

Las β -(1→3)-glucanas: moléculas inmunomoduladoras contaminantes de productos farmacéuticos

β -(1→3)-glucans as immunomodulating moléculas polluting pharmaceuticals

MSc. Zenia Pardo Ruiz, Lic. Rolando Perdomo Morales

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando la base de datos Pubmed con énfasis en los artículos publicados en la última década. Como descriptores se utilizaron los siguientes: glucans, glucans recognition, glucans biological activitiy, glucans pharmaceuticals. Con la información disponible se realizó un análisis de los principales aspectos relacionados con el tema, que se exponen en el presente trabajo. Las β -(1→3)-glucanas son polímeros de glucosa que se encuentran mayoritariamente en la pared celular de hongos, levaduras y plantas. Se consideran patrones moleculares asociados a patógenos y son reconocidas por varios receptores, siendo la dectina-1 el principal receptor de reconocimiento de estas estructuras. Sus propiedades inmunomoduladoras han sido informadas por varios autores. Se ha demostrado que potencian y sinergizan la acción de ligandos de Toll like receptors sobre la liberación de citoquinas proinflamatorias, aunque también han mostrado un perfil antiinflamatorio, cuestión que depende en gran medida de sus características estructurales. Las β -(1→3)-glucanas son contaminantes importantes provenientes de los filtros de acetato de celulosa que se utilizan en la clarificación de parenterales hemoderivados, por tanto, es necesario estudiar las consecuencias de la presencia de estas moléculas inmunomoduladoras en inyectables. En esta revisión se resumen aspectos relacionados con el reconocimiento y actividad biológica de las β -(1→3)-glucanas y se profundiza en estudios relacionados con su presencia en hemoderivados como principal contaminante. Finalmente se destaca la utilidad de la Prueba de Activación de Monocitos en la detección de las β -(1→3)-glucanas en parenterales.

Palabras clave: β -(1→3)-glucanas, patrones moleculares asociados a patógenos, hemoderivados.

ABSTRACT

A literature review was made in Pubmed database, making emphasis on papers published in the last decade. The subject headings for this search were glucans, glucans recognition, glucans biological activity, glucans pharmaceuticals. On the basis of the available information, the main aspects related to this topic were analyzed and shown in this paper. β -(1 \rightarrow 3)-glucans are glucose-derived polymers found mainly in the cellular wall of fungi, yeasts and plants. They are considered pathogen-associated molecular patterns that are recognized by several receptors, being dectin-1 the key recognition receptor of these structures. Some authors have underlined their immunomodulating properties. It has been demonstrated that they synergize and potentiate the actions of Toll-like receptor ligands on the release of proinflammatory cytokines, though β -(1 \rightarrow 3)-glucans have shown an antiinflammatory profile which greatly depends on their structural characteristics. β -(1 \rightarrow 3)-glucans are important pollutants stemming from cellulose depth filters used in clarification process of parenteral blood derivatives. For this reason, it is necessary to study the consequences of their presence in parenterals. This review summarized the main aspects related with the recognition and biological activities of β -(1 \rightarrow 3)-glucans as well as it delved into studies on their presence in blood derivatives as main pollutant. Finally, the paper underlined the role of Monocyte Activation Test to detect β -(1 \rightarrow 3)-glucans in parenterals.

Key words: β -(1 \rightarrow 3)-glucans, pathogen-associated molecular patterns, blood-derived products.

INTRODUCCIÓN

Las β -glucanas son un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa constituidos por un esqueleto de unidades de β -(1 \rightarrow 3)-D-glucopiranosil con cadenas laterales unidas en posición β -(1 \rightarrow 6) de longitud y distribución variables. Estos polisacáridos son los constituyentes estructurales mayoritarios de la pared celular de los hongos y levaduras, aunque pueden también encontrarse en plantas y algunas bacterias.¹

Estas estructuras se consideran patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)² y son reconocidas de manera diferente por el sistema inmune innato de vertebrados e invertebrados. En invertebrados el reconocimiento de β -glucanas ocurre en la hemolinfa por proteínas reconocedoras (BGBP, de beta-glucan binding protein) o el factor G en el cangrejo herradura.¹ En vertebrados la opsonización por el sistema del complemento contribuye al reconocimiento de glucanas particuladas; sin embargo no se ha encontrado ninguna proteína plasmática que las reconozca. En cambio, el reconocimiento de las β -glucanas solubles en vertebrados ocurre a través de receptores celulares específicos que se han identificado tanto en células inmunes como no inmunes, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células de Langerhans, eosinófilos, células "natural killers" (NK) o asesinas naturales, células endoteliales, células del epitelio alveolar y fibroblastos.¹

