

# **EFEECTO INMUNOMODULADOR Y ANTI-INFLAMATORIO DE LA PROFILAXIS CON EL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS (EDLP) EN UN MODELO MURINO DE INFLUENZA A.**

---

*Elvia Pérez*

Laboratorio de Biomedicina Molecular,  
ENMyH; Instituto Politécnico Nacional,  
Guillermo Massieu Helguera  
Ciudad de México, México

*Juan Ocampo*

Laboratorio de Histología e Histopatología.  
Área Académica de Medicina Veterinaria  
y Zootecnia, Instituto de Ciencias  
Agropecuarias. Universidad Autónoma del  
Estado de Hidalgo  
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México

*Carlos Cabello*

Laboratorio de Virología, Departamento  
de Investigación en Virología y Micología,  
Instituto Nacional de Enfermedades  
Respiratorias Ismael Cosío Villegas  
Ciudad de México, México

*Pablo Muriel*

Departamento de Farmacología, Centro  
de Investigación y de Estudios Avanzados,  
Instituto Politécnico Nacional  
Ciudad de México, México

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



**María del Consuelo Gómez**

Laboratorio de Biomedicina Molecular,  
ENMyH; Instituto Politécnico Nacional,  
Guillermo Massieu Helguera  
Ciudad de México, México

**Adolfo Pérez**

Farmainmune S. A. de C. V. Naranjos No.  
129, Col. Petrolera, Delegación Azcapotzalco  
Ciudad de México, México

**Salvador Pérez Mora**

Laboratorio de Biomedicina Molecular,  
ENMyH; Instituto Politécnico Nacional,  
Guillermo Massieu Helguera  
Ciudad de México, México

**David G. Pérez Ishiwara**

Laboratorio de Biomedicina Molecular,  
ENMyH; Instituto Politécnico Nacional,  
Guillermo Massieu Helguera  
Ciudad de México, México

**Resumen: Introducción.** La influenza A es una enfermedad infecciosa que ocasiona serios problemas de morbi-mortalidad. La severidad de la infección depende del virus y de la respuesta inmune exacerbada que ocasiona hipercitocinemia e incluso la muerte. Los fármacos antivirales y las vacunas constituyen las opciones terapéuticas para su manejo. Una opción por explorar es el uso de inmunomoduladores con efecto antiinflamatorio como es el Extracto Dializable de Leucocitos porcino (*EDLp*). **Objetivo.** Se determinó si el *EDLp* es capaz de modificar el proceso inmunopatogénico e inflamatorio en influenza A. **Materiales y métodos.** Se infectaron ratones Balb/c con el virus de influenza A, posteriormente se evaluó el *EDLp* y se realizó un análisis clínico, histopatológico (H&E y Tricrómica de Masson) y molecular (colágena, IL-1 $\beta$  e IL-6). **Resultados.** Los animales tratados con el *EDLp* (*EDLp*+AH1N1) mostraron respiración agitada y erizamiento, así como un decremento de la masa pulmonar comparado con el grupo AH1N1. Histopatológicamente, los ratones presentaron menos lesiones edematosas difusas y un decremento del infiltrado linfocitario, con presencia de macrófagos y células plasmáticas. Además, la colágena disminuye en el espacio intersticial alveolar ( $2.975 \pm 0.4150$  vs  $4.541 \pm 0.2016$  mg colágena/tejido pulmonar), así como los niveles de IL-1 $\beta$  ( $6480 \pm 1967$  vs  $0 \pm 0$  pg/mL) e IL-6 ( $12359 \pm 2032$  vs  $848.5 \pm 296$  pg/mL). **Conclusión.** El *EDLp* mejora los signos clínicos, disminuye la neumonitis y la fibrosis pulmonar por la disminución de colágena, además hay disminución de la IL-1 $\beta$  e IL-6, modulando la respuesta inmune exacerbada y la inflamación.

**Palabras clave:** Influenza A, Extracto Dializable de Leucocitos, inflamación, citocinas, neumonitis, fibrosis

## INTRODUCCIÓN

La influenza A es una enfermedad infecciosa y aguda que ocasiona serios problemas de morbi-mortalidad en todo el mundo, incluyendo México (1). Lo anterior se debe a la alta tasa de mutación del virus de la influenza A provocando pandemias como las reportadas en 1918, 1957, 1968, y la más reciente en 2009. Este fenómeno ocurre debido a la alta variabilidad genética, producto de la recombinación de diversos segmentos del genoma entre virus de influenza humanos y virus de influenza de animales, lo que permite la aparición de nuevas cepas de mayor virulencia a las cuales el sistema inmune del ser humano no ha estado expuesto (2,3). Así mismo, la resolución o complicación de la infección dependerá de los factores virales y de la respuesta inmune, la cual está desregulada en casos severos (3). En principio, hay una activación de la respuesta inflamatoria debido a que el sistema inmune de un individuo detecta ciertos patrones moleculares del virus de la influenza A, generando una respuesta inmune innata coordinada que limitan la infección (4), debido a la infiltración de células efectoras como son neutrófilos, macrófagos, células polimorfonucleares y linfocitos T que en condiciones normales resolverán la infección y disminuirán paulatinamente el proceso inflamatorio al secretar interleucinas de respuesta Th1 y Th2, como son IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 e IL-10, para mantener la homeostasis del sistema inmune respiratorio (5). Sin embargo, tras la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B involucrado en el control de la respuesta inmune, la inflamación y la apoptosis, el virus de influenza AH1N1 evade a las células inmunes innatas (5), e incluso utiliza dicho factor de transcripción para generar una replicación viral eficiente (6). Sumado a ello, se siguen reclutando células innatas que son infectadas por el virus de la influenza A, de tal forma que esas mismas células responden

al patógeno y en particular los monocitos y macrófagos secretan grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias como son IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , así como quimiocinas que incluyen la IL-8 y RANTES, lo que ocasiona una hipercitocinemia o “tormenta de citocinas” (4,7,8) que se manifiesta en una inflamación exacerbada y en la necrosis y apoptosis del tejido pulmonar (2,9). Incluso genera un choque séptico del paciente, la disfunción orgánica múltiple (10) e incluso la muerte (2,11). Las terapias existentes para controlar la infección son mediante el uso de antivirales como es el oseltamivir y el zanamivir, las vacunas y el uso de algunos inmunomoduladores (12), tal es el caso del tocilizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de IL-6 (13). En pacientes pediátricos, el tocilizumab mostró la disminución de la inflamación y la duración de los síntomas durante la infección por virus de la influenza (14); sin embargo, en modelos animales se ha observado que el abatimiento total del receptor tiene efectos perjudiciales. Otra opción factible e incluso propuesta para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas es el uso de un inmunomodulador proveniente de un extracto dializable de leucocitos (*EDL*) que contiene moléculas bioactivas menores a 10 KDa (15). Recientemente, se ha investigado la actividad anti-inflamatoria en un modelo *in vivo* de osteoartritis (16), en prostatitis autoinmune (17) y en pacientes con cervicitis (18). Sumado a ello, existen reportes donde sugieren que el inmunomodulador es efectivo en varias enfermedades infecciosas causadas por virus, parásitos, hongos y micobacterias (15,19). A pesar de que hay una alta incidencia en pacientes infectados con virus de influenza A con un sistema inmunológico desregulado, como son los niños, los adultos mayores y los pacientes inmunosuprimidos con virus de VIH; no se han realizado estudios para

