I. RESUMEN

La Dietilcarbamazina (DEC) es un antihelmíntico derivado de la piperazina con propiedades inmunomoduladoras putativas. Para definir algunas de estas propiedades en un modelo murino bien caracterizado, en el presente trabajo evaluamos el efecto modulador de la DEC sobre: 1) la respuesta de anticuerpos, 2) la producción de citocinas y 3) el estallido respiratorio de granulocitos y monocitos en ratones singénicos (BALB/c). Para evaluar estos parámetros inmunológicos se estimularon grupos de ratones con un antígeno timo dependiente (toxoide tetánico) o con un timo independiente (LPS, *E. coli* 0111:B4) todos tratados con una dosis alta y una baja DEC durante siete días, y como testigo se incluyó un grupo de ratones tratados con el inmunosupresor azatioprina. Se obtuvieron los sueros a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días después del estímulo y se evaluó la producción de anticuerpos específicos contra cada uno de los antígenos mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) estandarizado para este propósito. En suero, se evaluó la producción de las citocinas: IL-2, IFN-γ, IL-10, e IL-12 mediante la técnica de ELISA a las 0, 24 y 48 horas. El estallido respiratorio de fagocitos de sangre periférica se evaluó luego de la administración por vía oral de una dosis baja y una alta de DEC, a la hora y a las 2:30 horas utilizando la técnica de la 123-DHR mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que la producción de anticuerpos anti-toxoide tetánico se vio aumentada 0.5 veces mas que el control antigénico con una dosis alta de DEC (250 μg) y la producción de anticuerpos anti-LPS presentó un aumento aproximadamente dos veces mayor que el control antigénico ($p \leq 0.001$) con la dosis baja de DEC (25 μg). Los niveles aumentados de IL-2 e IL-12 en animales inmunizados con TT y que recibieron tanto una dosis baja como una alta de DEC muestran una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los controles ($p \leq 0.001$). En animales inmunizados con LPS, a las 48 h, la producción de IL-2 se encontró disminuida mientras que la IL-10 estuvo aumentada en el grupo de ratones que recibieron la dosis baja de DEC ($p \leq 0.001$). En cuanto al estallido respiratorio las células granulocíticas presentaron

una estimulación mayor de la IMF en el grupo de ratones que recibieron la dosis alta de DEC y que fueron sangrados a la hora, y el estallido respiratorio en los monocitos fue potenciado tanto por la dosis baja como por la alta, a los dos tiempos de prueba. Las conclusiones de este trabajo son las siguientes: 1) La DEC a dosis terapéuticas altas tiene un efecto potenciador del estallido respiratorio en células fagocíticas; 2) La DEC en una dosis terapéutica baja, tiene un efecto positivo en la producción de IL-2 e IL-12 en ratones inmunizados con TT, sugiriendo una respuesta tipo Th 1; 3) La DEC aumenta la producción de IL-10 y disminuye la producción de IL-2, en ratones inmunizados con LPS, sugiriendo una respuesta tipo Th 2; 4) La producción de Ac esta aumentada con el estímulo de LPS y dosis terapéuticas bajas de DEC; 5) La dosis terapéutica baja (25 µg) de DEC produce un estímulo en la respuesta inmune humoral y celular, es decir, en la respuesta inmune adquirida; y 6) La dosis terapéutica alta (200 µg) de DEC induce un estímulo en la respuesta fagocítica, es decir, en la respuesta inmune innata.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 INMUNOMODULADORES

Los inmunomoduladores son compuestos que modifican la respuesta biológica y afectan la respuesta inmunitaria de manera ya sea positiva o negativa[1]. Algunos compuestos que regulan positivamente o estimulan la respuesta inmune han sido desarrollados y usados exitosamente en la prevención y tratamiento de enfermedades humanas[2] y se les conoce como inmunoestimulantes. Los inmunoestimulantes pueden dividirse en tres categorías: a) de origen bacteriano; b) de origen celular eucariótico, como son las citocinas; y c) agentes bioquímicos[3].

2.1.1 INMUNOESTIMULANTES DE ORIGEN BACTERIANO

Los compuestos bacterianos fueron de los primeros en reconocerse como inmunoestimulantes. El adyuvante completo de Freund (ACF), que contiene derivados micobacterianos, se ha usado desde hace mucho tiempo como adyuvante para reforzar respuestas inmunitarias humorales en animales. Aunque el ACF no es apropiado para uso humano, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) se ha estudiado ampliamente en el tratamiento de neoplasias, como el melanoma y el carcinoma vesical. El BCG estimula la función celular de macrófagos, linfocitos T y B y células NK, y aumenta la producción de IL-1[4]. Asimismo, se sugiere que algunas proteínas micobacterianas de choque térmico muestran actividad de "superantígeno", es decir, tienen la capacidad de activar gran cantidad de linfocitos T de manera restringida al complejo principal de histocompatibilidad. La activación policlonal de ciertos subgrupos de células T por estos antígenos puede ser la causa de algunos de los efectos inmunomoduladores observados después de la administración de compuestos micobacterianos[5].