Para estos polisacáridos de naturaleza compleja se han reconocido una serie de receptores que intervienen en su reconocimiento. En este artículo se enfatizará en la naturaleza compleja de estos polisacáridos, así como en el papel de varios receptores en la coestimulación por β -(1 \rightarrow 3)-glucanas de la producción de citoquinas inducida por "Toll like receptors" (TLR), cuestión que aún no está bien establecida y que debe seguirse estudiando profundamente.

Se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando la base de datos Pubmed enfatizando en los artículos publicados en la última década. Como descriptores se utilizaron los siguientes: glucans, glucans recognition, glucans biological activitiy, glucans pharmaceuticals. Con la información disponible se realizó un análisis de los principales aspectos relacionados con el tema, que se exponen en el presente trabajo.

El número de β -glucanas individuales es casi tan grande como el número de fuentes y métodos usados para su purificación. Las diferencias estructurales encontradas en ellas, con las consecuentes diferencias físico-químicas que poseen en cuanto a solubilidad, estructura primaria, peso molecular, grado de ramificación, grado de polimerización y carga del polímero, influyen en la variabilidad de actividades biológicas informadas.³ A estos polisacáridos se le han atribuido propiedades inmunomoduladoras importantes y contradictorias, muchas de ellas se discutirán a lo largo de esta revisión. También se abordarán aspectos relacionados con los diferentes receptores que intervienen en su reconocimiento. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares que soportan sus actividades biológicas ayudará a resolver las contradicciones que en ocasiones se encuentran en la literatura.

Es importante tener en cuenta que los medicamentos parenterales, en los que se utilizan filtros derivados de acetato de celulosa en el proceso de clarificación, pueden contener como contaminantes glucanas derivadas de estos.⁴⁻⁸ Por esta razón este artículo pretende presentar y discutir aspectos relacionados con el reconocimiento y actividad biológica de las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas y profundizar en estudios relacionados con su presencia en hemoderivados como principal contaminante.

RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE β -GLUCANAS

Entre los receptores involucrados en el reconocimiento de β -glucanas se encuentran fundamentalmente la lactosilceramida, receptores del complemento (CR) 3, receptores "scavengers" y dectina-1. Se piensa que el reconocimiento celular pueda estar mediado por una combinación de estos, pero se ha demostrado que dectina-1 es el principal receptor para β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 6)-glucanas solubles y particuladas en leucocitos y macrófagos, además de que contribuye al reconocimiento de partículas de glucanas opsonizadas.⁹⁻¹¹

Desde el punto de vista estructural el receptor dectina-1 es una glicoproteína transmembrana tipo II que posee un dominio de reconocimiento de carbohidratos tipo C (CRD) no clásico y una cola citoplasmática que posee un motivo de activación basado en el inmunorreceptor tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés).¹² Los mecanismos de reconocimiento de carbohidratos por el CRD aún no se encuentran bien establecidos. Este receptor se expresa predominantemente en monocitos, macrófagos y neutrófilos y su expresión está muy influenciada por citoquinas y agentes antimicrobianos.^{13,14} Dectina-1 media una serie de respuestas a β -glucanas como la fagocitosis, endocitosis y el exabrupto oxidativo además de que, en colaboración con TLR, puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias y quimoquinas.¹⁵

Por otra parte, los receptores "scavengers" comprometen un grupo heterogéneo de moléculas que reconocen lipoproteínas de baja densidad modificadas, ligandos polianiónicos y una gran variedad de microorganismos. Se ha reportado que pueden reconocer la estructura básica de las β -glucanas, pero la afinidad del receptor por esos carbohidratos depende mucho de la carga del polímero. Este receptor se expresa en células mieloides y algunas endoteliales y está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis y en la inmunidad.^{16,17}

El CR3, también conocido como CD11b/CD18, es otro receptor que se ha reconocido para β -glucanas. Este se expresa en células mieloides, células NK y linfocitos. Funciona como molécula de adhesión celular, así como receptor fagocítico para una amplia variedad de patógenos opsonizados o no, incluyendo hongos. Entre otros dominios, posee un sitio de unión a carbohidratos en el extremo C-terminal de su subunidad CD11b.¹⁸ Se ha demostrado que la fagocitosis de partículas de levadura es completamente dependiente de CR3, en este caso dectina-1 tiene una función menos importante.¹⁹