evaluar el efecto inmunomodulador del *EDLp* en modelos experimentales *in vivo* y/o en pacientes con influenza A. El objetivo de este trabajo fue determinar si la administración profiláctica con el *EDLp* modifica los signos clínicos y el proceso inmunopatogénico por la disminución de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y la fibrosis pulmonar ocasionada por la infección con el virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MODELO MURINO DE INFLUENZA A.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/C libres de patógenos, de 4 a 6 semanas de edad, con una masa corporal de 18 a 23 g. En principio, se llevó a cabo la adaptación del virus AH1N1 pandémico 2009 humano a ratones Balb/c, se procedió a realizar la producción viral en la línea celular MDCK, como lo reportado por Pérez-Soto y colaboradores en el 2014 (20). Los animales tuvieron acceso libre al alimento (purina-

chow dieta estándar; Purina, E. U.A) y agua, así como sujetos a ciclos de luz y oscuridad de 12 h, recibiendo trato humanitario con base en el criterio de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Institutes of Health Publ. 86-23, rev. 1985), también de acuerdo con los lineamientos y la Norma Oficial Mexicana NOM\_062-ZOO-1999.

### ADMINISTRACIÓN PROFILÁCTICA CON EL EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS (*DLE<sub>p</sub>*)

Los ratones Balb/c fueron separados de manera aleatoria en 3 grupos experimentales ( $V_{AH1N1}+V_{EDLp}$ , AH1N1 y  $EDLp+AH1N1$ ), cada uno con 5 ratones. Se administró como profilaxis el *EDLp* a una dosis de 230  $\mu$ g/kg/día por 7 días antes de la infección, como se muestra en la figura 1. Al día cero se realizó la infección de los ratones de cada grupo a una dosis de 16 UHE que corresponden a  $3.2 \times 10^6$  partículas virales infectivas del virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado previamente a

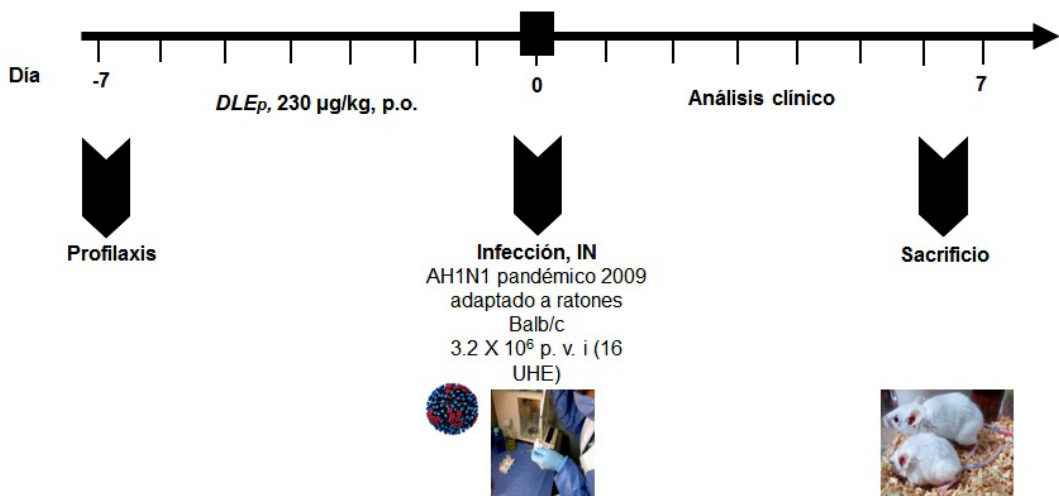


Figura 1. Esquema del tratamiento profiláctico del Extracto Dializable de Leucocitos (*EDL<sub>p</sub>*) en el modelo *in vivo* de influenza AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c. Administración profiláctica del *EDL<sub>p</sub>* durante 7 días a una dosis de 230  $\mu$ g/kg, p.o., o simulación de la infección viral. Se llevó a cabo el análisis clínico con la escala modificada de Menéndez y colaboradores en el 2005, durante 6 días, finalmente, al día 7 se llevó a cabo el sacrificio de los ratones (n=5) de cada grupo experimental para llevar a cabo el análisis.

ratones Balb/C como lo reportado por Pérez y colaboradores en el 2014 (20). Posteriormente, se llevó a cabo el análisis clínico durante 6 días con la escala de signos clínicos modificada por nuestro equipo de investigación (21). Finalmente, al día 7 se sacrificaron los animales para la obtención de muestras y llevar a cabo el análisis histopatológico.

## ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO EN PULMÓN

Se colectaron muestras de pulmón para evaluar los cambios morfológicos ocasionados por el virus de influenza AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c y evaluar el efecto del  $EDL_p$  mediante las tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E) (22). Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Histología e Histopatología del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Instituto de Ciencias Agropecuarias (UAEH).

## CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENA EN PULMÓN (HP)

Se llevó a cabo la cuantificación indirecta de la colágena por hidroxiprolina (HP), para determinar la fibrosis pulmonar, como lo reportado por Hernández-Aquino y colaboradores en el 2017, sufriendo modificaciones en los últimos pasos. Se colocaron muestras de pulmón fresco (100 mg) en ampollitas, se añadieron 2 mL de HCl 6 N y luego las muestras se sellaron y se hidrolizaron a 100 ° C durante 48 h. A continuación, las muestras se evaporaron a 50 °C durante 24 h y se resuspendieron en 3 mL de tampón cítrico de acetato de sodio, pH 6.0; se añadieron 0,5 g de carbón activado, la mezcla se agitó vigorosamente y luego se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Luego, se agregó 1 mL de cloramina T a 1 mL del sobrenadante. La mezcla se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente,

y la reacción se detuvo mediante la adición de 0,5 mL de tiosulfato de sodio 2 M y 1 mL de hidróxido de sodio 1N. La capa acuosa se transfirió a tubos de ensayo. El producto de oxidación de HP se convirtió en un pirrol por ebullición de las muestras. Una vez fríos los tubos, se procedió a extraer el pirrol con tolueno y se agitó durante 1 minuto. Para la optimización del reactivo Ehrlich, se realizó una modificación a las proporciones de la fase de tolueno y al final la lectura fue en placas de 96 pozos, en comparación con lo reportado anteriormente (23). De la fase de tolueno, se incubaron 250  $\mu$ L de las muestras que contenían el pirrol y 1 mL del reactivo de Ehrlich. Finalmente, se agregaron 200  $\mu$ L de cada muestra por triplicado en una placa de 96 pozos (Corning, 9018) y se leyó a 560 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek) en el laboratorio de Biomedicina Molecular I, de la ENMyH-IPN. La recuperación de las concentraciones de la curva estándar de cis-4-OH L-prolina (Sigma H-1637), se llevó a cabo de manera similar a la cuantificación en muestras de pulmón, al igual que la lectura en placas de 96 pozos en el espectrofotómetro.

## DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

En el Lavado Broncoalveolar (LBA) se determinaron citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  e IL-6), por el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima o ELISA, (por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), tipo sándwich. La técnica que se siguió fue la descrita por el proveedor Peprotech. Para cada molécula se realizó una curva estándar, para calcular la concentración de las muestras problema de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) se correlacionó con la curva estándar. Cada placa fue leída en un espectrofotómetro de



microplacas (Epoch, BioTek), a una longitud de onda de 650 nm. Una vez obtenidos los datos, se realizó una regresión lineal con los datos de la curva estándar para cada de las citocinas, posteriormente se extrapolaron los datos obtenidos de cada grupo experimental del modelo de influenza A y evaluación del EDL<sub>p</sub>.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas estadísticas aplicadas a los datos de cada grupo experimental del modelo de influenza A inducido con el virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a murino y administradas con el Extracto Dializable de Leucocitos (EDL<sub>p</sub>), fue el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para la comparación de todos los grupos contra todos, se empleó el método de Tukey; esta prueba proporciona la diferencia estadísticamente significativa con una  $P < 0.05$ . La prueba se corrió en el paquete estadístico Graph Pad Prism.

## RESULTADOS

### EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PROFILÁCTICA DEL DLEP SOBRE LOS SIGNOS CLÍNICOS Y LA MORFOLOGÍA Y FIBROSIS PULMONAR

En nuestro modelo *in vivo* de influenza A, se utilizó la cepa viral AH1N1 pandémica 2009 adaptada a ratones de la cepa Balb/C (20), para evaluar el efecto de la administración profiláctica del Extracto Dializado de Leucocitos proveniente de los porcinos (EDL<sub>p</sub>), y se realizó un análisis clínico mediante la escala modificada de signos clínicos de Menéndez y colaboradores en el 2005, además se cuantificó el porcentaje de masa corporal y masa pulmonar de los animales.

Los ratones del grupo control experimental (VAH1N1+VEDL<sub>p</sub>), no presentaron signos clínicos referentes a la infección viral siendo

ratones sanos, con un puntaje 1 (Figura 2A), con masa corporal y masa pulmonar normal de 22 g que corresponde al 100 % y  $236.2 \pm 8.87$  mg, respectivamente (Figura 3A y 3B). Al realizar el examen microscópico de las muestras de pulmón de ratones Balb/c de los grupos experimentales, mediante tinción H&E y tricrómica de Masson; de manera general, en el grupo control  $V_{AH1N1} + V_{EDLp}$  se observó la morfología pulmonar normal, alveolos y sacos alveolares conservados, al igual que las paredes delgadas en bronquios y vasos (Figura 4 A, B), con presencia de colágena en la matriz extracelular, la cual es escasa (Figura 4 C, D). Sin embargo, en el grupo infectado con el virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado al modelo murino (AH1N1), el 100 % de los animales presentaron manifestación clínica severa (puntaje 5), es decir paso o marcha anormal, reducción de la movilidad, respiración forzada, cianosis de la cola y las orejas durante los últimos 2 días (día 6 y día 7 post-infección), como se muestra en la figura 2B. Conjuntamente, el grupo experimental infectado (AH1N1) tuvo una disminución significativa de la masa corporal de 25.08 % ( $p, \leq 0.05$ ) respecto al control ( $V_{AH1N1} + V_{EDLp}$ ), es decir, los animales presentaron un 74.92 % de masa corporal que representa un promedio de 16.48 g en animales infectados al último día antes del sacrificio; en cuanto al tamaño y masa pulmonar, hubo un incremento significativo, presentando valores de  $350.3 \pm 10.16$  mg, siendo de tamaño más prominente, edematoso y de color rojo pardo. Histopatológicamente, en el grupo infectado con el virus influenza AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c (AH1N1), se observó una extensa infiltración de linfocitos y neutrófilos o PMN asociados a la adventicia del vaso sanguíneo, así como engrosamiento del endotelio en el parénquima pulmonar, hiperemia pulmonar y hemorragia intrabronquial y peribronquial (Figura 4 E, F).

