

21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**UTILIZACION DE AGENTES INMUNOMODULADORES  
PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOTOXEMIA E  
INMUNODEPRESION EN EQUINOS. EFECTOS  
IN VITRO DE LA INTERLEUCINA-10 Y DEL FACTOR  
TIMICO HUMORAL y2.**

**PROYECTO DE INVESTIGACION  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
ERIK GONZALEZ BALLESTEROS**

ASESORA: MSc. MARIA MASRI DABA

7/8/2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

El Proyecto de Investigación:  
"Utilización de agentes inmunomoduladores para el tratamiento de la endotoxemia e inmunodepresión en equinos. Efectos in vitro de la interleucina-10 y del factor tímico humoral gamma2".  
que presenta el pasante. Erik González Ballesteros  
con número de cuenta: 9111105-8 para obtener el título de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 13 de enero de 2000

PRESIDENTE	M.C. José Antonio Licea Vega	<i>José Antonio Licea Vega</i>
VOCAL	MVZ. Felipe de Jesús Cortés Delgadillo	<i>Felipe de Jesús Cortés Delgadillo</i>
SECRETARIO	M.Sc. María Masri Daba	<i>María Masri Daba</i>
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Eusebio Valentino Villalobos	<i>Eusebio Valentino Villalobos</i>
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Consuelo Dueñas Sanson	<i>Consuelo Dueñas Sanson</i>

In Necnelimatiliztli, In Tlamanaliztli.

**Ometeotzin:** noyeliz motech itauhqui, zan oc cencah tlapanahuia.

**Notahtzin, nonantzin ihuan noquichtiuhtzin:**  
cencah nictlazohcamati anmotlacuauhnaloliztzin.

**Nocemicniuhtzin:** nimitztlazocamachililia pampa moicniuhyotzin.

**Chalchihuhtezcatzin:** nimitznotlazohtilia amiquiliztica,  
cualnezqui ixcoxocitic cihuatzintli,  
ipan mochalchihuhtezcatzitzin nicnequi tezcahuiz nihiyoh,  
ninciz notlatic tonalli,  
ihuan noniyahualtic teocuitlaicpatl  
nahciz cemicanihtoliz.

# I. UTILIZACIÓN DE AGENTES INMUNOMODULADORES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOTOXEMIA E INMUNODEPRESIÓN EN EQUINOS. EFECTOS *IN VITRO* DE LA INTERLEUCINA-10 Y DEL FACTOR TÍMICO HUMORAL $\gamma$ 2.

## II. INTRODUCCIÓN.

### Antecedentes.

El término endotoxemia se refiere a la presencia en la circulación sanguínea de la endotoxina o componente lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de las bacterias Gram negativa, siendo la causa principal de muerte en el caballo, asociada con la patogenia de los trastornos gastrointestinales involucrados en el síndrome abdominal agudo (cólico o dolor abdominal agudo) y la septicemia en potros. La endotoxemia es una condición común en caballos con trastornos abdominales agudos y es más frecuente en casos con enteritis, lesiones entéricas isquémicas (estrangulantes y no estrangulantes) o ruptura intestinal por lo que se asocia con un pronóstico desfavorable en estos pacientes; aunque de hecho puede presentarse con cualquier enfermedad dentro de la cavidad abdominal.<sup>1,2,3</sup>

La patogenia de la endotoxemia se inicia cuando el LPS tiene acceso a la circulación sistémica a partir del tracto gastrointestinal o a partir de algún foco inflamatorio séptico. En la circulación, el LPS se une a una proteína de fase aguda conocida como proteína fijadora de LPS y forma un complejo que interacciona con la molécula CD14 que se encuentra en la superficie de fagocitos mononucleares (macrófagos y monocitos) y neutrófilos, iniciando con ello la respuesta inflamatoria sistémica. Este proceso en realidad comprende la interacción de múltiples tipos celulares como son los fagocitos mononucleares, células endoteliales, neutrófilos, fibroblastos y linfocitos, así como la liberación de mediadores proinflamatorios como los metabolitos del ácido araquidónico (eicosanoides), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), factor activador de plaquetas (PAF)<sup>4,5</sup> e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>6</sup> entre otros, por lo que las anomalías clínicas existentes durante endotoxemia se asocian con la presencia y efectos de estos mediadores en el organismo.<sup>7,8,9</sup> Entre los mediadores producidos, el factor de necrosis tumoral (TNF) tiene un papel importante en la fisiopatología de la endotoxemia, ya que este inicia una compleja cascada de eventos inflamatorios que conducen al deterioro del paciente.<sup>10</sup> En caballos con cólico los niveles de TNF en el suero y líquido peritoneal se incrementan,<sup>1,2</sup> lo mismo sucede con los niveles circulantes después de la administración experimental de endotoxina<sup>11,12</sup> así como en los potros con septicemia.<sup>13</sup>

La producción de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , PAF, prostaglandinas y leucotrienos, se acompaña de la liberación de factores que regulan la respuesta inflamatoria. En humanos durante la endotoxemia y septicemia se producen altos niveles de interleucina-10 (IL-10) correlacionados positivamente con los niveles circulantes de LPS,<sup>14</sup> y se ha postulado que su finalidad es proteger al paciente de los efectos de la liberación masiva de mediadores proinflamatorios a la circulación, ya que la inhibición de su actividad aumenta la producción de estos mediadores y la letalidad de la exposición a la endotoxina.<sup>15,16,17</sup> La IL-10 controla la síntesis de los mediadores iniciales del choque endotóxico como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el IFN- $\gamma$ ; hecho demostrado en ratones *knockout* para IL-10 altamente sensibles al LPS, los cuales presentan altos niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12,

# I. UTILIZACIÓN DE AGENTES INMUNOMODULADORES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOTOXEMIA E INMUNODEPRESIÓN EN EQUINOS. EFECTOS *IN VITRO* DE LA INTERLEUCINA-10 Y DEL FACTOR TÍMICO HUMORAL $\gamma 2$ .

## II. INTRODUCCIÓN.

### Antecedentes.

El término endotoxemia se refiere a la presencia en la circulación sanguínea de la endotoxina o componente lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de las bacterias Gram negativa, siendo la causa principal de muerte en el caballo, asociada con la patogenia de los trastornos gastrointestinales involucrados en el síndrome abdominal agudo (cólico o dolor abdominal agudo) y la septicemia en potros. La endotoxemia es una condición común en caballos con trastornos abdominales agudos y es más frecuente en casos con enteritis, lesiones entéricas isquémicas (estrangulantes y no estrangulantes) o ruptura intestinal por lo que se asocia con un pronóstico desfavorable en estos pacientes; aunque de hecho puede presentarse con cualquier enfermedad dentro de la cavidad abdominal<sup>1,2,3</sup>

La patogenia de la endotoxemia se inicia cuando el LPS tiene acceso a la circulación sistémica a partir del tracto gastrointestinal o a partir de algún foco inflamatorio séptico. En la circulación, el LPS se une a una proteína de fase aguda conocida como proteína fijadora de LPS y forma un complejo que interacciona con la molécula CD14 que se encuentra en la superficie de fagocitos mononucleares (macrófagos y monocitos) y neutrófilos, iniciando con ello la respuesta inflamatoria sistémica. Este proceso en realidad comprende la interacción de múltiples tipos celulares como son los fagocitos mononucleares, células endoteliales, neutrófilos, fibroblastos y linfocitos; así como la liberación de mediadores proinflamatorios como los metabolitos del ácido araquidónico (eicosanoides), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), factor activador de plaquetas (PAF)<sup>4,5</sup> e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>6</sup> entre otros; por lo que las anomalías clínicas existentes durante endotoxemia se asocian con la presencia y efectos de estos mediadores en el organismo<sup>7,8,9</sup>. Entre los mediadores producidos, el factor de necrosis tumoral (TNF) tiene un papel importante en la fisiopatología de la endotoxemia, ya que este inicia una compleja cascada de eventos inflamatorios que conducen al deterioro del paciente<sup>10</sup>. En caballos con cólico los niveles de TNF en el suero y líquido peritoneal se incrementan,<sup>12</sup> lo mismo sucede con los niveles circulantes después de la administración experimental de endotoxina<sup>11,12</sup> así como en los potros con septicemia.<sup>13</sup>

La producción de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , PAF, prostaglandinas y leucotrienos, se acompaña de la liberación de factores que regulan la respuesta inflamatoria. En humanos durante la endotoxemia y septicemia se producen altos niveles de interleucina-10 (IL-10) correlacionados positivamente con los niveles circulantes de LPS,<sup>14</sup> y se ha postulado que su finalidad es proteger al paciente de los efectos de la liberación masiva de mediadores proinflamatorios a la circulación, ya que la inhibición de su actividad aumenta la producción de estos mediadores y la letalidad de la exposición a la endotoxina<sup>15,16,17</sup>. La IL-10 controla la síntesis de los mediadores iniciales del choque endotóxico como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el IFN- $\gamma$ ; hecho demostrado en ratones *knockout* para IL-10 altamente sensibles al LPS, los cuales presentan altos niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12,

IL-12p40, IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y nitrato en el suero después de un desafío con LPS y que además son extremadamente vulnerables a la reacción de Shwartzman generalizada.<sup>6</sup> La IL-10 también regula la permeabilidad microvascular y las interacciones célula endotelial-leucocito, evitando las alteraciones hemodinámicas del escape de proteína a nivel microvascular y la hipotensión; y reduciendo la marginación, adhesión y reclutamiento de leucocitos en órganos como el pulmón durante la endotoxemia.<sup>18,19</sup> Además las propiedades antiinflamatorias de la IL-10 contribuyen parcialmente en el efecto terapéutico de los glucocorticoides en la endotoxemia.<sup>20</sup>

Esta citocina forma parte de un mecanismo autorregulador, como un componente importante de la defensa natural contra el desarrollo de las respuestas patológicas inducidas por el LPS, ya que es el principal factor en la desactivación de monocitos y macrófagos.<sup>14</sup> De hecho, los monocitos activados *in vitro* con LPS producen altas cantidades de IL-10, que a pesar de producirse tardíamente (niveles máximos 24-48 horas) en comparación con la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (niveles máximos 4-8 horas), es capaz de inhibir la transcripción de estas citocinas y de la misma IL-10, regulando su propia secreción.<sup>21</sup> También se ha observado que en primates el TNF- $\alpha$  induce la producción de IL-10 durante la endotoxemia,<sup>22</sup> aunque en el ratón esta participación es únicamente marginal.<sup>20</sup>

#### Actividades de la IL-10.

La IL-10 es una citocina producida por distintos tipos celulares entre los que se encuentran las células Th2 CD4<sup>+</sup>,<sup>23</sup> células T CD8<sup>-</sup>,<sup>24</sup> monocitos,<sup>21,24,25</sup> y linfocitos B<sup>25</sup> incluyendo los B Ly-1<sup>-</sup> (CD5<sup>-</sup>).<sup>26</sup> Tiene actividad pleiotrópica con efecto en monocitos,<sup>14,21,27</sup> células T,<sup>27</sup> células de la microglia,<sup>28</sup> leucocitos polimorfonucleares (PMN),<sup>18</sup> células cebadas,<sup>29</sup> macrófagos,<sup>23,30</sup> linfocitos B, y células asesinas naturales o linfocitos granulares grandes (NK/LGL).<sup>31</sup>

La IL-10 posee múltiples propiedades inmunomoduladoras, entre ellas una potente actividad antiinflamatoria al inhibir la síntesis de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, por lo que puede ser útil en el tratamiento de diversos trastornos inflamatorios e infecciosos.<sup>32,33</sup> (Tabla 1)

Tabla 1. Efectos *in vitro* de la IL-10.