Por último se encuentra la lactosilceramida, un glicosfingolípido encontrado en muchos tipos celulares que consiste en un lípido hidrofóbico (ceramida) y un azúcar hidrofílico que forma microdominios en la membrana. La interacción de las β -glucanas con este receptor incrementa el exabrupto oxidativo e induce la activación del NF κ B con la consecuente producción de proteínas inflamatorias en macrófagos del epitelio alveolar.²⁰

PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS β -GLUCANAS

El reconocimiento de las β -glucanas en hongos intactos por sus receptores reviste una tremenda importancia tanto en el aclaramiento de estas estructuras como en el desencadenamiento de una apropiada respuesta inmune¹⁵. De hecho, se ha sugerido que los patógenos fúngicos pueden enmascarar sus β -glucanas para evitar el reconocimiento inmune.²¹

Como se ha mencionado con anterioridad, las β -glucanas, especialmente en forma particulada, pueden inducir respuestas inflamatorias y antimicrobianas a través de dectina-1 en conjunto con TLR. Muchas de estas respuestas, como la producción de TNF- α , son esenciales para el control de infecciones fúngicas. Otra citoquina antifúngica importante es la IL-12, esta se requiere para la inducción de interferón (IFN)- γ y polarizar la respuesta inmune hacia T_h1.¹⁵

Por lo tanto, las β -glucanas purificadas, por estimulación del sistema inmune, tienen efectos importantes en la resistencia a hongos, bacterias y otros patógenos, así como en la inhibición del desarrollo de tumores. No obstante, los informes en la literatura relacionados con las propiedades biológicas de estas estructuras son contradictorios e inconsistentes en ocasiones. Esto se debe a que la respuesta inmune es variable debido principalmente a la diversidad en cuanto al peso molecular y las propiedades estructurales de las β -glucanas.¹ Aunque aún no se encuentra completamente dilucidado, se conoce que las diferencias estructurales influyen en la forma en que los carbohidratos interactúan con sus receptores, particularmente con dectina-1, cuya identificación como receptor principal de reconocimiento de β -glucanas ha ayudado a entender los efectos de estos carbohidratos y a explicar las aparentes inconsistencias encontradas en la literatura.¹⁰

Se ha demostrado que las β -glucanas de alto peso molecular o las glucanas particuladas son capaces de activar directamente leucocitos, activar su fagocitosis y su actividad citotóxica y antimicrobiana, incluyendo la producción de citoquinas, quimoquinas y otros mediadores inflamatorios, así como de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.¹

Por otro lado, las glucanas de talla intermedia a baja, como glucan fosfato, son activas *in vivo* pero sus efectos sobre la célula aún no se han esclarecido totalmente. Algunos autores han establecido que no parecen activar leucocitos *in vitro*⁹. No obstante, hay evidencias de que pueden activar factores transcripcionales *in vitro* como el NF κ B e inducir la producción de un número limitado de citoquinas (fundamentalmente IL-8 e IL-6) y modular la respuesta inflamatoria por estimulación de la ruta de la fosfoinositol 3-quinasa.²² Se ha sugerido que la activación celular producida por estas glucanas aumenta la respuesta celular frente a estímulos secundarios como lipopolisacáridos (LPS) o bacterias intactas.^{23,24}

Engstad y otros informaron en el 2002 que una β -glucana soluble de 20 kDa proveniente de levadura modula y sobrerregula la función de los leucocitos. Esta glucana, sola y en combinación con LPS, aumentó la producción de TNF- α , IL-8 e IL-10, en tanto que no modificó la liberación de IL-6 inducida por LPS.²³ Contradictoriamente, otros autores han reportado que se suprime la producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a un estímulo secundario.²⁵