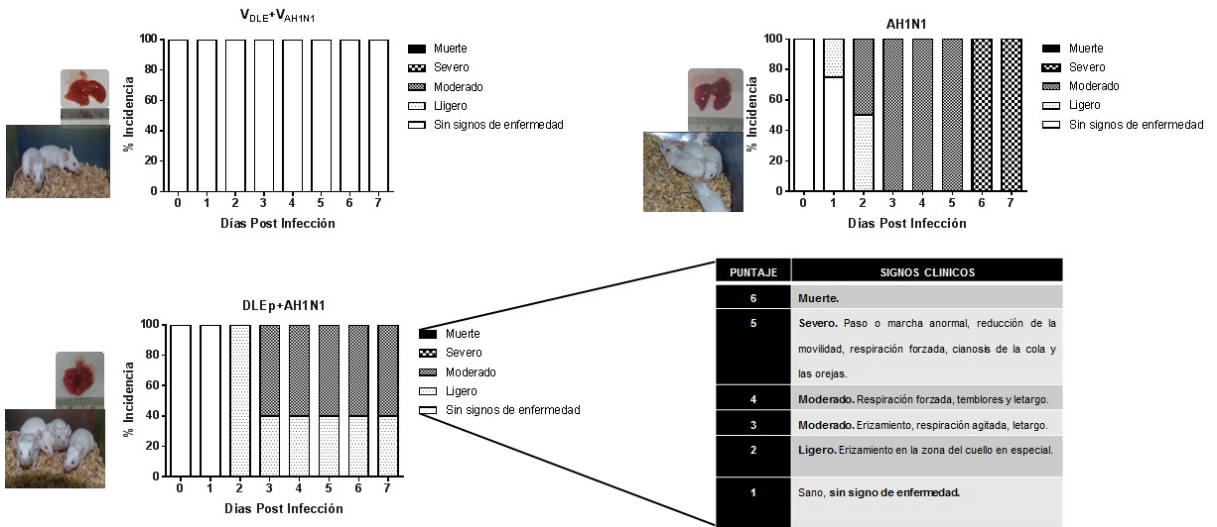


Figura 2. Evaluación profiláctica del EDL<sub>p</sub> sobre la masa corporal y pulmonar de los grupos experimentales sometidos en el modelo *in vivo* de influenza AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c. A) Masa pulmonar de los grupos experimentales, grupo control V<sub>AH1N1</sub>+V<sub>EDL<sub>p</sub></sub>, grupo control infectado con 3.2 x 10<sup>6</sup> p.v.i. de la cepa AH1N1 pandémica 2009 (AH1N1) y grupo tratado profilácticamente con el Extracto Dializable de Leucocitos (EDL<sub>p</sub>) e infectados con 3.2 x 10<sup>6</sup> p.v.i. de virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratón Balb/C (EDL<sub>p</sub>+AH1N1), durante 7 días. B) Masa pulmonar de los grupos experimentales sometidos a la infección viral y tratamiento profiláctico. Cada barra representa el valor promedio de experimentos desarrollados por duplicado con muestras de 5 ratones ± error estándar. a) Diferente vs. Grupo control V<sub>AH1N1</sub>+V<sub>EDL<sub>p</sub></sub>. b) Diferente vs. Grupo control dañado (AH1N1). p< 0.05, ANOVA, prueba de Tukey.

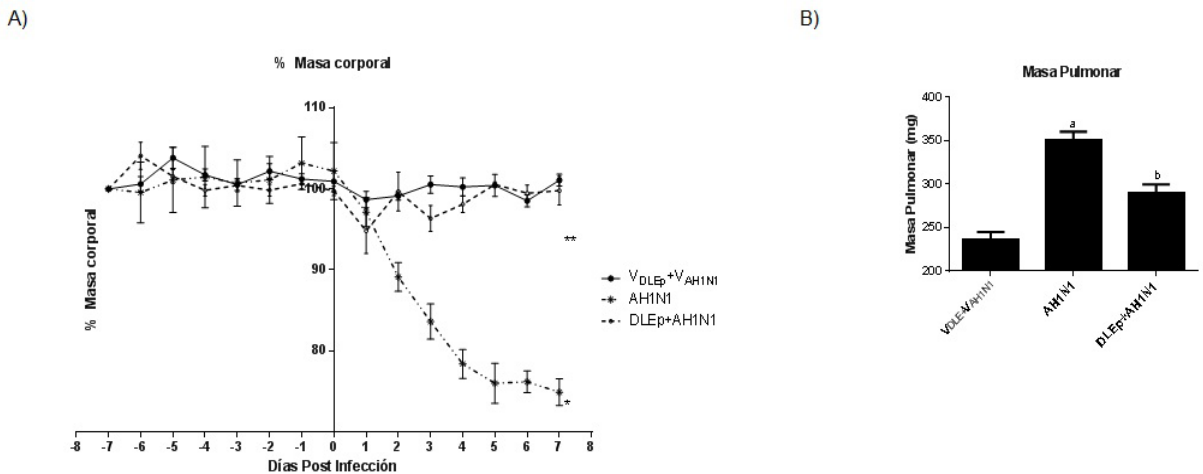


Figura 3. Evaluación del EDL<sub>p</sub> sobre la manifestación clínica de los grupos experimentales sometidos a la infección del virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c. A) Signos clínicos del grupo control V<sub>AH1N1</sub>+V<sub>EDL<sub>p</sub></sub>. B) Signos clínicos del grupo control infectado con 3.2 x 10<sup>6</sup> p.v.i. de la cepa AH1N1 pandémica 2009 adaptada a ratón Balb/c. C) Signos clínicos del grupo tratado profilácticamente con el Extracto Dializable de Leucocitos (EDL<sub>p</sub>) e infectados con 3.2 x 10<sup>6</sup> p.v.i. de virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratón Balb/C, EDL<sub>p</sub>+AH1N1, durante 7 días. Cada barra representa el porcentaje de incidencia de los signos clínicos observados después de la infección viral. n=5 animales.

De igual manera, se observó una distribución de la colágena diferente con respecto al grupo control sin infección ( $V_{AH1N1} + V_{EDLP}$ ), manifestándose no solamente alrededor de los vasos sanguíneos y los bronquiolos, sino también en los espacios intersticiales alveolares sumado a hiperplasia y metaplasia (Figura 4 H y K). El daño de la superficie observada se estima en un 70%.

En nuestro trabajo, al administrar el tratamiento con el *EDLP* a animales infectados con el virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a murino (*EDLP*+AH1N1), se observó una disminución en las manifestaciones clínicas en comparación con el grupo infectado (AH1N1) (Figura 2B VS 2C). El 60 % de los animales tuvieron una manifestación clínica moderada y el resto tuvieron una manifestación clínica ligera durante los últimos 5 días (Figura 2C), además presentaron una masa corporal similar al control ( $V_{AH1N1} + V_{EDLP}$ ) (99.8 % vs 100 %), y hubo un decremento significativo de la masa pulmonar de los animales tratados profilácticamente con el *EDLP* ( $350.3 \pm 10.16$  mg VS  $289.6 \pm 10.19$  mg), con menos lesiones edematosas difusas y no se observaron zonas con daño severo (Figura 4 I, J); a pesar de la presencia de infiltrado linfocitario, éste es menor en comparación al grupo infectado sin tratamiento (AH1N1), hay presencia de macrófagos y células plasmáticas, en general se estima un daño menor al 35% de la superficie pulmonar total. De igual manera, la presencia de la colágena es menor en el espacio intersticial alveolar (Figura 4 K y l), por lo que evita el desarrollo de un proceso fibrótico secundario, el cual generalmente se deriva de la inflamación severa inducida por el virus pandémico AH1N1 2009, disminuyendo la inflamación crónica y conservando en mayor grado la arquitectura del parénquima pulmonar.

## EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PROFILÁCTICA DEL *EDLP* SOBRE LA HP, MARCADOR DE FIBROSIS PULMONAR

Para corroborar los resultados obtenidos de fibrosis pulmonar, se cuantificó indirectamente la colágena (HP), encontrándose en el grupo profiláctico (*EDLP*+AH1N1) una disminución significativa con respecto al grupo infectado (AH1N1), obteniendo valores de  $2.975 \pm 0.4150$  vs  $4.541 \pm 0.2016$  mg colágena/tejido pulmonar, respectivamente, por lo que el tratamiento profiláctico mantiene valores semejantes estadísticamente al grupo control ( $V_{AH1N1} + V_{EDLP}$ ), cuantificando  $3.44 \pm 0.387$  mg/g tejido pulmonar (Figura 5 A).

## ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PROFILÁCTICA DEL *EDLP* SOBRE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS: IL-1B E IL-6

En principio, ambas citocinas no se detectaron en el grupo control sin infección ( $V_{AH1N1} + V_{EDLP}$ ), no obstante, en el grupo infectado (AH1N1), vemos que ambas citocinas incrementan considerablemente en el LAB, como se muestra en la figura 5B y 5C. De manera notoria, observamos que, al administrar el *EDLP*, la concentración de citocinas proinflamatorias disminuye preponderantemente en comparación con el grupo infectado y sin tratamiento (AH1N1), tanto de IL-1 $\beta$  ( $6480 \pm 1967$  vs  $0$  pg/mL), como de IL-6 ( $12359 \pm 2032$  vs  $848.5 \pm 296$  pg/mL).

## DISCUSIÓN

La influenza A es una enfermedad pandémica emergente que causa inflamación aguda en las vías respiratorias bajas en humanos. Los síntomas son fiebre, dolor de cabeza y fatiga, que mejoran después de varios días; sin embargo, el virus de influenza A tiene la capacidad de provocar una respuesta inmune



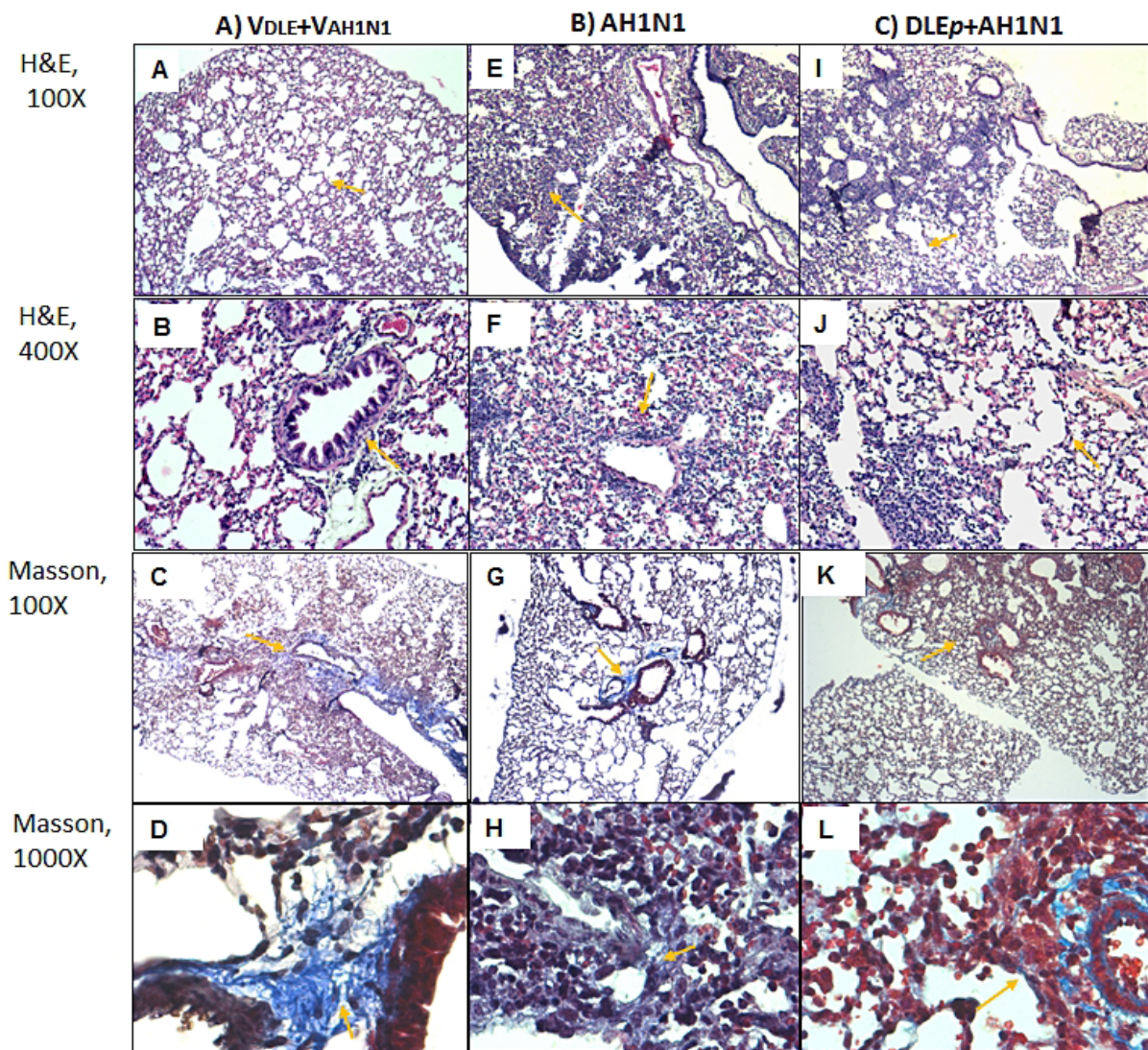


Figura 4. Análisis del EDLp sobre los cambios histopatológicos mediante la técnica de H&E y Tricrómica de Masson de los grupos experimentales sometidos a la infección del virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c. A-D) Grupo control sin infectar,  $V_{AH1N1} + V_{EDLP}$ , E-H) Grupo infectado con 16 UHE ó  $3.2 \times 10^6$  p.v.i. del virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a murino, AH1N1. I-L) Grupo tratado profilácticamente con el Extracto Dializable de Leucocitos (EDLp) e infectados con  $3.2 \times 10^6$  p.v.i. de virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratón Balb/C, EDLp+AH1N1. Las flechas indican la morfología pulmonar en cada grupo experimental (n=5 animales).

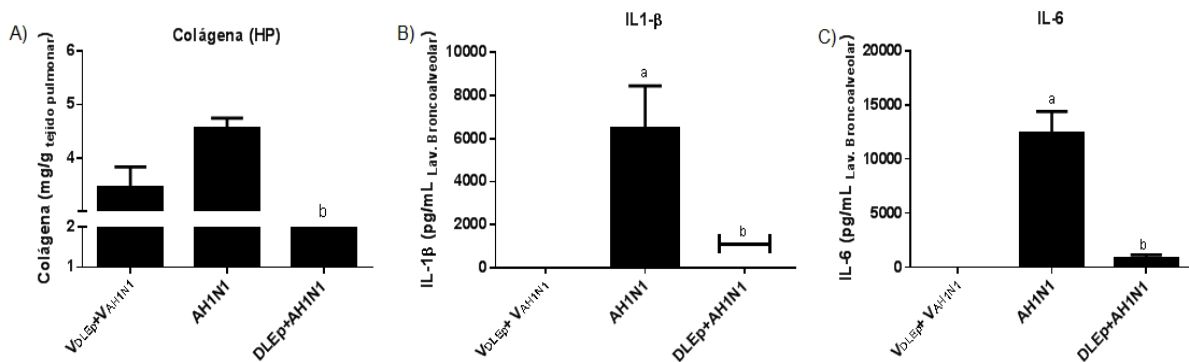


Figura 5. Análisis del EDLp sobre la colágena pulmonar (HP) y las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  e IL-6) en los grupos experimentales sometidos a la infección del virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c. A) Colágena pulmonar. B) Concentración proteica de IL-1 $\beta$  en lavado broncoalveolar (LAB). C) Concentración proteica de IL-6 en LAB. Se representa el valor promedio por duplicado con muestras de 5 animales  $\pm$  error estándar. a) Diferente vs. Grupo control VAH1N1+VEDLp. b) Diferente vs. Grupo control infectado, AH1N1.  $P < 0.05$ , ANOVA, prueba de Tukey.