Efectos inhibitorios de la IL-10.	Efectos estimulantes de la IL-10
Inhibe la síntesis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , <sup>71, 31, 35, 36, 37</sup> IL-2, <sup>38</sup> IL-6, <sup>21,29, 34,36, 39,42</sup> IL-10, <sup>71</sup> IL-12, <sup>23</sup> TNF- $\alpha$ , <sup>19, 21, 19,</sup> <sup>34, 37, 4</sup> IFN- $\beta$ , <sup>43</sup> IFN- $\gamma$ , <sup>17</sup> G-CSF, <sup>21</sup> M-CSF, GM-CSF <sup>21</sup> <sup>37</sup> y IGF- $\beta$ <sup>41</sup>	Estimula la síntesis de IL-1 $\beta$ (inducida por TNF- $\alpha$ ) <sup>45</sup> y de IL-6 (en ausencia de LPS) <sup>40</sup>
Inhibe la síntesis de las quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , <sup>46</sup> IL-8, <sup>19,21</sup> e IP-10 <sup>43</sup>	Estimula la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup> <sup>19, 10</sup> y NO <sup>42</sup>
Inhibe indirectamente, por su efecto sobre otras citocinas la síntesis de PAF y O <sub>2</sub> <sup>-</sup> . <sup>19</sup>	Incrementa la expresión de los receptores TNF-RI (p55) y TNF-RII (p75) solubles y de membrana <sup>45, 47</sup> Fc $\gamma$ RI (CD16), II (CD32), III (CD64) y CD14 <sup>40</sup>
Reduce la expresión de antígenos del MHC clase II, <sup>21,23,32</sup> mTNF- $\alpha$ , <sup>41</sup> $\beta$ <sup>75</sup> e ICAM-1. <sup>49,48</sup>	

NOIA Fc $\gamma$ RI, II y III = receptor tipo I, II y III para la porción Fc de inmunoglobulina G, G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrógeno, ICAM-1 = molécula 1 de adhesión intercelular; IFN- $\beta$  = interferón beta, IFN- $\gamma$  = interferón gamma, IL = interleucina, M-CSF = factor estimulante de colonias de monocitos, IP-10 = proteína 10 inducida por interferon- $\gamma$ , LFA-1 = antígeno asociado a la función leucocitaria-1, Mac-1 (CD11bCD18 o CR3) = receptor para el complemento tipo 3, MHC = complejo principal de histocompatibilidad; MIP-1 $\alpha$  = proteína 1 $\alpha$  inflamatoria de macrófagos, NO = óxido nítrico, O<sub>2</sub><sup>-</sup> = anión superóxido, PAF = factor activador de plaquetas, IGF- $\beta$  = factor transformador del crecimiento- $\beta$ , mTNF- $\alpha$  = TNF- $\alpha$  de membrana, TNF- $\alpha$  = factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , TNF-RI = receptor tipo I para TNF; TNF-RII = receptor tipo II para TNF.

### IL-10 en modelos de endotoxemia y septicemia.

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria de esta citocina se ha empleado IL-10 de origen exógeno como la IL-10 humana recombinante (rhIL-10), la IL-10 murina recombinante (rmIL-10) y la IL-10 viral (vIL-10); con resultados relacionados directamente con la concentración y tiempo de incubación empleados.

#### Estudios *in vitro*.

Se han estudiado los efectos *in vitro* de la IL-10 en diversos tipos celulares, pero el más importante corresponde a las células del sistema fagocítico mononuclear que incluye a los monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares; ya que son el principal grupo celular que al interactuar con la endotoxina sintetiza y libera cantidades masivas de los mediadores proinflamatorios (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) que desencadenan la respuesta inflamatoria sistémica

Se han empleado predominantemente monocitos humanos activados con LPS de *Escherichia coli* o con IFN- $\gamma$ . Las concentraciones de IL-10 utilizadas varían entre 3.3-20 ng/ml y 50-200 U/ml. En los monocitos la IL-10 inhibe la síntesis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ; y estimula la expresión de los receptores mTNF-RII y sTNF-RII,<sup>19,21,47,50</sup> con efectos a nivel transcripcional los cuales son más intensos para IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ .<sup>21,47,50</sup> En el caso TNF- $\alpha$  esto se traduce en una disminución en la secreción de esta citocina superior al 60%<sup>30</sup> e incluso al 90%,<sup>19,21</sup> porcentaje que depende directamente de la concentración de rhIL-10 empleada. El tiempo de incubación con IL-10 también afecta el grado de inhibición, como se observó al preincubar monocitos humanos durante 1 o 2 horas con 100 U/ml (6.6 ng/ml) de rhIL-10 reduciendo la transcripción de TNF- $\alpha$  en 84.4% y 91.3% respectivamente; aunque su efecto se redujo un 27.6% al agregarla treinta minutos después del estímulo con LPS.<sup>50</sup> La IL-10 también modula la síntesis de PAF y aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), en forma directa o dependiendo de su efecto en otras citocinas. La coincubación con 20 ng/ml de rhIL-10 incrementó el pico temprano (15 minutos) de síntesis de PAF inducida por LPS y estimuló indirectamente, dependiendo en parte de su efecto sobre la síntesis de PAF, la producción temprana (5 minutos) de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.<sup>19</sup> Sin embargo la producción tardía de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y PAF en el segundo pico de producción (6-12 horas) fue inhibida totalmente como resultado de una reducción del 95% en la producción de TNF- $\alpha$ .<sup>19</sup>

Los efectos de la IL-10 en macrófagos tisulares son similares a los observados en monocitos. Se han realizado estudios empleando macrófagos alveolares y peritoneales humanos, murinos y recientemente equinos; además de líneas celulares establecidas con su origen en macrófagos. Las concentraciones de IL-10 empleadas se encuentran en el rango de 0.1-100 ng/ml y 10-200 U/ml. La preincubación con IL-10 y la posterior activación con LPS produce una inhibición en la producción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).<sup>50,51,52,53</sup> En macrófagos alveolares humanos la preincubación durante 2 horas con rhIL-10 ( $\geq 10$  ng/ml) inhibió la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8;<sup>52</sup> condición observada aún al emplear concentraciones menores de rhIL-10 ( $\geq 50$  U/ml, 3.3 ng/ml) donde la producción TNF- $\alpha$  se redujo en 37%; y como sucede en monocitos, el efecto inhibitorio está asociado con una disminución en la transcripción de TNF- $\alpha$ , ya que al preincubar con 100 U/ml (6.6 ng/ml) de rhIL-10 esta se redujo en un 47.8%.<sup>50</sup> Los macrófagos peritoneales equinos han mostrado sensibilidad a los efectos de la rhIL-10; la preincubación por 30 minutos con una concentración  $\geq 1$  ng/ml disminuyó significativamente la producción de TNF- $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> y con  $\geq 10$  ng/ml la de IL-6; con 100 ng/ml alcanzó niveles de inhibición del 92.2% para TNF- $\alpha$ , 56.2% para IL-6 y 72.8% para PGE<sub>2</sub> con cualquiera de las dosis

empleadas de LPS (1, 10 y 100 ng/ml)<sup>53</sup> En macrófagos peritoneales murinos la preincubación con 10 ng/ml de rmIL-10 es suficiente para disminuir el 90% en la producción de IL-6<sup>51</sup>

Los efectos de la IL-10 se conservan en cierto grado al actuar simultáneamente con el LPS. En líneas celulares de macrófagos y macrófagos peritoneales murinos inhibió la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  a nivel transcripcional y postranscripcional (síntesis proteica)<sup>50,55</sup> La rmIL-10 inhibió la producción del TNF- $\alpha$  en 80-90% en la primera hora,  $\geq 90\%$  a las 3 horas y alcanzó la máxima supresión a las 7-10 horas; y dado que es mayor a nivel transcripcional el efecto se reduce si se agrega posteriormente al LPS<sup>55</sup>

También se han empleado células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) que incluyen a monocitos y linfocitos sanguíneos; observando una potente capacidad antiinflamatoria de la IL-10 en concentraciones entre los 120 pg y 200 ng. En estas células inhibe la síntesis a nivel transcripcional de la IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ,<sup>34,54</sup> y postranscripcional de la IL-1 $\beta$  e IL-6.<sup>34</sup> Concentraciones de 20 ng/ml de rhIL-10 inhiben casi completamente la producción de estas citocinas al agregarse hasta 2 horas después que el LPS, efecto que se reduce 4 horas después y que se pierde 6 horas después.<sup>34,54</sup> La rhIL-10 también inhibe la actividad procoagulante (PCA) dependiente del factor tisular (TF) en la membrana de monocitos y que es inducida por el LPS, con una concentración de tan baja como 120 pg/ml inhibió la PCA en un 64-97% al disminuir el TF en monocitos, pero requiriendo un tiempo de preincubación de por lo menos 6 horas para obtener el efecto máximo.<sup>55</sup>

Los leucocitos PMN o granulocitos neutrófilos tienen importancia en la patogénesis de la endotoxemia ya que son reclutados y secuestrados en órganos como pulmón e hígado, donde son causantes de gran parte del daño tisular, por esto se han realizado estudios con leucocitos PMN estimulados con LPS para evaluar la capacidad antiinflamatoria de la IL-10. La preincubación por 45 minutos con 100 U/ml de rhIL-10 disminuye la transcripción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, aunque en forma tardía 4 horas después de la estimulación con LPS<sup>56</sup> También modula la síntesis de PAF y aniones superóxido en forma similar lo observado en monocitos, aunque en menor grado y sólo con concentraciones bajas de LPS(1ng/ml); en los PMN la inhibición tardía en la síntesis de PAF se asocia con la inhibición en la producción de IL-8<sup>19</sup>

También se han empleado modelos *in vitro* con sangre completa, para evaluar las actividades de la IL-10 y donde también ha mostrado efectos antiinflamatorios. Al examinar el efecto de la rhIL-10 en la producción de IFN- $\gamma$  inducida por LPS, se encontró que la preincubación de sangre completa humana con rhIL-10 (10 U/ml) durante 30 minutos inhibió marcadamente la producción de IFN- $\gamma$ , mientras que la neutralización la IL-10 endógena la incrementó, demostrando el papel regulador de esta citocina en el proceso inflamatorio<sup>17</sup>