Posteriormente, Luhm y otros utilizaron glucan fosfato como modelo para elucidar los mecanismos moleculares y celulares en células inmunes humanas en presencia de LPS y la toxina TSST-1. Estos investigadores informaron que, a pesar de la activación de factores transcripcionales nucleares (NF κ B y NFIL-6 y NFAT) similar a la que ocurre con LPS o TSST-1, no se produce una producción significativa de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ inducida por esta glucana; pero sí se produce una liberación sustancial de IL-8 debido a la unión del NF κ B a un sitio consenso en el promotor de IL-8. También hubo un incremento considerable del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) sugiriéndose un potencial antiinflamatorio inmediato para esta glucana. En general, el perfil de citoquinas inducidas por glucan fosfato fue más reducido que el inducido por LPS y TSST-1 debido probablemente a diferencias en el reconocimiento y señalización de estas estructuras. Pero más relevante que un panel específico de citoquinas liberadas por estas moléculas por separado, estos investigadores hallaron que, en presencia de los otros estímulos, la glucan fosfato alteró la relación IL-1 β /IL-1RA de un perfil proinflamatorio a uno antiinflamatorio además de que disminuyó la liberación de IL-1 β e IL-6. Esto probablemente se debe a que la glucan fosfato module la unión, inducida por otros estímulos, de factores transcripcionales a sitios del promotor de IL-8 e IL-1RA en vez de a TNF- α , IL-1 β , IL-6 o IFN- γ .²⁶

Por último, las β -glucanas de muy bajo peso molecular (< 5 000-10 000 kDa) como la laminarina son biológicamente inactivas tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁵

Para comprender las actividades biológicas de las glucanas, además de conocer los mecanismos moleculares involucrados, es necesario también tener en cuenta que los mamíferos no poseen β -(1 \rightarrow 3)-glucanasas que degraden rápidamente estas moléculas y su metabolismo mediante oxidación es muy lento, esto hace que permanezcan más tiempo en el organismo, hasta más de un mes pueden permanecer en el hígado y en el bazo. *In vivo*, el aclaramiento de las β -glucanas depende de su peso molecular; las de bajo peso se secretan mediante filtración glomerular, en tanto que las mayores son retenidas primeramente en el hígado y degradadas por las células de Kupffer, proceso que puede tomar varias semanas.^{27,28} Se ha informado también que proteínas plasmáticas y séricas pueden inactivar las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas.²⁹

Las propiedades de las β -glucanas de modular la inmunidad son beneficiosas al proteger al huésped de enfermedades infecciosas y tumores,³⁰ lo que ha aumentado el interés de la industria farmacéutica en el estudio de estas estructuras. Varios derivados solubles de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas se han desarrollado y utilizado en pacientes con cáncer o sepsis, especialmente las que poseen ramificaciones β -(1 \rightarrow 6) como lentinan, sizofilan y grifolan que muestran potente efectos inmunomoduladores. Aunque existe un mayor número de análisis experimentales del efecto de las glucanas administradas por vía parenteral, han surgido algunos informes donde se sugiere que son activas biológicamente al administrarse por vía oral.³¹⁻³³

Es importante tener en cuenta que, aunque las β -glucanas son consideradas generalmente como seguras, se han reconocido efectos negativos asociados al uso por vía intravenosa de estos carbohidratos. Las β -glucanas particuladas pueden inducir la formación de granulomas, pero esto ha sido superado con el desarrollo de glucanas solubles. Sin embargo, si estas se administran concomitantemente con antiinflamatorios no esteroideos, pueden inducir efectos letales como un daño gastrointestinal incrementado y peritonitis.³⁴ También las β -glucanas han estado implicadas en el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes y desórdenes respiratorios.^{35,36} Por estas razones es necesario controlar y determinar su presencia en medicamentos parenterales, lo cual aún no se encuentra bien establecido por las agencias regulatorias.

GLUCANAS COMO CONTAMINANTES EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

La presencia de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas en sangre es un marcador diagnóstico de infecciones por hongos. La concentración normal está por debajo de 10 pg/mL; por lo tanto, cuando aumenta a concentraciones mayores de 20 pg/mL, pudiera diagnosticarse una infección fúngica.³⁶ Sin embargo, han habido informes en la literatura de falsos positivos relacionados principalmente con la administración previa de hemoderivados o en hemodiálisis donde se ha notificado el uso de membranas de celulosa.³⁷⁻³⁹ Las membranas de celulosa, que se utilizan en el proceso de producción de los hemoderivados, provienen de plantas superiores que contienen β -(1 \rightarrow 3)-glucanas en su pared celular, por lo que la contaminación de dichos productos durante los procesos de filtración con estas estructuras es de esperar y, de hecho, ha sido demostrada.⁴⁻⁸