exacerbada que conlleva a un deterioro de la salud e incluso provoca la muerte del paciente, y en algunas ocasiones causan las pandemias, por ejemplo la de 1918, 1957, 1968 y la más reciente en 2009 (3), por lo que es necesario el establecimiento de políticas de salud pública para el control de la diseminación de la infección (11), así como el desarrollo de alternativas terapéuticas novedosas que ayuden a contrarrestar los signos clínicos, la neumonitis, la fibrosis pulmonar y el proceso inflamatorio exacerbado; particularmente importante es el desarrollo de fármacos que modulen y/o disminuyan la respuesta inmune del hospedero puede servir para identificar terapias complementarias para el tratamiento de casos severos provocados por virus de la influenza A (3, 12); siendo una opción el Extracto Dializable de Leucocitos o EDL, constituido por moléculas menores a 10 kDa que modulan la respuesta inmune de un organismo (24, 25). Existen varios tipos de EDL's que se obtienen de pollo, cocodrilo, bovinos y humano (25-28). En nuestro modelo *in vivo* de influenza A, se utilizó la cepa viral AH1N1 pandémica 2009 adaptada a ratones de la cepa Balb/C (20), para evaluar

el efecto de la administración profiláctica del EDL porcino, y se realizó un análisis clínico mediante la escala modificada de signos clínicos de Menéndez y colaboradores en el 2005, además de cuantificar el porcentaje de masa corporal y masa pulmonar de los animales; a nivel estructural se caracterizó histopatológicamente su efecto mediante la tinción por H&E y para evaluar el proceso de fibrosis pulmonar se evaluó histopatológicamente y bioquímicamente mediante la cuantificación de colágena (HP).

En principio, se aseguró la infección con el virus AH1N1 pandémico 2009 previamente adaptado a ratones Balb/c mediante pases virales y como es sabido, la cepa viral inicial sufrió de la deriva antigénica provocando mutaciones en genes de la HA y el complejo RNP (29), repercutiendo en el grado de patogenicidad y virulencia en los ratones Balb/c infectados (AH1N1), lo que se pudo confirmar con los signos clínicos y características patoneumónicas de la enfermedad, como lo reportado por diversos autores (20, 21, 30, 31). Por otro lado, se corroboró la infiltración de células inflamatorias como son PMN, macrófagos que secretan citocinas pro-

inflamatorias y que exacerban el proceso viral, provocando la inflamación crónica observada en pacientes infectados con la cepa viral AH1N1 pandémica 2009 (31-33), también hay un reclutamiento masivo de células T que conduce a una inmunopatología severa e incluso la muerte (34). El daño pulmonar se estima en un 70 %, semeja un Daño Alveolar Difuso (DAD) en ratones Balb/C (32), siendo similar a lo observado en casos clínicos severos en pacientes infectados con la misma cepa viral que provocó el Síndrome de Distres Respiratorio agudo (ARDS) y el DAD, ya que se presenta la formación de membrana hialina que recubre los alveolos y conductos alveolares, la acumulación de células inflamatorias en el pulmón y edema, causando muerte en el paciente (35-37). Además, se pudo corroborar que, con la dosis de 16 UHE que corresponden a 3.2 millones de p.v.i., se provocó fibrosis pulmonar (38, 39). Finalmente, se confirmó la participación de las citocinas pro-inflamatorias, como es la IL-1 $\beta$ , IL-6, como lo reportado anteriormente (39, 40), así como la secreción de TNF- $\alpha$  y MCP-1.

El *EDLp*, es un inmunomodulador, constituido por péptidos de bajo peso molecular, que tienen la capacidad de transferir una respuesta inmune celular al organismo receptor, por ello se ha utilizado para el tratamiento de algunas infecciones bacterianas, micóticas y virales (41, 42), así como las inmunodeficiencias, algunas neoplasias, alergias y también algunas enfermedades autoinmunes y degenerativas como es la osteoartritis, en donde involucran procesos de inflamación y apoptosis provocadas por citocinas pro-inflamatorias (16-19, 41, 42). En relación al tratamiento de infecciones virales, específicamente la influenza A, Li y colaboradores en el 2010, desarrollaron un factor de transferencia específico en contra de virus de influenza

A, al transferir la inmunidad específica a un receptor sano (43). Si bien, varias observaciones sugieren el uso del *EDL* para la prevención de infecciones respiratorias incluyendo el virus de influenza A (15), esta transferencia inmune ha sido pobremente estudiada. En nuestro trabajo, al administrar el tratamiento con el *EDLp* a animales infectados (*EDLp*+AH1N1), se observó una disminución en las manifestaciones clínicas, así como una disminución en el infiltrado linfocitario, como son linfocitos T CD<sup>8</sup> y macrófagos, relacionándose con la disminución del perfil pro-inflamatorio. De manera interesante, se sabe que el *EDL* puede inducir la respuesta inmune, *per se* activa la inmunidad innata y celular, estimulando la migración de subpoblaciones de células T específicas y consecuentemente estimula la liberación de citocinas como es IFN- $\gamma$  que modula el proceso patogénico viral, tal como se observó en pacientes con herpes zoster y con VIH, independientemente, habiendo un aumento en las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (44, 45). Es importante recalcar que al ser un *EDL porcino*, la transferencia de péptidos inmunomoduladores es específica y controla la inflamación por la disminución de células inflamatorias que probablemente genera una respuesta inmunológica innata y celular particular, con la finalidad de erradicar la infección causada por el virus AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c, el cual inicialmente provino de humanos y porcinos (46).

Por otro lado, Shirey y colaboradores en el 2013, demostraron que un inmunomodulador denominado eritoran, inhibe al receptor de tipo toll like tipo 4 (TLR-4) involucrado en la inflamación y respuesta innata; así el eritoran fue administrado vía intravenosa (200  $\mu$ g/día/ratón), durante 5 días después de la infección, observando que el fármaco protege a los ratones de la infección con virus



de influenza A, controlando la inflamación y disminuyendo la letalidad y los síntomas clínicos, mejorando la morfología pulmonar, además de que disminuye la citocina proinflamatoria IL-6 y aumenta la citocina antiinflamatoria IL-10 (47).