#### Estudios *in vivo*.

La administración de IL-10 exógena (rmIL-10, rhIL-10, vIL-10 y transferencia genética) ha demostrado ser altamente efectiva para proteger de la endotoxemia letal a ratones,<sup>57,58</sup> y de la endotoxemia subletal a primates<sup>59</sup> y humanos<sup>60</sup>

En ratones la rmIL-10 protege de la letalidad en la endotoxemia experimental al reducir en forma importante los niveles circulantes de IFN- $\gamma$ <sup>17</sup> y TNF- $\alpha$ , el daño hepático, actividad de mieloperoxidasa hepática, marginación de neutrófilos en el hígado y la

expresión de moléculas de adhesión (integrinas  $\beta_2$ ) en los neutrófilos circulantes (Mac-1 y LFA-1),<sup>57,58 61,62</sup> sin embargo si se administra 30 minutos después que el LPS esta capacidad se reduce, perdiéndose al administrarla después de 5 horas<sup>57</sup> También se ha utilizado rhIL-10 con resultados similares al disminuir la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, e IFN- $\gamma$  en un desafío con LPS o TNF- $\alpha$  murino recombinante (rmTNF- $\alpha$ ); aunque parece ser menos efectiva si se administra en presencia de niveles previamente elevados de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que faciliten la cooperación de ambas citocinas durante la endotoxemia.<sup>63</sup>

Se han investigado estrategias como la transferencia genética de IL-10 humana y viral (proteína BCRF1) en ratones con endotoxemia experimental, obteniendo resultados que coinciden en general con los ya mencionados. En los animales transgénicos se disminuye la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y la mortalidad durante la endotoxemia letal, sin afectar aparentemente la producción de IL-6; del mismo modo se reduce la respuesta inflamatoria local hacia estímulos locales tratamiento la respuesta inflamatoria local.<sup>64,65</sup>

Cabe mencionar que a pesar de la evidente actividad antiinflamatoria de la IL-10 endógena y exógena, existen resultados contradictorios en cuanto a su efecto benéfico en ciertas variantes del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica como la septicemia. Se ha reportado la ineficacia de la rhIL-10 para reducir la morbilidad y mortalidad en un modelo murino de septicemia.<sup>66</sup> En este caso la IL-10 presentó un efecto limitado en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 y en el reclutamiento y secuestro de neutrófilos en pulmón y peritoneo; reduciendo únicamente la producción local de KC (quimiocina C-X-C homóloga de la IL-8 humana) Es importante notar que la IL-10 endógena tuvo niveles muy bajos en el líquido peritoneal y que no fue detectada en el plasma; y aunque hubo tendencia a disminuir la mortalidad, no alcanzó a ser significativa. Se requiere más estudio en este tipo de modelos para conocer en realidad los alcances de la terapia con IL-10 a nivel clínico

Al estudiar un modelo de choque séptico posterior a neumonía por *P. aeruginosa* en conejos, se observó que la administración sistémica de rhIL-10 como pretratamiento redujo la producción de los mediadores proinflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-8 y MCP-1; evito la hipotensión y caída del gasto cardíaco, y redujo la bacteriemia, aparentemente al mejorar el aclaramiento de bacterias circulantes.<sup>67</sup>

En primates no humanos con endotoxemia subletal el pretratamiento con rhIL-10, inhibe la liberación de TNF, IL-6, IL-8 e IL-12, y atenúa moderadamente la degranulación de neutrófilos y la leucocitosis neutrofilica.<sup>59</sup> En humanos el pretratamiento con rhIL-10 reduce la respuesta febril, la liberación de IL-6, IL-8, TNF, antagonista del receptor para IL-1 (IL-1ra) y cortisol, bloquea la activación y el reclutamiento de granulocitos en el pulmón, modula el sistema fibrinolítico reduciendo la activación e inhibición de la fibrinólisis e inhibe la activación de la coagulación; sin embargo el postratamiento una hora después tiene efectos limitados afectando los niveles de cortisol, reduciendo la inhibición de la fibrinólisis y la activación de la coagulación<sup>60,68</sup>

También se han realizado estudios *ex vivo*, en los cuales después de la administración *in vivo* de IL-10 por vía subcutánea o intravenosa, se estimula sangre completa con LPS *in vitro*, donde inhibió 65 a 95% de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , al suprimir la síntesis de TNF- $\alpha$  por al menos 12 horas y la de IL-1 $\beta$  por más de 24 horas; sin afectar la producción de sus antagonistas sTNF-RI (p55), IL-1ra y el receptor soluble tipo II para IL-1.<sup>69,70</sup>

## IL-10 e inmunodepresión.

Como se menciona anteriormente la respuesta inflamatoria sistémica inducida por el LPS se acompaña de la liberación de factores antiinflamatorios naturales como la IL-10 y el TGF- $\beta$ , y que también son depresores de la inmunidad celular.<sup>71,72</sup> Dentro de las propiedades inmunomoduladoras de la IL-10 son reconocidas varias que se pueden considerar inmunodepresoras en determinadas circunstancias<sup>32,33</sup> En el caso de la septicemia se ha reconocido a esta citocina como el mediador principal en el deterioro de la inmunidad pulmonar.<sup>73</sup> Se sabe que esta citocina forma parte de la respuesta inmune de tipo Th2, mediada por linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 y que participa en la inhibición de la respuesta de tipo Th1 caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$ . En parte este efecto se debe a que la IL-10 afecta la función de las células presentadoras de antígeno (APC) como los monocitos y macrófagos. En estas células inhibe la producción de la producción de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, M-CSF, GM-CSF y TNF- $\alpha$ . También reduce la expresión de moléculas de clase II del MHC,<sup>21,39</sup> moléculas coestimulantes como la B7 e ICAM-1,<sup>48</sup> y además disminuye su capacidad citotóxica y bactericida.<sup>74,75</sup> todo ello en detrimento de su función como APC. Además puede regular indirectamente a los linfocitos T activados al inhibir la producción del potente quimiotáctico para células T activadas, la quimiocina MIP-1 $\alpha$ .<sup>46</sup>

La IL-10 también tiene efectos directos en células linfoides. En linfocitos T CD4<sup>+</sup> suprime la respuesta proliferativa antígeno-específica dependiente del MHC clase II y la producción de TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IFN- $\gamma$ .<sup>28,76,77</sup> También reduce la proliferación en respuesta a mitógenos o anti-CD3 y la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  en presencia de APC, aunque el efecto en la proliferación se revierte con la adición de IL-2 e IL-4.<sup>38,78</sup> De hecho la IL-10 es capaz de inducir una anergia prolongada que no puede ser revertida con IL-2 o estimulación de CD28 y CD3, además de inhibir en la producción de IL-2, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF.<sup>79,80</sup> En cuanto a linfocitos T CD8<sup>+</sup> posee efectos tanto inhibitorios como estimulantes, ya que inhibe indirectamente la respuesta proliferativa específica a aloantígenos induciendo un prolongado estado de anergia en presencia de APC y reduciendo la respuesta citotóxica aloespecífica, aunque no posee efectos inhibitorios directos cuando las células son activadas con anti-CD3, por otro lado, la IL-10 promueve el crecimiento de este tipo celular cuando se combina con dosis bajas de IL-2.<sup>81</sup> En linfocitos B inhibe la proliferación inducida por LPS, aunque el ligamiento cruzado de los receptores de antígeno y la estimulación de CD40 restauran la respuesta de proliferación, sugiriendo que la IL-10 modula la proliferación de células B, ya que inhibe la de aquellas que no hayan interactuado adecuadamente con un antígeno o ligando CD40.<sup>82</sup>

Se han empleado múltiples agentes inmunoestimulantes en el tratamiento de enfermedades neoplásicas e infecciosas que se asocian con estados de inmunosupresión.<sup>83</sup> Entre este tipo de fármacos se encuentran las hormonas y factores tímicos actualmente conocidos como timosinas, timulina, timopoyetina, timostimulina y factor tímico humoral.<sup>84</sup> El factor tímico humoral  $\gamma$ 2 (THF- $\gamma$ 2) es un octapéptido purificado inicialmente del timo bovino, tiene un peso molecular de 918 Da y la siguiente secuencia de aminoácidos: Leu-Glu-Asp-Gh-Pro-Lis-Fen-Leu, y el THF- $\gamma$ 2 sintético posee actividades biológicas y clínicas idénticas al péptido natural.<sup>85</sup> El THF- $\gamma$ 2 restaura y activa diversas funciones de las células T. El THF- $\gamma$ 2 aumenta la proliferación linfocitaria y la producción de IL-2 *in vitro*, al estimular con los mitógenos fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (Con A), así como

también restaura la producción deficiente *in vivo* de IL-2.<sup>85</sup> El THF- $\gamma$ 2 sintético aumenta la respuesta blastogénica de los linfocitos T sanguíneos que presentan una respuesta deteriorada a la PHA, en pacientes urémicos con enfermedades infecciosas recurrentes.<sup>86</sup> Debido a las propiedades inmunoestimulantes del THF- $\gamma$ 2 demostradas *in vitro* e *in vivo*, en modelos experimentales de enfermedades neoplásicas e infecciosas, y de acuerdo con los resultados obtenidos en ensayos clínicos en humanos,<sup>84</sup> este inmunoestimulante puede ser utilizado para el tratamiento de la inmunodepresión posterior al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, regulando la actividad inmunodepresora de la IL-10 endógena o exógena en la endotoxemia y septicemia, así como para el tratamiento de enfermedades en el caballo que involucren una respuesta inmune deficiente.

### Justificación.

La endotoxemia es la causa principal de muerte en los equinos, asociada con el síndrome abdominal agudo y con la septicemia en neonatos. El tratamiento para prevenir o tratar en sí la endotoxemia en los caballos es en gran parte inespecífico y está orientado principalmente al mantenimiento del sistema cardiovascular (terapia de fluidos IV, antiinflamatorios no esteroides como la meglumina de flunixin, antimicrobianos de amplio espectro, etc.), pero sin obtener resultados favorables en muchos de los casos.<sup>87</sup> Se han investigado en forma experimental diversas posibilidades en el tratamiento de la endotoxemia en el caballo, como la administración de anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$ ,<sup>88,89</sup> utilización de metilxantinas como la pentoxifilina,<sup>90,91,92,93</sup> dietas ricas en ácido  $\alpha$ -linolénico,<sup>94</sup> administración de plasma hiperinmune contra LPS,<sup>95</sup> antagonistas del receptor del PAF,<sup>96</sup> polimixina B y antisuero contra *Salmonella thyphimurium*,<sup>97</sup> administración IV de un detergente<sup>98</sup> y de disulfonil-PBN,<sup>99</sup> con resultados favorables en algunos casos.