Usami y otros informaron que las concentraciones de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas en varios hemoderivados (albúminas, fracción de proteínas plasmáticas, globulinas y factores de coagulación) oscilaron entre 0 y 6 930 pg/mL. De las soluciones de albúminas ensayadas, un 75 % mostró concentraciones de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas por encima de 20 pg/mL, mientras que de los factores de coagulación y de las soluciones de inmunoglobulinas un 40 y un 63 % respectivamente estuvieron por encima de ese valor⁴. En ese trabajo se demostró que la fuente de contaminación de estos hemoderivados eran precisamente los filtros profundos de celulosa y que la liberación de glucanas es mayor con albúmina que con agua. Sin embargo, se precisa que es necesario esclarecer los mecanismos de liberación de estas estructuras a partir de los filtros y su actividad biológica, cuestiones que aún no están dilucidadas completamente.

Con posterioridad, *Nagasawa* y otros⁵ utilizaron seis filtros de celulosa y un filtro de nailon, a través de los cuales se bombearon 100 mL de agua destilada y posteriormente, 100 mL de albúmina sérica humana y se determinó en cada fracción el contenido de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas. En las muestras aplicadas al filtro de nailon no se

detectaron glucanas. En el caso de los filtros de celulosa, cuando se eluyó con agua el contenido de glucanas osciló entre 6 y 207 pg/mL mientras que en las fracciones con albúmina, este fue evidentemente superior (desde 33 hasta 20 784 pg/mL) a pesar de haberse lavado previamente con agua, evidenciándose que la albúmina es capaz de extraer una cantidad considerablemente mayor de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas. En relación con esto es importante tener en cuenta que la albúmina sérica humana sirve como molécula transportadora de ligandos hidrofóbicos y en este sentido es necesario considerar que algunas estructuras de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas muestran características hidrofóbicas en dependencia de su peso molecular y de su grado de ramificación; de hecho en este estudio las glucanas extraídas por la albúmina a partir de filtros de celulosa EKSP fueron prácticamente insolubles en agua.

En un estudio realizado por *Ohata* y otros⁶ también se confirmó una liberación de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas a partir de filtros de celulosa provenientes de siete compañías diferentes. Es interesante referirnos a que estos investigadores evaluaron la actividad inmunomoduladora de las glucanas extraídas empleando la línea monocítica MonoMac-6 y utilizando como control las células estimuladas con LPS. En estos experimentos se obtuvo que la producción de citoquinas proinflamatorias osciló entre 74,3 y 119,0 % del control para TNF- α y entre 81,2 y 115,9 % del control para IL-1 β . A partir de estos resultados los autores concluyeron que las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas presentes en los hemoderivados son contaminantes procedentes de los filtros profundos de celulosa y que estos extractos modulan, disminuyendo, la producción de citoquinas proinflamatorias a partir de macrófagos. Igualmente, se había informado con anterioridad que las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas modularon la liberación de TNF- α a partir de macrófagos en respuesta a LPS.^{40,41}

En nuestra opinión este resultado concerniente a la actividad inmunomoduladora de estos extractos es debatible. Es interesante resaltar que las concentraciones de citoquinas liberadas difieren en menos de un 50 % con respecto al control; por lo tanto, esta variabilidad pudiera adjudicarse a la capacidad de recuperación del método de determinación (50-200 %) y no precisamente a una actividad inmunomoduladora de las glucanas presentes en los extractos.

En experimentos realizados en nuestro laboratorio no se obtiene un efecto potenciador sobre la liberación de IL-1 β de las glucanas contaminantes de muestras de albúmina sérica humana cuando se incuban con sangre humana total junto con LPS. Sin embargo, no sucede lo mismo en el caso de IL-6, donde sí se evidencia un efecto potenciador de la respuesta cuando se incubaba la sangre total conjuntamente con LPS y muestras contaminadas con glucanas.

Resultados similares obtuvieron *Kikkert* y otros²⁴ demostrando que los extractos de membranas de diálisis potenciaron la producción de citoquinas inducida por ligandos de TLR y definieron a las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas liberadas de esas membranas como las responsables de esos efectos coestimuladores. Las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas coestimularon activamente la producción de citoquinas (IL-6 e IL-8) inducida por ligandos de TLR a concentraciones que no indujeron producción de citoquinas por sangre total cuando se probaron separadamente.

