

#### **4.1.- ACTIVIDAD INMUNESTIMULANTE *IN VITRO* DE FR-91**

**Instituto Central de Investigación.  
Byoung-Don Han**

**Hanil Pharmaceutical Ind.Co.Ltd.Sungdong-Ku, Seoul, Korea**

##### **Objetivo**

Evaluación de la actividad inmunoestimulante del FR-91

##### **Método**

###### **1.- Respuesta de anticuerpos T-dependientes. *In vivo*** (Usando el ensayo de células formadoras de placa).

1.1.-Ratón inmunizado con 0,025-0,3 ml de FR-91.

1.2.-Ratón inmunizado con antígeno SRBC (Glóbulos rojos de oveja) y sacrificado por dislocación cervical y escisión del bazo.

1.3.-Después de 4 días las proteínas Ig conjugadas SRBC se mezclaron con linfocitos, entre los cuales están las células productoras de anticuerpos específicos y se incubaron en un medio soporte semisólido que permitiera la unión de los anticuerpos a la superficie de los eritrocitos.

1.4- Adición de complemento con especificidad frente a anticuerpos conjugados a SRBC y su mezcla posterior

1.5- Medición de la zona de lisis clara (placas) por ensayo de activación de linfocitos B

###### **2.- Activación de células B. *In Vitro***

(Usando ensayo de células formadoras de placas)

1.- Una serie de diluciones de muestras de FR-91 fueron añadidas a los esplenocitos, con una concentración final del 100:1 (1%) al 10.000:1 (0.01%).

2.- El nivel de anticuerpos T-dependiente fue medido después del tratamiento *in Vitro*. Con o sin liposacáridos usando el ensayo de células formadoras de placas.

###### **3.- Activación *In Vitro* de células T**

Usando la Reacción Mixta de Linfocitos

Linfocitos de dos diferentes cepas consanguíneas son cultivados juntos. Las células comienzan a proliferar en respuesta a diferentes antígenos sobre los linfocitos alogénicos. La intensidad de esta reacción mixta linfocitaria MLR puede ser cuantificada por la adición al medio de tiritimidina marcada. Cuando las células proliferaron, la timidina radioactiva es incorporada al DNA de las células hijas. El alcance de la proliferación puede ser determinado por el cultivo de las células, su lisis y

la medición de la cantidad de timidina radioactiva incorporada al DNA, que es directamente proporcional al nivel de proliferación celular.

- 1.- Linfocitos de dos diferentes células consanguíneas fueron mezclados en microplacas.
- 2.- Diluciones seriadas de muestras de FR-91 (de 100:1 a 10000:1) fueron añadidas a las microplacas respectivamente.
- 3.- Después del cultivo durante 4 días tiritimidina marcada. Se añadió a la mezcla.
- 4.- Tras el cultivo durante 18-24 horas, las células procedentes de los cultivos en microplacas, fueron recogidas en tiras de papel de filtro.
- 5.- Se recontó la tiritimidina marcada incorporada al DNA.

#### **4.- Blastogénesis de células T**

- 1.- Diluciones seriadas de muestras de FR-91 fueron añadidas a esplenocitos, con una concentración final 100:1(1%) a 10000:1 (0,01%)
- 2.- Respectivamente las microplacas fueron tratadas con liposacáridos, mitógeno phytolacca, fitohemaglutinina y concavalina A como mitógenos estándar a una concentración de 1 µg/pocillo.
- 3.- Se midió el nivel de proliferación de células B y T por el ensayo de consumo de tiritimidina marcada.

## **Resultado**

### **1.- Efecto sobre la respuesta de anticuerpos T-dependiente *In vivo*-Fig.1**

#### **(Usando el ensayo de células formadoras de placas)**

FR-91 incrementó el número de anticuerpos T-dependientes produciendo células dosis-dependientes en ratones inmunizados con eritrocitos de oveja. De acuerdo con este resultado, FR-91 es efectivo sobre el sistema inmune *in vivo* en relación con muchas clases de linfocitos.

### **2.- Activación de células B *in Vitro*-Fig 2**

#### **(Usando el ensayo de Células formadoras de placas)**

Cuando los esplenocitos fueron tratados con o sin liposacáridos junto con FR-91 no se incrementó la proliferación de células B. No hubo efecto del FR-91 sobre la proliferación y activación de células B.

### **3.-Activación de células T *in Vitro*- Fig 3**

#### **(Usando el ensayo de Reacción Mixta Linfocitaria)**

FR-91 incrementó claramente la proliferación de células T en base al ensayo Reacción Mixta Linfocitaria (MLR)

#### **4.- Blastogénesis de Células T-Fig 4**

- 1.- FR-91 incrementó intensivamente la inmunidad de los esplenocitos sin ningún mitógeno.
- 2.- No hay sinergismo con liposacárido, el cual es mitógeno B-celular
- 3.- Hay un ligero incremento del efecto sinérgico con el mitógeno phytoacca, el cual es un mitógeno común T y B a altas concentraciones.
- 4.-Hay efecto sinérgico con concavalina A, que es mitógeno T-celular
- 5.-Hay un elevado sinergismo con fitohemaglutinina, que es mitógeno T-celular

Por consiguiente, FR-91 funciona como mitógeno por si mismo y tiene efecto sinérgico con los mitógenos T-celulares pero no con los B celulares. Por tanto, FR-91 tiene un efecto estimulante sobre las células T pero no sobre las células B.

#### **Conclusiones**

FR-91 tiene efecto sobre la proliferación y activación de las células T pero no tiene efecto sobre las células B