Dentro de las posibilidades en el tratamiento de padecimientos inflamatorios se encuentra la utilización de agentes inmunomoduladores antiinflamatorios como la IL-10.<sup>32</sup> Esta citocina aparentemente forma parte del mecanismo protector natural contra las respuestas patológicas al LPS durante la endotoxemia y septicemia,<sup>6,14,15,16,17,18</sup> ya que su producción se encuentra ligada a la liberación de citocinas proinflamatorias, en especial el TNF- $\alpha$ ,<sup>22</sup> su participación natural como antiinflamatorio se comprueba en ratones con deficiencia génica selectiva de IL-10, la cual se asocia con la presencia de enfermedades inflamatorias crónicas<sup>100</sup> y con una mayor susceptibilidad al LPS.<sup>6</sup>

Debido a los efectos inhibitorios de la IL-10 sobre la síntesis de los dos mediadores patofisiológicos más importantes en la endotoxemia: el TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; se sugieren que esta citocina tiene potencial como parte del tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas o crónicas en el equino, incluyendo entre ellas a la endotoxemia.

Del mismo modo el empleo terapéutico de inmunomoduladores que estimulen al sistema inmune del caballo es inexistente, por lo que es necesario comenzar el estudio de los diferentes agentes inmunoterapéuticos conocidos y estudiados en otras especies animales.<sup>83</sup> El THF- $\gamma$ 2 tiene un alto potencial terapéutico en caballos, ya que por las condiciones de estrés en que generalmente se mantienen son propensos a sufrir enfermedades infecciosas y por la importancia económica que representan se justifica el empleo de medicamentos que mejoren la salud de estos animales.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### Objetivos.

##### Objetivos Generales.

1. Evaluar la capacidad de la IL-10 para inhibir la síntesis y liberación de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .
2. Conocer y evaluar los efectos inmunoestimulantes *in vitro* del THF- $\gamma$ 2 sobre linfocitos equinos

##### Objetivos particulares.

- 1.1 Determinar los efectos *in vitro* de la IL-10 sobre la transcripción genética y expresión de RNA mensajero para las citocinas proinflamatorias equinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$
- 1.2 Evaluar la capacidad autorreguladora de la IL10 *in vitro* mediante la administración de IL-10 exógena y la evaluación de expresión del gene para IL-10 equina.
- 1.3 Evaluar el efecto de la IL-10 sobre la producción *in vitro* de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  equinos.
- 1.4 Evaluar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis inmunosorbente ligado a enzimas (PCR-ELISA) para cuantificar la expresión *in vitro* de citocinas equinas.
- 1.5 Determinar y evaluar la utilidad de dispositivos comerciales de ELISA para citocinas humanas en la cuantificación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  equinos
- 2.1 Conocer los valores normales de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de linfocitos T en sangre equina
- 2.2 Conocer los efectos de la IL-10 sobre la activación linfocitaria *in vitro* de células T equinas provenientes de caballos sanos.
- 2.3 Conocer los efectos del THF- $\gamma$ 2 sobre la activación linfocitaria *in vitro* de células T equinas.
- 2.4 Evaluar la capacidad del THF- $\gamma$ 2 para contrarrestar los efectos de la IL-10 sobre la activación *in vitro* de los linfocitos equinos

#### Hipótesis.

-La IL-10 inhibe la síntesis *in vitro* de mediadores inflamatorios a partir de leucocitos de la línea monocito/macrófago de equino, y reduce la activación *in vitro* de linfocitos T equinos

-El THF- $\gamma$ 2 *in vitro* contrarresta los efectos inmunodepresores de la IL-10 sobre la actividad de los linfocitos T equinos.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

### I. Efecto de la interleucina-10 sobre la síntesis *in vitro* de mediadores inflamatorios inducida por lipopolisacárido en monocitos sanguíneos periféricos equinos.

#### 1 Obtención de muestras

Las muestras sanguíneas se obtendrán mediante extracción aseptica a partir de la vena yugular de caballos adultos clinicamente normales y sometidos a estudios de patologia clinica (hemograma y fibrinogeno) estando dentro de los rangos normales. Se colectarán cincuenta mililitros de sangre venosa por caballo en una solución de citrato de sodio al 3.8%, 1 parte de citrato de sodio: 9 partes de sangre; las muestras se conservarán en refrigeración para ser procesadas en el menor tiempo posible

#### 2 Aislamiento de monocitos sanguíneos periféricos.

Los monocitos son aislados en forma aseptica a partir de 25 ml de la sangre con citrato por medio de centrifugación por gradiente de densidad, utilizando Percoll al 65%<sup>101</sup> (Sigma Chemical Co, St, Louis, Mo) con ciertas modificaciones a los métodos de Henry y Moore, 1991<sup>1</sup> y Jackman *et al.*, 1994;<sup>102</sup> tal y como se describe a continuación

La sangre se centrifuga a 200 × g durante 5 minutos y el sobrenadante rico en plaquetas es descartado. El paquete celular se diluye 1:1 con solución salina amortiguada con fosfato que contenga 0.02% de EDTA, después se coloca cuidadosamente sobre Percoll 65% y se centrifuga a 400 × g durante 20 minutos. La banda mononuclear se aspira, se lava una vez en solución salina amortiguada con fosfato que contenga 0.02% de EDTA, y se incuba durante 15 minutos en medio RPMI 1640 conteniendo EDTA 5mM. Después de la incubación se centrifuga y la pastilla celular se lava dos veces con medio RPMI 1640.

Posteriormente las células mononucleares se suspenden en medio RPMI 1640, suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin y 0.5 mg/ml de anfotericina B; en una concentración final de  $4 \times 10^6$  células/ml de medio, este método de aislamiento debe producir >98% de células mononucleares. Las células suspendidas en 1 ml de medio RPMI 1640 se incuban en tubos de polipropileno estériles a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas para permitir la adherencia de monocitos. Las células no adheridas son removidas con tres lavados de solución salina amortiguada con fosfato, la población de células adherentes debe constituirse de >85% de monocitos. Para determinar la pureza de los monocitos sanguíneos periféricos, estos se evalúan mediante tinción diferencial (morfología) y tinción no específica de esterasa; además para determinar su viabilidad se realiza la prueba de exclusión de azul de tripán.

#### 3 Cultivo y estimulación de monocitos

Los monocitos son cubiertos con 1 ml de medio RPMI 1640 (suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin y 0.5 mg/ml de anfotericina B), conteniendo LPS (*E. coli* O55 B5) en concentraciones finales de 0, 0.1 y 1 µg/ml (hora 0) e interleucina humana recombinante (rhIL-10) en concentraciones finales de 0, 1, 10, 100 ng/ml (-2, 0 y 2 horas). Los tubos son incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas. Los sobrenadantes son retirados de acuerdo a los siguientes tiempos 0, 0.5, 2 y 6 horas (IL-10. -

2 h), 0,5,2 y 6 horas (IL-10: 0 h), y 2, 4 y 6 horas (IL-10. 2 h) Los sobrenadantes se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$  para evaluarlos posteriormente y las células son procesadas para cuantificar el mRNA para IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$ . Todos los ensayos se realizarán por triplicado.

#### 4 Cuantificación de mRNA para IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$ mediante la reacción en cadena de la polimerasa y ELISA (PCR-ELISA).

Se utilizará el análisis de PCR-ELISA ya que es un método con alta especificidad y sensibilidad para la detección y cuantificación de mRNA a partir de una muestra de pocas células. Al utilizar equipo, materiales y reactivos relativamente comunes, y al no emplear elementos radioactivos en su procedimiento, reduce los costos y evita la producción de material residual contaminante. Además al emplear la metodología básica de una prueba de ELISA se facilita el manejo de un mayor número de muestras en menos tiempo que el empleado por otros métodos.

##### 4.1 Extracción y aislamiento de RNA total.

El aislamiento del RNA celular total se realiza mediante la modificación descrita por Xie y Rothblum, 1991<sup>103</sup> al método de extracción ácida en un solo paso con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987<sup>104</sup>).

##### *Preparación de las soluciones.*

Todas las soluciones se preparan con agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC), la cual se prepara agregando 0.2 ml de solución de DEPC por cada 100 ml de agua bidestilada, se agita vigorosamente para integrar la solución y después se somete al autoclave para inactivar el DEPC sobrante. La solución B contiene tiocianato de guanidinio 4 M y citrato de sodio 25 mM (pH 7.0). La solución A se prepara mezclando fenol saturado en agua, solución B y acetato de sodio (NaOAc) 2 M (pH 4.0) en una relación 1:1:0.1, y es suplementada con 720  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 M por cada 100 ml de solución B. El fenol contiene 0.04% (peso/peso) de 8-hidroxiquinolina. La solución A puede ser almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$  por varios meses.

##### *Aislamiento del RNA.*

Las células son lisadas directamente en los tubos utilizando 1 ml de la solución A y mezclándola con las células usando una micropipeta. El lisado se transfiere a tubos de propileno, se agregan 0.10 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo, las fases son mezcladas brevemente (10 segundos) con un vortex. La mezcla se mantiene en hielo durante 15-30 minutos y las fases son separadas por centrifugación a  $12\,000 \times g$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase acuosa superior (aproximadamente 500  $\mu\text{l}$ ) es transferida a un tubo nuevo que contenga 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Las muestras se mezclan y son colocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1-3 horas (o almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche). El RNA se colecta por centrifugación ( $12\,000 \times g$ , 20 minutos). La pastilla de RNA se lava 2 veces con etanol 70%, y el RNA se colecta por centrifugación a  $12\,000 \times g$  durante 10 minutos después de cada lavado. Las pastillas son secadas y resuspendidas en 350  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC. El RNA puede almacenarse en etanol precipitando 300  $\mu\text{l}$  de la solución de RNA con 2 volúmenes de etanol 95% y 1/10 de volumen de NaOAc 3 M (pH 5.2, tratado con DEPC), almacenándolo en alícuotas ya sea congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### *Evaluación del RNA.*

La calidad y cantidad del RNA obtenido se evalúa por medio de electroforesis en gel de agarosa 1.5% y espectroscopia de absorción a 230, 260 y 280 nm

Para evaluar la pureza y concentración de RNA por medio de espectroscopia se requiere de un espectrofotómetro que abarque el rango de luz ultravioleta a luz visible, ya sea de haz de luz sencillo o doble. Se colocan 1.0 ml de amortiguador TNE 1x (Tris base 0.1 M, EDTA 10 mM, NaCl 2.0 M, ajustar el pH a 7.4 con HCl concentrado) en un tubo o cuveta de cuarzo de 1 cm de longitud y se coloca en el espectrofotómetro leyendo a 325 nm (puede ser necesaria la comparación con agua destilada de este tubo blanco relativo) ajustándolo en cero. En instrumentos con doble haz de luz se utiliza como referencia esta solución blanco. En espectrofotómetros de haz sencillo, se remueve el tubo blanco y se inserta el que contiene la muestra de RNA o el RNA estándar suspendido en la misma solución del blanco y se toma la lectura, repitiendo este proceso a 280, 260 y 230 nm. Para determinar la concentración (C) de RNA presente en la muestra, se toma la lectura a 260 nm ( $A_{260}$ ) y se realiza la siguiente ecuación:  $C(\mu\text{g/ml}) = A_{260} / 0.025$ , considerando la longitud de 1 cm del tubo o cuveta del espectrofotómetro y un pH neutro, una absorbancia a 260 nm de 1.0 equivale a ~40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA.