En general no existe un consenso en la comunidad científica para definir o no a las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas como pirógenos debido a la amplia diversidad de resultados obtenidos en cuanto a sus efectos biológicos. *Pearson* y otros las definieron en 1984 como apirogénicas⁴² y en general, en la actualidad son prácticamente definidas como tal. Sin embargo, han surgido una serie de artículos (varios de los cuales han sido previamente comentados) que demuestran el efecto potenciador de la liberación de citoquinas proinflamatorias en combinación con ligandos de TLR, lo cual no muestra el mismo patrón para distintas citoquinas y depende del tipo de glucana involucrada.

Esta es una cuestión que requiere estar muy bien definida. Debe tenerse en cuenta que las pruebas *in vitro* para detectar la presencia de pirógenos en parenterales se llevan a cabo en condiciones completamente libres de pirógenos; no obstante, no puede asegurarse que un inyectable que haya pasado esta prueba se administre al paciente en condiciones totalmente controladas. Es decir, cualquier formulación parenteral puede contener, y de hecho generalmente sucede así, una cantidad determinada de endotoxinas que no excede el límite establecido y de esta forma pasa la prueba. Entonces, si existe además una contaminación con glucanas en dicha formulación (que generalmente es despreciada por las agencias regulatorias), pudieran sucederse eventos adversos en el paciente relacionados con las propiedades inmunomoduladoras de estas estructuras que, como se ha discutido con anterioridad, en ocasiones no son significativas cuando se administran en pequeñas concentraciones separadamente, pero sí se ha comprobado un efecto sinérgico importante de la liberación de mediadores proinflamatorios cuando son administradas conjuntamente con ligandos de TLR.

Con la prueba convencional de endotoxinas bacterianas (C-LAL) puede determinarse cualquier contaminación con glucanas presente en la formulación debido a que éstas activan el factor G de la cascada de coagulación; sin embargo, con esta prueba no se puede determinar el efecto potenciador o sinérgico cuando se administran conjuntamente con ligandos de TLR como los LPS. Entonces es importante destacar una ventaja trascendental de la prueba de activación de monocitos (MAT, por sus siglas en inglés), con la cual este efecto puede ser determinado cuando se incuban conjuntamente glucanas con LPS en presencia de líneas celulares monocíticas o cualquier fuente de monocitos humanos y se determina la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 o TNF- α). Mediante la evaluación en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) por C-LAL de 16 lotes de albúmina sérica humana 20 % se sospechó de una contaminación importante con β -(1 \rightarrow 3)-glucanas que se demostró con la prueba LAL específica para endotoxinas (ES-LAL). Los lotes que pasaron la prueba ES-LAL pasaron también la prueba de pirógenos en conejos. Estos resultados también coincidieron con los obtenidos con MAT/IL-1 β ; no obstante, se observó un efecto potenciador sobre la liberación de IL-6, cuestión que debe ser estudiada para determinar los posibles efectos en seres humanos.⁴³ Por esta razón nosotros consideramos razonable evaluar la presencia de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas en inyectables, destacando la utilidad del MAT como método alternativo para determinar *in vitro* los posibles eventos que pueden sucederse cuando se administra un producto contaminado con estructuras inmunomoduladoras y potencialmente pirogénicas.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE β -(1 \rightarrow 3)-GLUCANAS

Es conocido que el reactivo LAL (lisado de amebocitos del *Limulus*) constituye la herramienta fundamental para la detección de endotoxinas. Este ensayo se basa en la activación de la cascada de coagulación del cangrejo *Limulus polyphemus* a través del factor C. Sin embargo, este reactivo contiene además otra ruta de activación, el denominado factor G, que puede activarse por β -(1 \rightarrow 3)-glucanas y otros análogos estructurales. Una vez descubierta esta ruta de activación adicional y específica para β -(1 \rightarrow 3)-glucanas, se ha desarrollado por la compañía Associates of Cape Cod (ACC) un reactivo denominado GlucateLLTM que permite la cuantificación específica de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas con una sensibilidad en el orden de los picogramos.⁴⁴

Por otra parte, se ha obtenido a partir del plasma de larvas del gusano de seda (SLP, de Silkworm larvae plasma) un reactivo capaz de detectar peptidoglucanos y β -(1 \rightarrow 3)-glucanas⁴⁵ a partir del cual, mediante la separación o inactivación de la vía

sensible a peptidoglucanos, se obtuvo un reactivo específico a β -(1 \rightarrow 3)-glucanas cuya detección se realiza determinando la actividad fenoloxidasa o actividad proteolítica. Este reactivo se fabrica y distribuye por la compañía Wako Pure Chemical Industries Ltd. Empleando el mismo principio, se ha patentado la detección de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas con el uso de la hemolinfa de insectos como *Tenebrio molitor* u *Holotrichia diomphalia* (US 6,987,002 B2, US 2002/0197662 A1). Sin embargo, no hemos encontrado que este producto se encuentre disponible en el mercado.

