell, B.B. Shiigi, S.M., Henry, C., Chan, E.L., North, J., Gallily, R., Slomich, M., Miller, K., Marbrook, J., Parks, D., A.H. Good. 1980. Selected

methods in cellular immunology, San Francisco, Freeman W.H. and Company, p.3.

43. Negus, S.S.; Gatch, M.B.; Mello, N.K.; Zhang, X.; and Rice K. (1998) Behavioral effects of the delta-selective opioid agonist SNC 80 and related compounds in rhesus monkey. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286:1 362-375
44. Nowak, J.E., Gomez-Flores, R., Calderon, S.N., Rice, K.C., and Weber, R.J. (1998). Rat natural killer cell, T cell and macrophage functions following intracerebroventricular injection of SNC80. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286:931-937.
45. Ortega E., Garcia J.J., De la Funte M., 2000. Modulation of adherence and chemotaxis of macrophages by norepinephrine. Department of Physiology, Faculty of Sciences, University of Extremadura, Badajoz, Spain.
46. Perez-Castrillon, J.L., Perez-Arellano, J.L., García Palomo J.D., Jimenez-Lopez, A., DeCastro, S. (1992). Opioids depress in vitro human monocyte chemotaxis. *Immunopharmacology*. Jan-Feb. 23(1):57-61
47. Reisine, T.; Pasternak, G. (1996). Analgésicos Opioides y sus antagonistas. Capitulo 23. De Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Vol.1. Editores en jefe Hardman, J.G.; Limbird, L.E. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México.



48. Roitt, I., Brostoff, J, and Male, D. 1998. *Inmunología*. Cuarta edición. Ed. Harcourt & Brace.
49. Rose N.R., Herman Friedman, John L. Fahey. 1986 *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. American Society for Microbiology. pp. 290 - 294.
50. Roy, S., and Loh, H.H. (1996). Effects of opioids on the immune system. *Neurochem. Res.* 21, 1375-1386.
51. Ruff, M.R., Wahl, S.M., Mergenhagen, S., Pert, C.B. (1985). Opiate receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. *Neuropeptides*. Feb; 5(4-6):363-6.
52. Simpkins, C.O., Dickey, C.A., Fink, M.P. (1984). Human neutrophil migration is enhanced by beta-endorphin. *Life Sci.* Jun. 4;34(23):2251-5.
53. Snyderman, R., L.C. Altman, M.S. Hausman and S.E. Mergenhagen, 1972. *J. Immunol.* 108, 857.
54. Stites. Daniel P., A. I. Terr, Tristan G. Pavslow. 1996. *Inmunología Básica y clínica*. El Manual Moderno. 13 - 17, 264 y 612.
55. Straub R.H., Mayer M., Kreutz M., Leeb S., Scholmerich J., Falk W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. Department of Internal Medicine, University Medical Center, Regensburg, Germany.

56. Viera Sturtinová. Ján Jakubovsky. Ivan Hulín. 1995. Inflammation and fever. Pathophysiology principles of diseases (Textbook for medical students).
57. Ward, P.A. 1974. Leukotaxis and leukotactic disorders. *Am. J. Pathol.* 77 : 520 - 538.
58. Wilkinson, P.C., 1977. Techniques in Clinical Immunology. (R.A. Thomson, Ed.) pp. 201 - 219. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K..
59. Wilkinson, 1974, Chemotaxis and inflammation (Churchill, Livingstone; Edinburgh and London, U.K.).
60. Wilson G. B., Smith, C. L., Fundenberg, H. H., 1979, Effects of DLE's with transfer factor activity on leukocyte migration in vitro. 3. Characterization of the antigen-independent migration inhibition factor in DLE's as a neutrophil immobilizing factor. *J Allergy Clin Immunol*, 64(1): 56-66.
61. Wilson G. B., Fundenberg, H. H., Horsmanheimo, M. Effects of DLE's with transfer factor activity on leukocyte migration in vitro. 1. Antigen-dependent inhibition and antigen-independent inhibition and enhancement of migration. *J Allergy Cline. Immunol*, 93(5): 800-18.
62. Zasshi, H. I., 1981, Studies on the mobilities of granulocytes and the chemotactic factor production by human mononuclear cells. *Mar*, 56(2): 217-31.

63. Zigmond, S. H., J. G., Hirsch. 1973. Leucocyte locomotion and chemotaxis. New method for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.* 137:387.