Muy probablemente el *EDLp* protege del daño pulmonar provocado por el virus de influenza AH1N1 pandémico 2009 adaptado a murino, debido a la estimulación de ciertas subpoblaciones de linfocitos T que liberan citocinas anti-inflamatorias y por la disminución del reclutamiento masivo de células innatas, modulando citocinas pro-inflamatorias como es la IL-1 $\beta$  e IL-6 y disminuyendo la fibrosis pulmonar. De tal forma que el proceso inmunopatogénico causado por el virus de influenza AH1N1 pandémico 2009 adaptado a ratones Balb/c se resuelve, observándolo clínicamente en el mantenimiento de la masa corporal y pulmonar, así como en la manifestación clínica ligera constituida por el erizamiento en la zona del cuello.

La administración profiláctica con el *EDLp* evita la disminución de la masa corporal y la masa pulmonar y mejora los signos clínicos de la infección viral. El *EDLp* conserva la morfología pulmonar y hay una disminución del infiltrado linfocitario, macrófagos y células polimorfonucleares, disminuye la neumonitis intersticial y la fibrosis pulmonar, resolviendo así el proceso inmunopatogénico. Los resultados presentados aquí, nos permite proponer su uso como una terapia coadyuvante para las terapias antivirales o vacunales con la finalidad de controlar o disminuir la reacción inmunológica exagerada y mal dirigida. La inmunidad pasiva transmitida de madre a cerdos neonatos, así como el uso de vacunas son insuficientes para prevenir la transmisión del virus de influenza A en cerdos (48, 49).

Además, dichos hallazgos son importantes en la medicina preventiva y curativa humana,

así como para la medicina veterinaria (ganado porcino y equino), ya que las variantes virales se pueden transmitir entre las especies, es decir, se han reportado infecciones humanas con virus de influenza aviar o porcina y está última de gran preocupación por la pandemia inminente.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Farmainmune S. A. de C. V., por la donación del *EDL* para el desarrollo de la investigación y a la estudiante Cecilia Cortés por la participación en el trabajo experimental.

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS**

En este trabajo no existe conflicto de interés.

## **FINANCIAMIENTO**

Proyecto de investigación SIP multidisciplinario: SIP20160201. Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN.

## REFERENCIAS

1. INEGI. 2016. Estadísticas de Mortalidad. Fecha de actualización: jueves 26 de mayo de 2016 [online] <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/sitemap.xml>. [Fecha de revisión 15 noviembre 2016].
2. **Teijaro JR.** The Role of Cytokine Responses During Influenza Virus Pathogenesis and Potential Therapeutic Options. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;386:3-22. [https://doi:10.1007/82\\_2014\\_411](https://doi:10.1007/82_2014_411).
3. **Fukuyama S y Kawaoka Y.** The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol.* 2011;23:481-6. <https://doi:10.1016/j.coi.2011.07.016>
4. **Coates BM, Staricha KL, Wiese KM, Ridge KM.** Influenza A Virus Infection, Innate Immunity, and Childhood. *JAMA Pediatr.* 2015;169:956-963.
5. **Sarawar SR, Doherty PC.** Concurrent production of interleukin-2, interleukin-10, and gamma interferon in the regional lymph nodes of mice with influenza pneumonia. *J Virol.* 1994;68:3112-3119.
6. **Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, Hobom G, Riedel A, Schlee M et al.** Active NF- $\kappa$ B signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *J Gen Virol.* 2004;85: 2347-2356. <https://doi:10.1099/vir.0.79958-0>
7. **Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melén K, Matikainen S.** Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:171-80.
8. **Chiou WF, Chen CC & Wei BL.** 8-Prenylkaempferol Suppresses Influenza A Virus-Induced RANTES Production in A549 Cells via Blocking PI3K-Mediated Transcriptional Activation of NF- $\kappa$ B and IRF3. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;920828. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep066>.
9. **Collado VM, Porras R, Cutuli MA, Gómez-Lucía E.** The innate immune system I: its mechanisms. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 2008;2:1-16.
10. **Carrillo-Esper R, Carrillo-Córdova CA, Carrillo-Córdova LD, Carrillo-Córdova JR.** Choque séptico y disfunción orgánica múltiple secundaria a infección por virus de influenza humana AH1N1. *Med Int Mex.* 2010;26:501-507. <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=28377>
11. **Chowell G, Echevarría-Zuno S, Viboud C, Simonsen L, Tamerius J, Miller MA, et al.** Characterizing the Epidemiology of the 2009 Influenza A/H1N1 Pandemic in Mexico. *PLoS Med.* 2011;8(5): e1000436. <https://doi:10.1371/journal.pmed.1000436>.
12. **Yuan S.** Drugs to cure avian influenza infection-multiple ways to prevent cell death. *Cell Death Dis.* 2013;4: e835. <https://doi:10.1038/cddis.2013.367>.
13. **Mori S, Ueki Y, Hirakata N, Oribe M, Hidaka T, Oishi K.** Impact of tocilizumab therapy on antibody response to influenza vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;12:2006-10. <https://doi:10.1136/annrheumdis-2012-201950>.
14. **Kawada J, Kitagawa Y, Iwata N, Ito Y.** Clinical characteristics of influenza virus infection in juvenile idiopathic arthritis patients treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol.* 2013;23:972-976. <https://doi:10.1007/s10165-012-0780-0>.
15. **Viza D, Fudenberg HH, Palareti A, Ablashi D, De Vinci C, Pizza G.** Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia Biol. (Praha).* 2013;59: 53-67.
16. **Acosta P, Pérez N., Pérez E., Correa B., Pérez C., Gómez C., et al.** Anti-inflammatory effect of dialysable leucocyte extract in a rat model of osteoarthritis: histopathological and molecular characterization. *Scand J Rheumatol.* 2016;45:528-535. <https://doi:10.3109/03009742.2016.1153140>
17. **Pérez-Alvarado C, Gómez C, Reyes M, García M, Pérez E, Pérez de la Mora C, et al.** 2017. Anti-Inflammatory Effect of Dialyzable Leukocyte Extract in Autoimmune Prostatitis: Evaluation in Animal Model. *BioMed Res Int.* 2017;1832853. <https://doi:10.1155/2017/1832853>.
18. **Acosta-Ríos MP, Sauer-Ramírez E, Castro-Muñoz LJ, García-Solís M, Gómez-García C, Ocadiz-Delgado R, et al.** Effect of Dialyzable Leukocyte Extract on chronic cervicitis in patients with HPV infection. *J Med Life.* 2017; 10:237-243.