CONCLUSIONES

Las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas potencian y sinergizan la acción de ligandos de TLR sobre la liberación de mediadores inflamatorios; también han mostrado un perfil antiinflamatorio, dependiendo en gran medida de sus características estructurales.

Las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas son contaminantes importantes provenientes de los filtros de acetato de celulosa que se utilizan en la clarificación de parenterales hemoderivados, por tanto, es necesario estudiar las consecuencias de la presencia de estas moléculas inmunomoduladoras en inyectables.

La prueba de activación de monocitos constituye una herramienta de utilidad al determinar *in vitro* los posibles eventos que pudieran sucederse *in vivo* cuando se administra un producto contaminado con moléculas inmunomoduladoras como las β -(1 \rightarrow 3)-glucanas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brown G, Gordon S. Immune recognition of fungal β -glucans. Cell Microbiol. 2005;7(4):471-9.
2. Medzhitov R, Janeway C. Innate Immunity. N Engl J Med. 2000;343:338-44.
3. Soltanian S, Stuyven E, Cox E, Sorgeloos P, Bossier P. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. Crit Rev Microbiol. 2009;35(2):109-38.
4. Usami M, Ohata A, Horiuchi T, Nagasawa K, Wakabayashi T, Tanaka S. Positive (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in blood components and release of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from depth-type membrane filters for blood processing. Transfusion. 2002;42:1189-95.
5. Nagasawa K, Yano Y, Kitabayashi G, Morimoto H, Yamada Y, Ohata O, et al. Experimental proof of contamination of blood components by (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan caused by filtration with cellulose filters in the manufacturing process. J Artif Organs. 2003;6:49-54.
6. Ohata A, Usami M, Horiuchi T, Nagasawa K. Release of (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan from Depth-type Membrane Filters and Their *in vitro* Effects on Proinflammatory Cytokine Production. Artificial Organs. 2003;27(8):728-35.

7. Ochiai M, Yamamoto A, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Hamaguchi I, et al. Applicability of bacterial endotoxins test to various blood products by the use of endotoxin-specific lysates. *Biologicals*. 2010;38:629-36.
8. Buchacher A, Krause D, Wiry G, Weinberger J. Elevated Endotoxin Levels in Human Intravenous Immunoglobulin Concentrates Caused by (1->3)- β -D-Glucans. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2010;64:536-44.
9. Brown G, Gordon S. A new receptor for β -glucans. *Nature*. 2001;413:36-7.
10. Tsoni V, Brown G. β -Glucans and Dectin-1. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1143:45-60.
11. Goodridge H, Wolf A, Underhill D. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*. 2009;230(1):38-50.
12. Reid D, Gow N, Brown G. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(1):30-7.
13. Taylor P, Brown G, Reid D, Martínez-Pomares L, Gordon S, Wong S. The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte-macrophage and neutrophil line cells. *J Immunol* .2002;269:3876-82.
14. Willment J, Brown G, Gordon S. Characterisation of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*. 2001;276:43818-23.
15. Brown G, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian Immunity. *Immunity*. 2003;19:311-5.
16. Hoekstra M, Van Berkel TJC, Van Eck M. Scavenger receptor BI: A multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol*. 2010;16(47):5916-24.
17. Rice P, Kelley J, Kogan G, Ensley H, Kalbfleisch J, Browder I, et al. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. *J Leukoc Biol*. 2002;72:140-6.
18. Thornton B, Vetvicka V, Pitman M, Goldman R, Ross G. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol*. 1996;156:1235-46.
19. van Bruggen R, Drewniak A, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Chapel H, et al. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):575-81.
20. Hahn P, Evans S, Kottom T, Standing J, Pagano R, Limper A. *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278:2043-50.
21. Herre J, Gordon S, Brow, GD. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol*. 2004;40:86976.
22. Williams D, Li C, Ha T, Ozment-Skelton T, Kalbfleisch J, Preiszner J, Brooks L, et al. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol*. 2004;172:44956.