Se utiliza una razón de  $A_{260}/A_{280}$  y las lecturas a  $A_{230}$  y  $A_{325}$  para estimar la pureza del RNA en la muestra. Razones de 1.9 a 2.0 indican una alta pureza en la preparación de RNA. Los contaminantes que absorban a 280 nm como las proteínas, reducen esta razón. La absorbancia a 230 nm indica contaminación de la muestra con fenol o urea, y la absorbancia a 325 nm sugiere contaminación con partículas o cuvetas sucias.

### 4.2 Transcripción reversa y síntesis del DNA complementario (cDNA).

De acuerdo a la técnica descrita por Alard *et al.*, 1993<sup>105</sup> para la cuantificación de mRNA mediante PCR-ELISA, el RNA purificado (1  $\mu\text{g}$ ) es incubado en 20  $\mu\text{l}$  de amortiguador (Promega Corp., Madison, WI) para transcripción reversa (RT) con 100  $\mu\text{M}$  de deoxinucleótidos y 4 U por reacción de transcriptasa reversa del virus de mieloblastosis aviar (AMV-RT). Se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente y 1 hora a 42° C. La reacción se detiene con incubación a 95° C por 1 minuto.

### 4.3 Amplificación mediante PCR

El método se basa en las técnicas descritas por Alard *et al.*, 1993<sup>105</sup> y por Landgraf, Reckmann y Pingoud, 1991,<sup>106</sup> pero con ciertas modificaciones. La amplificación por PCR se lleva a cabo en 50  $\mu\text{l}$  de amortiguador de amplificación (Promega Corp. Madison, WI) conteniendo 0.25  $\mu\text{M}$  de iniciadores de sentido (5'-biotina) y de contrasentido (5'-digoxigenina), 1.25 U por reacción de *Taq* DNA polimerasa. Los iniciadores utilizados son específicos para las citocinas equinas IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$ . (Tabla 2) El perfil térmico inicial es de 93° C por 3 minutos, seguido por el número indicado de ciclos: IL-1 $\beta$ : 30 ciclos de desnaturalización (94° C, 1 min.), templado (45° C, 1 min) y polimerización (72° C, 1 min.);<sup>107</sup> IL-10: 35 ciclos (94° C, 30 seg., 55° C, 30 seg. y 72° C, 1 min.);  $\beta$ -actina: 25 ciclos (94° C, 30 seg., 55° C, 30 seg. y 72° C, 1 min.)<sup>108</sup> y TNF- $\alpha$ : 35 ciclos (94° C, 45 seg., 54° C, 45 seg. y 72° C, 80 seg.)<sup>109</sup> En el número indicado de ciclos 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción son muestreados. Todos los pasos de preamplificación se realizan bajo una campana de flujo laminar. Para utilizar la técnica "hot start" sin la apertura de los tubos de

reacción, se sigue un protocolo para preparar el PCR manteniendo todas las muestras en hielo antes de colocar todos los tubos simultáneamente dentro del termociclador, el cual se debe preparar de antemano a 93° C. Se realizan controles para detectar cualquier posible contaminación

**Tabla 2.** Iniciadores y tamaño esperado para los productos amplificados por PCR

Amplificado	Iniciador de sentido (5' biotina-3')	Iniciador de contrasentido (5' digoxigenina-3')	Tamaño del fragmento (bp)
IL-1 $\beta$ <sup>107</sup>	ctcagggttctggagcagcc	gtgcagccctgcagcatgttc	918
IL-10 <sup>158</sup>	gacitaaagggttacctgggttg	tgcttcagttttcatctctgttg	325
TNF $\alpha$ <sup>159</sup>	actcagatcatcttctcgaac	gcagagaaggagttgacc	289
$\beta$ -actina <sup>158</sup>	atggatgatgatcgcgcgcg	aggatgccctcttctctctg	194

#### 4.4 Cuantificación de los productos amplificados.

Se cubren las microplacas de poliestireno con 50-100  $\mu$ l de una solución de estreptavidina 1  $\mu$ g/ml, y los sitios libres son bloqueados con una solución de leche descremada al 5% y Tween 20 al 2% o con albúmina sérica bovina o gelatina 1  $\mu$ g/ml en PBS-Tween (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.4 mM, 0.05% (p/v) Tween 50, pH 7.2). Los productos de la amplificación (5  $\mu$ l diluidos en 50-100  $\mu$ l de PBS-Tween) son transferidos a las microplacas cubiertas con estreptavidina y son incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS-Tween, se agregan 50-100  $\mu$ l de un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP) (1/7500) y se incuba por 1 hora a temperatura ambiente. Después de 4 lavados más se agregan 50-100  $\mu$ l el sustrato de parantrofenil (PNP) (1 mg/ml) en un amortiguador de dietanolamina 1 M. La densidad óptica (OD) se mide a 405 nm después de incubar a 37° C.

Se construye una curva estándar interna amplificando el cDNA de la  $\beta$ -actina con iniciadores no marcados para convertir las lecturas de OD en concentración de cDNA inicial. Se mide la cantidad amplificada mediante espectroscopia de absorción (1-50  $\mu$ g/ml) del mismo modo en que se realiza para RNA pero con las siguientes modificaciones. Para determinar la concentración (C) de DNA de doble cadena usando la lectura a 260 nm en la siguiente ecuación:  $C(\text{pmol/ml}) = A_{260} / 13.2 \times S$  o  $C(\mu\text{g/ml}) = A_{260} / 0.020$ , donde S representa el tamaño en kilobases del DNA. Una absorbancia a 260 nm de 1.0 equivale a ~50  $\mu$ g/ml de DNA de doble cadena. Se utiliza una razón de  $A_{260}/A_{280}$  y las lecturas a  $A_{230}$  y  $A_{325}$  para estimar la pureza del DNA en la muestra. Razones de 1.8 a 1.9 indican una alta pureza en la preparación de DNA.

Después se realizan diluciones del DNA del cual se conoce su cantidad y se amplifica con los iniciadores marcados. Posteriormente se realizan las determinaciones por ELISA, construyendo una curva estándar con las OD y con la cantidad inicial de material amplificado. Se interpola la concentración del templado inicial con esta curva.

#### 5 Determinación de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ por ELISA tipo "sandwich" o de captura

Se ha reportado la efectividad de antisueros originados contra TNF- $\alpha$  humano para bloquear la actividad del TNF- $\alpha$  equino, en especial al originarse contra los 15 aminoácidos N-terminal del rhTNF- $\alpha$ <sup>110</sup>. También se ha reportado que un anticuerpo monoclonal dirigido contra el TNF- $\alpha$  humano presenta reacción cruzada con el TNF- $\alpha$  de varias especies, incluyendo al caballo, sugiriendo que el TNF- $\alpha$  es altamente conservado entre las

diversas especies<sup>111</sup> Además en un estudio inmunohistoquímico en un modelo equino de sinovitis y artritis inducida, se emplearon con éxito anticuerpos policlonales contra IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  humanos.<sup>112</sup> De acuerdo con las evidencias de los estudios anteriores, se realizarán determinaciones de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  equinos en los sobrenadantes de cultivo celular utilizando anticuerpos policlonales específicos para las citocinas humanas (Sigma Chemical Co, St, Louis, Mo), de acuerdo con la metodología estándar para ELISA tipo “sándwich” o de captura

### 5.1 Material

-Solución salina amortiguada con fosfato (PBS), 10x y 1x. Solución de almacenamiento (stock) 10x, 1 litro: NaCl 80 g, KCl 2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 11.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g. Solución de trabajo 1x, pH ~7.3: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM

-Amortiguador de bloqueo Borato salino amortiguado conteniendo: Tween 20 0.05 % (v/v), EDTA 1 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 0.25% (p/v), NaN<sub>3</sub> 0.05% (p/v). Se almacena a 4° C. La BSA puede ser sustituida por gelatina o leche instantánea al 5%, aunque esta última puede interferir de forma inespecífica con la unión del anticuerpo

-Solución sustrato de *p*-nitrofenil fosfato (NPP): *p*-nitrofenil fosfato 3 mM, NaCO<sub>3</sub> 0.05 M, MgCl<sub>2</sub> 0.05 mM. Almacenamiento a 4° C.

### 5.2 Determinación de las concentraciones del anticuerpo de captura y conjugado.

Se prepara la solución de anticuerpo de captura en PBS con 0.05% de NaN<sub>3</sub> (PBSN), en la concentración determinada, usualmente entre 0.2 y 10  $\mu$ g/ml Para determinar las concentraciones del anticuerpo de captura y del conjugado necesario para detectar las concentraciones deseadas de antígeno (citocina) se realizan diluciones entrecruzadas (criss-cross) seriadas como se describe a continuación.

#### 5.2.1 Concentración del anticuerpo de captura

Se colocan cuatro tubos de ensayo de 17×100 mm en una gradilla y se les agregan 6 ml de PBSN a los tres últimos tubos. En el tubo 1, se preparan 12 ml de una solución del anticuerpo de captura con 10  $\mu$ g/ml en PBSN. Se transfieren 6 ml de la solución del tubo 1 al tubo 2, mezclando con la pipeta aspirando y descargando por cinco ocasiones. Se repite la transferencia y mezclado para los tubos 3 y 4; los tubos contienen al final 10, 5, 2.5 y 1.25  $\mu$ g/ml del anticuerpo de captura. Se colocan 50  $\mu$ l de las diluciones del anticuerpo de captura en placas de microtitulación (i.e. cada placa se llena con una dilución). Se introducen en una envoltura de plástico y se incuban toda la noche a temperatura ambiente o por 2 horas a 37° C. Las placas son lavadas en tres ocasiones con PBS y después del último lavado el líquido residual es removido al golpear ligeramente cada placa sobre una hoja grande de papel absorbente y sacudiendo suavemente la superficie de la placa sobre varias hojas de papel.

#### 5.2.2 Concentración del antígeno

En cinco tubos de ensayo de 12×75 mm se colocan 3 ml dl amortiguador de bloqueo a los últimos cuatro tubos. En el tubo 1, se preparan 4 ml de una solución de las dos citocinas recombinantes en una concentración de 200 ng/ml en PBSN. Se transfiere 1 ml del tubo 1 al tubo 2 y se mezclan cinco veces. Se repite la transferencia para los tubos 3 al 5.

Las concentraciones finales son 200, 50, 12.5, 3.125 y 0.78 ng/ml. Se agregan 50 µl de la dilución del antígeno en las cinco primeras columnas de las placas cubiertas, la solución más diluida se coloca en la columna 5 y conforme aumenta la concentración se agregan a las columnas 4, 3, 2, 1. Se incuban 2 horas a temperatura ambiente. Las placas son lavadas con PBS y después del último lavado el líquido residual es removido al golpear ligeramente cada placa sobre una hoja grande de papel absorbente y sacudiendo suavemente la superficie de la placa sobre varias hojas de papel.