19. **Atanas A, Zhivka K.** Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015;29: 1017-1023. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1060136>
20. **Pérez Soto E, García-Solís M, Gómez-García MC, Cabello-Gutiérrez C, Pérez De La Mora CA, Correa-Meza BE et. al.** Histopathological And Clinical Analysis Of Balb/C Mice Infected With Mouse-Adapted Pandemic Influenza A/H1N1 Virus Using Different Viral Doses. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*.2014;4: 75-81.
21. **Menéndez A, Peña B y Hernández E.** Aspectos Clínicos y Viroológicos útiles en la Implementación de un Modelo de Influenza A en líneas de ratones *Balb/C*. *Acta Farm. Bonaerense*. 2005;24: 395-401. [http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/3/LAJOP\\_24\\_3\\_2\\_1\\_HTJ8K7XC7T.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/3/LAJOP_24_3_2_1_HTJ8K7XC7T.pdf)
22. **Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, Heffess CS, Mullick FG.** Manual de Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington, D.C. 1995;151-73. <https://www.scienceopen.com/document?vid=dd2dff8d-f160-4883-a1bd-3a5d090e756f>
23. **Hernández-Aquino E, Zarco N, Casas-Grajales S, Ramos-Tovar E, Flores-Beltrán RE, Arauz J, Shibayama M, Favari L, Tsutsumi V, Segovia J, Muriel P.** Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGFβ-Smad3 and JNK-Smad3 pathways. *World J Gastroenterol*.2017;23:4354-4368. <https://doi: 10.3748/wjg.v23.i24.4354>.
24. **Hernández-Aquino E, Zarco N, Casas-Grajales S, Ramos-Tovar E, Flores-Beltrán RE, Arauz J, Shibayama M, Favari L, Tsutsumi V, Segovia J, Muriel P.** Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGFβ-Smad3 and JNK-Smad3 pathways. *World J Gastroenterol*.2017;23:4354-4368. <https://doi: 10.3748/wjg.v23.i24.4354>.
25. **Kirkpatrick CH.** Structural nature and functions of transfer factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;685:362-8, 23. <http://>
26. **Kirkpatrick CH.** Activities and characteristics of transfer factors. *Biotherapy*. 1996;9:3-16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8993752>
27. **Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Castillo-Tello P, García de la Fuente et. al.** IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*. 2008;10:490-6. <http://doi.org/10.1080/14653240802165681>
28. **Medina-Rivero E, Merchand-Reyes G, Pavón L, Vázquez-Leyva S, Pérez-Sánchez G, Salinas-Jazmín N et. al.** Batch-to-batch reproducibility of Transferon™. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;88:289-94.
29. **Merchant ME, Leger N, Jerkins E, Mills K, Pallansch MB, Paulman RL et. al.** Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;110- 221-228. <https:// DOI:10.1016/j.vetimm.2005.10.001>.
30. **Ilyushina NA, Khalenkov AM, Seiler JP, Forrest HL, Bovin NV, Marjuki H et. al.** Adaptation of pandemic H1N1 influenza viruses in mice. *J Virol*. 2010;84:8607-16. <https:// DOI:10.1128/JVI.00159-10>
31. **Arimori Y, Nakamura R, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Kase T, et. al.** Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice. *Antiviral Res*. 2013;99:230-7. <https://DOI:10.1016/j.antiviral.2013.05.007>
32. **Fukushi M, Ito T, Oka T, Kitazawa T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. et. al.** Serial histopathological examination of the lungs of mice infected with influenza A virus PR8 strain. *PLoS One*. 2011;6:e21207. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0021207>
33. **Zhang Y, Sun H, Fan L, Ma Y, Sun Y, Pu J et. al.** Acute respiratory distress syndrome induced by a swine 2009 H1N1 variant in mice. *PLoS One*. 2012;7:e29347. <http://DOI:10.1371/journal.pone.0029347>
34. **La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, y Doherty PC.** A question of self-preservation:immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2007;85:85-92.
35. **Nin N, Sánchez-Rodríguez C, Ver LS, Cardinal A, Ferruelo A, Soto L, et. al.** Lung histopathological findings in fatal pandemic influenza A (H1N1). *Med Intensiva*. 2012.<https://DOI:10.1016/j.medine.2012.03.001>

36. Pecavar B, Nadrah K, Papst L, Cec V, Kotar T, Maticic M, et. al. Clinical characteristics of adult patients with influenza-like illness hospitalized in general ward during Influenza A H1N1 pandemic 2009/2010. *Wien Klin Wochenschr.* 2011;123:662-7. <https://DOI:10.1007/s00508-011-0054-4>
37. Zhang Y, Sun H, Fan L, Ma Y, Sun Y, Pu J et. al. Acute respiratory distress syndrome induced by a swine 2009 H1N1 variant in mice. *PLoS One.* 2012:e29347. <https://DOI:10.1371/journal.pone.0029347>
38. Aldridge JR, Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C, et. al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:5306–5311. <http://doi.org/10.1073/pnas.0900655106>
39. Sun J, Madan R, Karp CL, & Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med.* 2009;15:277–284. <http://doi.org/10.1038/nm.1929>
40. Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melén K, Matikainen S. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 2001;12:171-80. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610100000265?via%3Dihub>
41. Estrada S, Cabezas R, Padierna L, Fernandez C. 1990. Inmunoterapia con factor de transferencia en pacientes con herpes zoster. *Biotechnologia Aplicada.* 7;1,52-57.
42. Viza D, Fudenberg HH, Palareti A, Ablashi D, De Vinci C, Pizza G. Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia Biol (Praha).* 2013;59(2):53-67. <http://fb.cuni.cz/volume-59-2013-no-2#articFB2013A0007>
43. Li C, Huang L, Wang Y, Li X, Liang S & Zheng Y. Preparation and properties of the specific anti-influenza virus transfer factor. *Head & Face Med.* 2010;13:6-22. <http://doi.org/10.1186/1746-160X-6-22>
44. Pizza G, De Vinci C, Fornarola V, Palareti A, Baricordi O, Viza D. In vitro studies during long-term oral administration of specific transfer factor. *Biotherapy.* 1996;9:175-85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=.+In+vitro+studies+during+long-term+oral+administration+of+specific+transfer+factor>
45. Estrada-Parra S, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Santamaria V, Ondarza R. et al. Comparative study of the transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. *Int J Immunopharmacol.* 1998;20:521-535. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0192056198000319?via%3Dihub>
46. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 2009;459:931-939. <http://doi:10.1038/nature08157>.
47. Shirey KA, Lai W, Scott AJ, Lipsky M, Mistry P, Pletneva LM . 2013. **The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection.** *Nature.* 497;7450: 498–502. <https://doi:10.1038/nature12118>.
48. Diaz A, Allerson M, Culhane M, Sreevatsan S, Torremorell M. Antigenic drift of H1N1 influenza A virus in pigs with and without passive immunity. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;4:52-60. <https://DOI:10.1111/irv.12190>.
49. Allerson M, Deen J, Detmer SE, Gramer MR, Joo HS, Romagosa A, et. al. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. *Vaccine.* 2013;31:500-5. <https://DOI:10.1016/j.vaccine.2012.11.023>.