23. Engstad Ch, Engstad R, Olsen J, Osterud B. The effect of soluble h-1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *Int Immunopharmacol.* 2002;2:1585-97.
24. Kikkert R, Bulder I, de Groot E, Aarden L, Finkelman M. Potentiation of Toll-like receptor-induced cytokine production by (1→3)-β-D-glucans: implications for the monocyte activation test. *J Endotoxin Res.* 2007;13(3):140-9.
25. Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis.* 2003;187:710-13.
26. Luhm J, Langenkamp U, Hensel J, Frohn Ch, Brand G, Hennig H, et al. β-(1→3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κB, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1β/IL-1receptor antagonist ratio. *BMC Immunol.* 2006;7:5.
27. Suda M, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T. Tissue distribution of intraperitoneally administered (1→3)-beta-D-glucan (SSG), a highly branched antitumor glucan, in mice. *J Pharmacobiodyn.* 1992;15:417-26.
28. Suda M, Ohno N, Hashimoto T, Koizumi K, Adachi Y, Yadomae T. Kupffer cells play important roles in the metabolic degradation of a soluble anti-tumor (1→3)-beta-D-glucan, SSG, in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996;15:93-100.
29. Miura T, Ohno N, Miura N, Shimada S, Yadomae T. Inactivation of a particle β-glucan by proteins in plasma and serum. *Biol Pharm Bull* 1997;20:1103-7.
30. Murphy E, Davis J, Carmichael M. Immune modulating effects of β-glucan. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(6):656-61.
31. Hong F, Yan J, Baran J, Allendorf D, Hansen R, Ostroff G, et al. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol.* 2004;173:797-806.
32. Rice P, Adams E, Ozment-Skelton T, Gonzalez A, Goldman M, Lockhart B, et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:1079-86.
33. Li B, Cai Y, Qi C, Hansen R, Ding C, Mitchell TC, Yan J. Orally administered particulate beta-glucan modulates tumor-capturing dendritic cells and improves antitumor T-cell responses in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5153-64.
34. Takahashi H, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T. Association of immunological disorders in lethal side effect of NSAIDs on beta-glucan-administered mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001;31:1-14.
35. Douwes J. (1→3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air.* 2005;15:160-9.
36. Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, et al. A role for fungal β-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med.* 2005;201:949-60.

37. Yoshida K, Nakajima M, Yamasaki M, Kitano Y, Niki Y, Ohsawa G, et al. Investigation of the influence of hemodialysis membranes and factors associated with hemodialysis on serum (1→3)-β-D-glucan. *Kansenshogaku Zasshi*. 1998;72:245-8.
38. Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, Kanda Y, Nakao A, Kitamura T, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-glucan level. *Kidney Int*. 2001;60:31923.
39. Kato A, Takita T, Furuhashi M, Takahashi T, Maruyama Y, Hishida A. Elevation of blood (1→3)-β-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron*. 2001;89:15-9.
40. Hoffman O, Olson E, Limper A. Fungal beta-glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in response to bacterial lipopolysaccharide. *Immunol Lett*. 1993;37:19-25.
41. Masihi K, Madaj K, Hintelmann H, Gast G, Kaneko Y. Down-regulation of tumor necrosis factor-alpha, moderate reduction of interleukin-1beta, but not interleukin-6 or interleukin-10, by glucan immunomodulators curdlan sulfate and lentinan. *Int J Immunopharmacol*. 1997;19:463-8.
42. Pearson F, Bohon J, Lee W, Bruszer G, Sagona M, Jakubowski G, et al. Characterization of Limulus Amoebocyte Lysate-Reactive Material from Hollow-Fiber Dialyzers. *Environ Microbiol Rep*. 1984;48:1189-96.
43. Perdomo-Morales R, Pardo-Ruiz Z, Spreitzer I, Lagarto A, Montag T. Monocyte Activation Test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of Human Serum Albumin. *ALTEX*. 2011;28:227-35.
44. Finkelman M. GlucateLL™-A New Kit for Quantitative Determination of (1→3)-β-D-Glucan. *LAL Update*. 2001;19:1-4.
45. Tsuchiya M, Asahi N, Suzuoki F, Ashida M, Matsuura S. Detection of peptidoglycan and L-glucan with silkworm larvae plasma test. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996;15:129-34.

Recibido: 18 de octubre de 2011.

Aprobado: 22 de noviembre de 2011.

Zenia Pardo Ruiz. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1 605 entre Boyeros y Puentes Grandes. CP 10600. Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. Correo electrónico: zenia.pardo@infomed.sld.cu