#### 5.2.3 Concentración del conjugado

En cinco tubos de ensayo de 17×100 mm se colocan 3 ml del amortiguador de bloqueo a los tres últimos tubos. En el tubo 1 se prepara una solución del conjugado en una concentración de 5000 ng/ml. Se transfieren 3 ml del tubo 1 al tubo 2 y se mezclan. La transferencia y mezcla se repite para los tubos 3 y 4, obteniéndose concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 ng/ml. Se colocan 50 µl de las soluciones del conjugado en los pozos de las filas 2 a 6 de cada placa, colocando la más diluida en la fila 6 y sucesivamente de acuerdo a su concentración en las líneas 5, 4, 3 y 2. Se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas son lavadas en tres ocasiones con PBS y después del último lavado el líquido residual es removido al golpear ligeramente cada placa sobre una hoja grande de papel absorbente y sacudiendo suavemente la superficie de la placa sobre varias hojas de papel. Se agregan 75 µl de solución con sustrato con NPP a cada pozo y se incuban por 1 hora a temperatura ambiente, y la hidrólisis es medida visualmente o con un lector de placas de microtitulación. La prueba debe resultar en 0.50 unidades de absorbancia/hora a 405 nm.

#### 5.3 Cobertura de los pozos.

Se cubren los pozos microplacas con la solución de anticuerpo de captura; se colocan 50 µl de la solución de anticuerpo en cada pozo de la placa de microtitulación y se golpea o sacude ligeramente la placa para distribuir uniformemente el anticuerpo. Las placas cubiertas se guardan en una envoltura de plástico sellada y se incuban durante toda la noche a temperatura ambiente o por 2 horas a 37° C. Las placas selladas pueden almacenarse por meses a 4° C. Los pozos se llenan con una pizeta y se sacuden repitiendo el lavado dos veces más.

#### 5.4 Bloqueo de los pozos

Se llena cada pozo con el amortiguador de bloqueo usando una pizeta y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavan 3 veces con PBS. Después del último lavado el líquido residual es removido al golpear ligeramente cada placa sobre una hoja grande de papel absorbente y sacudiendo suavemente la superficie de la placa sobre varias toallas de papel.

#### 5.5 Diluciones del antígeno estándar y del antígeno a probar.

Se preparan diluciones del antígeno estándar mediante diluciones sucesivas 1:3 del antígeno homólogo en amortiguador de bloqueo, en este caso IL-1β y TNF-α humanos recombinantes. Las diluciones del antígeno estándar debe abarcar la mayor parte del rango

dinámico de unión, generalmente de 0.1 a 1000 ng/ml. También se preparan diluciones de las soluciones del antígeno a probar en amortiguador de bloqueo

#### 5.6 Captura del antígeno.

Se agregan alícuotas de 50µl de las soluciones de antígeno a probar y de las diluciones del antígeno estándar a los pozos cubiertos con anticuerpos y se incuban por  $\geq 2$  horas a temperatura ambiente. Se lavan las placas tres veces con PBS, cada pozo es llenado con amortiguador de bloqueo, se agita vigorosamente y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavan nuevamente las placas en tres ocasiones con PBS y después del último lavado el líquido residual es removido al golpear ligeramente cada placa sobre una hoja grande de papel absorbente y sacudiendo suavemente la superficie de la placa sobre varias hojas de papel.

#### 5.7 Captura del conjugado

Posteriormente se agregan 50µl del conjugado anticuerpo específico-fosfatasa alcalina y se incuban por 2 horas a temperatura ambiente, la concentración usualmente es de entre 25 y 400 ng/ml. Se lavan nuevamente las placa tres veces con PBS, cada pozo es llenado con amortiguador de bloqueo, se agita vigorosamente y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavan nuevamente las placas en tres ocasiones con PBS y después del último lavado el líquido residual es removido al golpear ligeramente cada placa sobre una hoja grande de papel absorbente y sacudiendo suavemente la superficie de la placa sobre varias hojas de papel

#### 5.8. Construcción de la curva estándar y cuantificación de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ .

Después del lavado se agregan 75µl de la solución sustrato con NPP a cada pozo y se incuba por  $\geq 1$  hora a temperatura ambiente. La hidrólisis se comprueba cualitativamente por inspección visual ya que la hidrólisis del NPP se observa amarilla y cuantitativamente con un lector de placas de microtitulación midiendo la hidrólisis del NPP en el espectrofotómetro empleando filtros de 405 nm. Para detener la hidrólisis se puede agregar 25µl de NaOH 0.5 M.

Se construye una curva estándar con los datos producidos por las diluciones seriadas del antígeno estándar. Se marca la concentración de antígeno en el eje de las x el cual se encuentra en escala logarítmica y la absorbancia en el eje de las y el cual se encuentra en escala lineal. Se interpolan las concentraciones de antígeno en la solución de prueba a partir de la curva estándar

## II. Efectos de la interleucina-10 en un modelo *in vitro* de endotoxemia con sangre completa equina.

### 1 Obtención de muestras

Las muestras sanguíneas se obtendrán por punción venosa después de la preparación aseptica de la piel sobre la vena yugular de caballos adultos clínicamente normales y evaluando estudios de patología clínica (hemograma y fibrinógeno) estando dentro de los rangos normales. Se colectarán cincuenta mililitros de sangre venosa por caballo en una jeringa que contenga heparina de sodio en una concentración final de 10 U/ml de sangre, y

las muestras se conservarán en refrigeración para su procesamiento en el menor tiempo posible

## 2. Incubación y estimulación

De acuerdo con el modelo previamente descrito por Barton y Moore, 1994<sup>113</sup> y por Barton, Ferguson, Davis y Moore, 1997,<sup>114</sup> agregando ciertas modificaciones y quedando como se describe enseguida. Dentro de una campana de flujo laminar, se colocan 5 ml de sangre completa heparinizada en cada tubo de polipropileno estéril de 15 ml. Se agrega alguna de las siguientes soluciones. 500 µl de solución de cloruro de sodio al 0.9% (control de solución salina), 500 µl de solución de cloruro de sodio al 0.9% con 6 ng/ml de endotoxina (*E. coli* O55:B55) para una concentración final de 1 ng/ml o 500 µl de solución de cloruro de sodio al 0.9% con 30 ng/ml de endotoxina para una concentración final de 5 ng/ml; además de la adición de 500 µl de solución de cloruro de sodio al 0.9% con 6 ng/ml de IL-10 humana recombinante para una concentración final de 1 ng/ml o 500 µl de solución de cloruro de sodio al 0.9% con 60 ng/ml de IL-10 humana recombinante para una concentración final de 10 ng/ml, 0.5 horas antes y 0.5 horas después de la endotoxina. Los tubos son incubados durante 2 y 6 horas a 37° C en una mecedora de tubos. Después de las 2 y 6 horas, se agregan 250 µl de una solución con 0.1 M de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y 10 µM de meclofenamato a cada tubo de sangre heparinizada, los tubos se centrifugan a 400×g durante 10 minutos, el plasma se decanta y almacena a -70° C para ser evaluado posteriormente. Todos los ensayos se realizarán por triplicado.

## 3. Determinación de citocinas por ELISA

Con base en evidencias experimentales de reacción cruzada de anticuerpos dirigidos contra TNF-α e IL-1β humanos para detectar las mismas citocinas equinas,<sup>110 111 112</sup> se realizarán determinaciones en el plasma utilizando anticuerpos policlonales (Sigma Chemical Co, St, Louis, Mo) para la determinación de IL-1β y TNF-α humanas, de acuerdo con la metodología previamente descrita.

# III. Efecto de la IL-10 y el THF-γ2 sobre la activación linfocitaria *in vitro*.

## 1. Aislamiento de linfocitos

Los linfocitos son aislados a partir de cada una de las muestras de sangre utilizadas en el experimento anterior. Se utiliza la misma metodología indicada para el aislamiento de monocitos, solo que las células colectadas son las no adherentes. Las células no adheridas son removidas con tres lavados de solución salina amortiguada con fosfato. Para determinar la pureza de linfocitos sanguíneos periféricos se evalúan mediante tinción diferencial (morfológica) y prueba de exclusión de azul de tripán para determinar viabilidad.

## 2. Prueba de activación linfocitaria

La concentración de células se ajusta a  $1.25 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 conteniendo 100 UJ/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 0.5 mg/ml de anfotericina B y suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor (56° C, 30 min). Se transfieren 80 µl de esta suspensión a cada pozo de una placa de microcultivo de 96 pozos con fondo plano y se agregan 10 µl de medio de cultivo con 45 ng/ml de THF-γ2

(concentración final de 5 ng/ml) y se incuban durante 18 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se agregan 10µl de medio de cultivo conteniendo 25µg/ml de Con A (concentración final de 2.5 µg/ml) y se incuban por 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La prueba se realizará por sextuplicado, para obtener tres mediciones por el método colorimétrico con la sal de tetrazolio MTT y tres por citometría de flujo.

### 3. Determinación de la proliferación linfocitaria

a) Se utilizará el método colorimétrico con la sal de tetrazolio: bromuro 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) modificado por Tada *et al.*,<sup>115</sup> donde se demostró que los resultados obtenidos con esta prueba son casi idénticos a los obtenidos mediante la incorporación de timidina tritiada ([<sup>3</sup>H]TdR); con la ventaja de no requerir de material radioactivo. Consiste en el siguiente procedimiento: se disuelve el MTT en una concentración de 5 mg/ml en PBS, se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C en un envase oscuro (solución MTT), la cual es estable por meses. Se agregan 20 µl de la solución de MTT a cada pozo. Después de cultivar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 4.5 horas, se agregan 100 µl de SDS 10%-HCl 0.01 N a cada pozo y se incuban las placas durante toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, la lectura se realiza en un espectrofotómetro o lector de placas midiendo la absorbancia a 590 nm. Se elabora un estándar midiendo la absorbancia de concentraciones crecientes de linfocitos para interpolar los resultados obtenidos de la muestra problema.

b) También se realizarán análisis de citometría de flujo (FACS) para dos colores, empleando anticuerpos monoclonales específicos para el CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> equinos (VMRD, Inc, Pullman, WA) marcados con ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los linfocitos cultivados se lavan dos veces con PBS conteniendo 1% de FCS, son resuspendidos en una solución amortiguadora de PBS (pH. 7.2) con glucosa 20 mM y 5% de suero de rata y se ajustan a 1×10<sup>6</sup> células/ml. Se diluyen 5µl del conjugado anti-CD4 y anti-CD8 en 45µl de la suspensión de células en PBS y se tiñen incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente cubriendo los tubos con papel aluminio o manteniéndolos en la oscuridad. Se utiliza un control de autofluorescencia con células sin agregar los conjugados y un control de isotipo IgG1 murino inespecífico para moléculas de células equinas. Se colocan en 1 ml de amortiguador diluyente que contiene PBS (pH 7.2) con glucosa 20 mM y 0.5% de BSA y se centrifugan dos veces a 1000 rpm, y se descarta el sobrenadante. Las células se fijan al resuspenderlas en 0.25 ml de formaldehído o paraformaldehído al 2% en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizan las lecturas en el citómetro de flujo.

## V. DISEÑO EXPERIMENTAL.

### I. Efecto de la interleucina-10 sobre la síntesis *in vitro* de mediadores inflamatorios inducida por lipopolisacárido en monocitos sanguíneos periféricos equinos.

Comprende un experimento de acuerdo con un diseño factorial, considerando como variables independientes al LPS, IL-10, tiempo de adición de la rhIL-10 (preincubación, comcubación o posincubación), y como variables dependientes la expresión de los mediadores IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-10 a nivel transcripcional y nivel de proteína en el sobrenadante. Las variables independientes presentan distintos niveles, el LPS tiene concentraciones finales de 0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , la rhIL-10 de 1, 10, 100 ng/ml, y tres diferentes tiempos de adición de rhIL-10: -2, 0 y 2 horas con respecto al estímulo con LPS; conformando un diseño factorial  $2 \times 3 \times 3$ . Las mediciones de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes (proteína) y de IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$  en células (mRNA) se realizan de acuerdo a los siguientes tiempos 0, 0.5, 2 y 6 horas (IL-10: -2 h); 0.5, 2 y 6 horas (IL-10: 0 h), y 2, 4 y 6 horas (IL-10: 2 h). Se consideran varios controles: un control negativo sin LPS y rhIL-10, uno con LPS sin rhIL-10 (control positivo) y otro con rhIL-10 sin LPS (control de rhIL-10); con los distintos niveles mencionados para cada variable. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

### II. Efectos de la interleucina-10 en un modelo *in vitro* de endotoxemia con sangre completa equina.

Consiste en un diseño experimental factorial teniendo como variables independientes al LPS, IL-10 y el tiempo en que se adiciona la rhIL-10, y como variable dependiente el nivel de IL-1 y TNF- $\alpha$  en el plasma. Las variables independientes presentan distintos niveles, el LPS presenta concentraciones finales de 1 y 5 ng/ml; la rhIL-10 concentraciones finales de 1 y 10 ng/ml, y el inicio de la incubación con rhIL-10 es 0.5 horas antes y 0.5 horas después de la endotoxina (preincubación o posincubación); constituyendo un diseño factorial  $2 \times 2 \times 2$ . Las mediciones de los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  mediante ELISA se realizan 2 y 6 horas después del estímulo con LPS. Se incluyen varios controles: un control de solución de cloruro de sodio al 0.9% (control negativo), uno con LPS sin rhIL-10 (control positivo) y otro con rhIL-10 sin LPS (control de rhIL-10); de acuerdo con los niveles para cada variable. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

### III. Efecto de la IL-10 y el THF- $\gamma$ 2 sobre la activación linfocitaria *in vitro*.

Debido a que los linfocitos utilizados en este experimento son aislados a partir de cada una de las muestras de sangre utilizadas en el experimento anterior, se considera parcialmente el diseño factorial utilizado en dicho experimento; tomando las mismas variables independientes y agregando además al THF- $\gamma$ 2, y como variable dependiente se considera en este caso a la proliferación linfocitaria producida por el mitógeno. El THF- $\gamma$ 2 comprende un nivel dado por la concentración final de 5 ng/ml en el cultivo de linfocitos. El diseño factorial de este experimento corresponde a uno  $2 \times 2 \times 2 \times 1$ . Después del periodo de

incubación determinado en la parte metodológica se realizan las mediciones con el método de MTT para proliferación linfocitaria y estudios de citometría de flujo para determinar cambios en las subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+ CD8^-$  y  $CD4^- CD8^+$ . La prueba de activación linfocitaria se realiza por sextuplicado, y las mediciones se realizan tres con el método de MTT y tres con citometría de flujo.

## VI. LITERATURA CITADA.

- 1 May SA, Spiers S, Carter SD, Bennett D, Edwards GB. Identification of tumor necrosis factor in the blood and peritoneal fluid of horse with colic. *Equine Vet J Suppl* 1992;13:19-21.
- 2 Barton MH, Collatos C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J Vet Intern Med* 1999;13:457-464
- 3 Henry MM, Moore JN. Clinical relevance of monocyte procoagulant activity in horses with colic. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:843-848.
- 4 Morris DD. Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J Vet Intern Med* 1991;5:167-181.
- 5 Green EM, Adams HR. New perspectives in circulatory shock: pathophysiologic mediators of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:1834-1841.
- 6 Berg DJ, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Menon S, Davidson N, Grünig G, Rennick D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 1995;96:2339-2347
- 7 Morris DD, Crowe N, Moore JN. Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res* 1990;51:1935-1940.
- 8 Valadao CAA, Peiro JR, Santana AE, Bechara GH. Evaluation of peritoneal fluid horses with experimental endotoxemia. *J Equine Vet Sci* 1995;15:124-128.
- 9 Lavoie JP, Madigan JE, Cullor JS, Powell WE. Haemodynamic, pathological, haematological and behavioral changes during endotoxin infusion in equine neonates. *Equine Vet J* 1990;22:23-29.
- 10 Morris DD. The role of tumour necrosis factor in the pathogenesis of equine colic. *Equine Vet J Suppl* 1992;13:10-15.
- 11 MacKay RJ, Merritt AM, Zertuche J-M, Whittington M, Skelley LA. Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. *Am J Vet Res* 1991;52:533-538
- 12 Allen GK, Green EM, Robinson JA, Garner HE, Loch WE, Walsh DM. Serum tumor necrosis factor alpha concentrations and clinical abnormalities in colostrum-fed and colostrum-deprived neonatal foals given endotoxin. *Am J Vet Res* 1993;54:1404-1410
- 13 Morris DD, Moore JN. Tumor necrosis factor activity in serum from neonatal foals with presumed septicemia. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1584-1589.
- 14 Brandtzaeg P, Osnes L, Øvstebo R, Joo GB, Westvik A-B, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: Identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 1996;184:51-60.
- 15 van der Poll T, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keotgh CV, Lazarus DD, Nguyen L, Goldman M, Moldawer LL, Lowry SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol* 1995;155:5397-5401.
- 16 Standiford TJ, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1995;155:2222-2229.

- 17 Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gérard C, Delvaux A, De Groote D, Abramowicz D, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 controls interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994;24:1167-1171.
- 18 Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, Fedorak RN, Kubes P. Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. *Circ Res* 1998;83:1124-1131.
- 19 Bussolati B, Mariano F, Montrucchio G, Piccoli G, Camussi G. Modulatory effect on interleukin-10 on the production of platelet-activating factor and superoxide anions by human leucocytes. *Immunology* 1997;90:440-447.
20. Marchant A, Amraoui Z, Gueydan C, Bruyns C, Le Moine O, Vandenabeele P, Fiers W, Buurman WA, Goldman M. Methylprednisolone differentially regulates IL-10 and tumour necrosis factor (TNF) production during murine endotoxaemia. *Clin Exp Immunol* 1996;106:91-96.
21. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220.
- 22 van der Poll T, Jansen J, Levi M, ten Cate H, ten Cate JW, van Deventer JH. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J Exp Med* 1994;180:1985-1988.
23. Chensue SW, Ruth JH, Warmington K, Lincoln P, Kunkel SL. In vivo regulation of macrophage IL-12 production during type 1 and type 2 cytokine-mediated granuloma formation. *J Immunol* 1995;155:3546-3551.
24. Khatri VP, Fehniger TA, Baiocchi RA, Yu F, Shah MH, Schiller DS, Gould M, Gazzinelli RT, Bernstein ZP, Caligiuri MA. Ultra low dose interleukin-2 therapy promotes a type 1 cytokine profile in vivo in patients with AIDS and AIDS-associated malignancies. *J Clin Invest* 1998;101:1373-1378.
- 25 Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourrier BM, Galanaud P, Emilie D. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994;37:1647-1655.
- 26 Gienl RS, Umetsu DT, DeKruyff RH. Lyl (CD5<sup>+</sup>) B cells produce interleukin (IL)-10. *Cell Immunol* 1997;175:164-170.
- 27 Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 $\alpha$  and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 1995;155:1079-1090.
- 28 Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 1994;152:2720-2728.
29. Marshall JS, Leal-Berumen Y, Nielsen L, Glibetic M, Jordana M. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. *J Clin Invest* 1996;97:1122-1128.

- 30 Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-3822.
- 31 Liu Y, Wei SH-Y, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 1994;152:1821-1829
- 32 Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 1992;13:198-200
- 33 Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risk in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998;27:1497-1507.
- 34 Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1994;153:811-816.
- 35 Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanism for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-10. *J Biol Chem* 1992;267:23301-23308
- 36 Kambayashi T, Jacob CO, Strassmann G. IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes. *Cell Immunol* 1996;171:153-158
- 37 Chin J, Kostura MJ. Dissociation of IL-1 $\beta$  synthesis and secretion in human blood monocytes stimulated with bacterial cell wall products. *J Immunol* 1993;151:5574-5585
- 38 Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992;148:1143-1148.
- 39 Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 1994;152:2720-2728
- 40 Hashimoto S, Yamada M, Motoyoshi K, Akagawa KS. Enhancement of macrophage colony-stimulating factor-induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin-10. *Blood* 1997;89:315-321.
- 41 Ho M, Sexton MM, Tongtawe P, Looareesuwan S, Suntharasamai P, Webster HK. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor production but not antigen-specific lymphoproliferation in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1995;172:838-844
- 42 Jacobs F, Chaussabel D, Truyens C, Leclercq V, Carlier Y, Goldman M, Vray B. IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages: improved control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Exp Immunol* 1998;113:59-64
- 43 Tebo JM, Kim HS, Gao J, Armstrong DA, Hamilton TA. Interleukin-10 suppresses IP-10 gene transcription by inhibiting the production of class I interferon. *Blood* 1998;92:4742-4749
- 44 Lindner H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schregermann M, Klauke I, Schultz-Hector S, Eissner G. Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. *Blood* 1997;89:1931-1938.
- 45 Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ, Finlay-Jones JJ. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocyte and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 1996;157:3672-3680.

- 46 Berkman N, John M, Roeseams G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF. Inhibition of macrophage inflammatory protein- $\alpha$  expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1995;155:4412-4418.
- 47 Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF Jr, Donnelly RP. Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 1997; 90:4162-4171.
- 48 Willems F, Marchant A, Delville J-P, Gérard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 1994;24:1007-1009.
- 49 Eissner G, Lindner H, Behrends U, Kölch W, Hicke A, Klauke Y, Bornkamm GW, Holler E. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo. Protective role of IL-10. *Transplantation* 1996;62:819-827.
- 50 Armstrong L, Jordan N, Millar A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 1996;51:143-149.
- 51 Trecicchio WL, Bozza M, Pednault G, Dorner AJ. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* 1996;157:3627-3634.
- 52 Thomassen MJ, Divis LT, Fisher CJ. Regulation of human alveolar macrophage inflammatory cytokine production by interleukin-10. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:321-324.
- 53 Hawkins DL, MacKay RJ, MacKay SLD, Moldawer LL. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediators by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66:1-10.
- 54 Levitz SM, Tabuni A, Nong SH, Golenbock DT. Effects of interleukin-10 on human peripheral blood mononuclear cell responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1996;64:945-951.
- 55 Pradier O, Gérard C, Delvaux A, Lybin M, Abramowicz D, Capel P, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 1993;23:2700-2703.
- 56 Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 $\beta$  in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993;178:2207-2211.
- 57 Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993;177:1205-1208.
- 58 Gérard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenaebelle P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993;177:547-550.
- 59 van der Poll T, Jansen PM, Montegut WT, Braxton CC, Calvano SE, Stackpole SA, Smith SR, Swanson SW, Hack CE, Lowry SF, Moldawer LL. Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia. *J Immunol* 1997;158:1971-1975.

60. Pajkrt D, Camoglio L, Tiel-van Buul MCM, de Bruin K, Cutler DL, Affrime MB, Rikken G, van der Poll T, ten Cate JW, van Deventer SJH. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia. Effect of timing of recombinant human IL-10 administration. *J Immunol* 1997;158:3971-3977
61. Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Mateo FM, Sidoni A, Mighorati G, Morelli A. Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 1996;111:736-744.
62. Louis H, Le Moine O, Peny MO, Gulbis B, Nisol F, Goldman M, Devière J. Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 1997;112:935-942
63. Smith SR, Terminelli C, Denhardt G, Narula S, Thorbecke J. Administration of interleukin-10 at the time of priming protects *Corynebacterium parvum*-primed mice against LPS- and TNF- $\alpha$ -induced lethality. *Cell Immunol* 1996;173:207-214.
64. Røyg MA, Auffenberg T, Espat NJ, Phillip R, Remick D, Wollenberg GK, Copeland EM III, Moldawer LL. Human tumor necrosis factor receptor (p55) and interleukin 10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia and also attenuates local inflammatory responses. *J Exp Med* 1995;181:2289-2293.
65. Drazan KE, Wu L, Bullington D, Shaked A. Viral IL-10 gene therapy inhibits TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , not IL-6 in the newborn endotoxemic mouse. *J Pediatr Surg* 1996;31:411-414
66. Remick DG, Garg SJ, Newcomb DE, Wollenberg G, Hue TK, Bolgos GL. Exogenous interleukin-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. *Crit Care Med* 1998;26:895-904.
67. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR, Wiener-Kronish JP. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104:743-750
68. Pajkrt D, van der Poll T, Levi M, Cutler DL, Affrime MB, van den Ende A, ten Cate JW, van Deventer SJH. Interleukin-10 inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood* 1997a;89:2701-2705.
69. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995;154:5492-5499.
70. Huhn RD, Radwanski E, Gallo J, Affrime MB, Sabo R, Gonyo G, Monge A, Cutler DL. Pharmacodynamics of subcutaneous recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:171-180.
71. Dinarello CA, Rosenwasser LJ, Wolff SM. Demonstration of a circulating suppressor factor of thymocyte proliferation during endotoxin fever in humans. *J Immunol* 1981;127:2517-2519.
72. Junger WG, Hoyt DB, Liu FC, Loomis WH, Coimbra R. Immunosuppression after endotoxin shock: the result of multiple anti-inflammatory factors. *J Trauma* 1996;40:702-709.
73. Steinhilber ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 1999;162:392-399.

74 Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor  $\alpha$  required as a costimulatory factor for interferon  $\gamma$ -induced activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8676-8680

75 Fleming SD, Campbell PA. Macrophages have cell surface IL-10 that regulates macrophage bactericidal activity. *J Immunol* 1996;156:1143-1150.

76 Stieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol* 1993;150:5501-5510

77 Mahanty S, Mollis SN, Ravichandran M, Abrams JS, Kumaraswami V, Jayaraman K, Ottens EA, Nutman TB. High levels of spontaneous and parasite antigen-driven interleukin-10 production are associated with antigen-specific hyporesponsiveness in human lymphatic filariasis. *J Infect Dis* 1996;173:769-773

78 Ganapamo F, Rutti B, Brossard M. Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the *in vitro* responsiveness of lymphocytes to mitogens. *Immunology* 1996;87:259-263.

79 Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo M-G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1996;184:19-29.

80 Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, Sarukhan A. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med* 1998;187:177-183.

81 Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo M-G. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 1998;160:3188-3193.

82 Marcelletti JF. IL-10 inhibits lipopolysaccharide-induced murine B cell proliferation and cross-linking of surface antigen receptors or ligation of CD40 restores the response. *J Immunol* 1996;157:3323-3333.

83 Hadden JW. Immunostimulants. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:169-174

84 Ben-Efraim S, Keisari Y, Ophur R, Pecht M, Trainin N, Burstein Y. Immunopotentiating and immunotherapeutic effects of thymic hormones and factors with special emphasis on thymic humoral factor THF- $\gamma$ 2. *Crit Rev Immunol* 1999;19:261-284

85 Burstein Y, Buchner V, Pecht M, Trainin N. Thymic humoral factor  $\gamma$ 2: purification and amino acid sequence of an immunoregulatory peptide from calf thymus. *Biochemistry* 1988;27:4066-4071.

86 Abiko T, Sekino H. Syntheses and immunological effects of thymic humoral factor- $\gamma$ 2 and its Phe<sup>7</sup>-substituted analogues. *Biotechnol Appl Biochem* 1994;19:355-360

87 Schuster R, Traub-Dargatz J, Baxter G. Survey of diplomates of the American College of Veterinary Internal Medicine and the American College of Veterinary Surgeons regarding clinical aspects and treatment of endotoxemia in horses. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210:87-92.

88 Cargile JL, MacKay RJ, Dankert JR, Skelley L. Effect of treatment with a monoclonal antibody against equine tumor necrosis factor (TNF) on clinical, hematologic, and circulating TNF responses of Miniature Horses given endotoxin. *Am J Vet Res* 1995;56:1451-1459

- 89 Cargile JL, MacKay RJ, Dankert JR, Skelley L. Effects of tumor necrosis factor blockade on interleukin 6, lactate, thromboxane, and prostacyclin responses in Miniature Horses given endotoxin. *Am J Vet Res* 1995;56:1445-1450.
- 90 Barton MH, Moore JN. Pentoxifylline inhibits mediator synthesis in an equine *in vitro* whole blood model of endotoxemia. *Circ Shock* 1994;44:216-220.
- 91 Barton MH, Ferguson D, Davis PJ, Moore JN. The effects of pentoxifylline infusion on plasma 6-keto-prostaglandin F<sub>1a</sub> and *ex vivo* endotoxin-induced tumor necrosis factor activity in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 1997;20:487-492.
- 92 Barton MH, Moore JN, Norton N. Effects of pentoxifylline infusion on response of horses to *in vivo* challenge exposure with endotoxin. *Am J Vet Res* 1997;58:1300-1307.
- 93 Baskett A, Barton MH, Norton N, Anders B, Moore JN. Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *Am J Vet Res* 1997;58:1291-1299.
- 94 Morris DD, Henry MM, Moore JN, Fischer K. Effect of dietary linoleic acid on endotoxin-induced thromboxane and prostacyclin production by equine peritoneal macrophages. *Circ Shock* 1989;29:311-318.
- 95 Spier SJ, Lavote JP, Cullor JS, Smith BP, Snyder JR, Sischo, WM. Protection against clinical endotoxemia in horses by using plasma containing antibody to an R<sub>c</sub> mutant *E. Coli* (J5). *Circ Shock* 1989;28:235-248.
- 96 Carnick JB, Morris DD, Moore JN. Administration of a receptor antagonist for platelet-activating factor during equine endotoxaemia. *Equine Vet J* 1993;25:152-157.
- 97 Durando MM, MacKay RJ, Linda S, Skelley LA. Effects of polymyxin B and *Salmonella typhimurium* antiserum on horses given endotoxin intravenously. *Am J Vet Res* 1994;55:921-927.
- 98 Longworth KE, Smith BL, Staub NC, Steffey EP, Serikov VB. Use of detergent to prevent initial responses to endotoxin in horses. *Am J Vet Res* 1996;57:1063-1066.
- 99 Harkins JD, Carney JM, Meier M, Leak SC, Tobin T. Effect of  $\alpha$ -phenyl-tert-butyl nitron on endotoxin toxemia in horses. *Vet Hum Toxicol* 1997;39:268-271.
- 100 Kühn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274.
- 101 May SA, Hooke RE, Lees P. Isolation of equine peripheral blood mononuclear cells using Percoll. *Res Vet Sci* 1991;50:116-117.
- 102 Jackman BR, Moore JN, Barton MH, Morris DD. Comparison of the effects of ketoprofen and flunixin meglumine on the *in vitro* response of equine peripheral blood monocytes to bacterial endotoxin. *Can J Vet Res* 1994;58:138-143.
103. Xie WQ, Rothblum LI. Rapid, small-scale RNA isolation from tissue culture cells. *Biotechniques* 1991;11:324-327.
104. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

105. Alard P, Lantz O, Sebah M, Calvo CF, Weill D, Chavanel G, Senik A, Charpentier B. A versatile ELISA-PCR assay for mRNA quantitation from a few cells. *Biotechniques* 1993;15:730-737.
106. Landgraf A, Reckmann B, Pingoud A. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal Biochem* 1991;198:86-91.
107. Kato H, Youn H-Y, Ohashi T, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A. Identification of an alternatively spliced transcript of equine interleukin-1 $\beta$ . *Gene* 1996;177:11-16.
108. Swiderski CE, Klei TR, Horohov DW. Quantitative measurement of equine cytokine mRNA expression by polymerase chain reaction using target-specific standard curves. *J Immunol Methods* 1999;222:155-169.
109. Grünig G, Antczak DF. Horse trophoblasts produce tumor necrosis factor  $\alpha$  but not interleukin 2, interleukin 4, or interferon  $\gamma$ . *Biol Reprod* 1995;52:531-539.
110. MacKay RJ, Socher SH. Anti-equine tumor necrosis factor (TNF) activity of antisera raised against human TNF- $\alpha$  and peptide segments of human TNF- $\alpha$ . *Am J Vet Res* 1992;53:921-924.
111. Pauli U, Bertoni G, Duerr M, Peterhans E. A bioassay for the detection of tumor necrosis factor from eight different species. evaluation of neutralization rates of a monoclonal antibody against human TNF- $\alpha$ . *J Immunol Methods* 1994;171:263-265.
112. Todhunter PG, Kincaid SA, Todhunter RJ, Kammermann JR, Johnstone B, Baird AN, Hanson RR, Wright JM, Lin H-C, Purohit RC. Immunohistochemical analysis of an equine model of synovitis-induced arthritis. *Am J Vet Res* 1996;57:1080-1093.
113. Barton MH, Moore JN. Pentoxifylline inhibits mediator synthesis in an equine in vitro whole blood model of endotoxemia. *Circ Shock* 1994;44:216-220.
114. Barton MH, Ferguson D, Davis PJ, Moore JN. The effects of pentoxifylline infusion on plasma 6-keto-prostaglandin F $_{1\alpha}$  and ex vivo endotoxin-induced tumour necrosis factor activity in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 1997;20:487-492.
115. Tada H, Shiho O, Kuroshima K-I, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986;93:157-165.