2.1.2 COMPUESTOS DE ORIGEN CELULAR

Las sustancias secretadas o excretadas por células eucarióticas, como por ejemplo los extractos tímicos e interferones, muestran actividades inmunomoduladoras variadas: evidentemente los resultados positivos originaron especulaciones referentes al potencial de utilidad clínica de algunos de estos agentes[6,2]. No obstante, los problemas para obtener cantidades adecuadas de preparados apropiadamente puros limitó el estudio de la función que desempeñan en el tratamiento de la enfermedad humana. El desarrollo de la biotecnología ha permitido la producción comercial de citocinas que pueden inducir la diferenciación y la activación de compartimentos hematopoyéticos y linfoides y subsecuentemente conducir a la potenciación de los mecanismos de defensa contra el cáncer y las infecciones. Aunque las citocinas son producidas por células del sistema inmune ya sea constitutivamente o en respuesta a señales de activación, se ha demostrado que su inducción esta alterada en pacientes con enfermedades infecciosas[7]. Por lo tanto, los pacientes con producción deficiente de citocinas o aquellos que reciben tratamientos de quimioterapia (resultando en inmunosupresión y alta susceptibilidad a infecciones) pueden beneficiarse de la terapia con citocinas administradas exógenamente. Un ejemplo es la reconstitución de la médula ósea después de quimioterapia y/o radioterapia, en la cual la experiencia clínica ha demostrado el beneficio terapéutico del uso de factores estimulantes de crecimiento de granulocitos y macrófagos[8,9].

2.1.2.1 Citocinas

Las citocinas son proteínas pequeñas (<80 KDa) o glucoproteínas, que exhiben una diversidad de efectos autocrinos, paracrinos y en algunos casos, endocrinos. Tienen un enorme potencial para el uso clínico como inmunomoduladores y demuestran una diversidad de acciones específicas así como generalizadas sobre el sistema inmunitario[2,10]. A continuación se discuten brevemente las citocinas inmunoestimulantes con potencial en la terapéutica humana.

La **IL-2** tiene un gran potencial terapéutico contra el melanoma, la leucemia mielógena aguda y el carcinoma de células renales[11]. La IL-2 estimula a las células asesinas naturales (células NK); las células NK así estimuladas se conocen como células LAK (linfocitos activados por linfocinas) que se usan actualmente con éxito limitado en la terapéutica de tumores sólidos[12]. En cuanto a su potencial antinfeccioso, la actividad protectora de la IL-2 pudiera también ser mediada por las células NK. La activación de los linfocitos y la inducción de la producción de IFN-γ son otras características explotables en su uso terapéutico y en la llamada restitución inmune en paciente inmunodeprimido[13]. Existen numerosos estudios clínicos con respecto a pacientes infectados con VIH, en quienes la administración de dosis intermitentes o continuas de IL-2 como adyuvante a la terapia retroviral se encuentra asociada a un aumento en la cuenta de células de $CD4^+$ sin aumento en la carga viral [13,14].

La **IL-12** (factor estimulador de las células NK) es producida por monocitos; es un regulador esencial tanto en la inmunidad innata como en la adquirida, y actúa promoviendo selectivamente la diferenciación de linfocitos Th1. Asimismo induce la producción de IFN-γ por células NK y células T, la proliferación de células T y NK activadas, y activa la función citotóxica de las células NK. Todas estas actividades podrían jugar un papel en las defensas antimicrobianas y hacen de la IL-12 un atractivo inmunomodulador en potencia, por lo que en la actualidad se evalúa su utilidad clínica[8,15,16].

La **IL-18** es una citocina proinflamatoria producida por células mononucleares con capacidad de inducir la producción de citocinas Th1 y aumentar la citotoxicidad mediada por células. Debido a su participación en la regulación de las respuestas involucradas con la enfermedad autoinmune infecciosa, en fecha muy reciente se ha empezado a discutir la posibilidad de uso terapéutico o inmunoprofiláctico en patologías que puedan necesitar para su resolución de un estimulo en el brazo celular de la respuesta inmune[15,17].

El **factor de necrosis tumoral** (TNF) citocina que ha demostrado una actividad antitumoral considerable, tanto *in vitro* como *in vivo*, tiene un potencial terapéutico limitado debido a su considerable toxicidad sistémica[15].

El **factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos** (GM-CSF) se usa para acelerar la recuperación de la médula ósea autóloga y en la sepsis. Los CSF también se aplican experimentalmente en el tratamiento de leucopenia por otras causas, incluso neutropenia primaria, mielodisplasia, trastornos mieloproliferativos, anemia aplásica y SIDA por VIH[18].

El **interferón alfa** (IFN-α), ha mostrado actividad antitumoral en el mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de célula T, melanoma maligno, y carcinoma de células renales, entre otros. Se han demostrado respuestas positivas a una diversidad de infecciones virales con IFN-α[15,19]. **El interferón gamma** (IFN-γ, interferón inmunitario), un producto de los linfocitos, también posee actividad extensa en una diversidad de tumores e infecciones virales. Se utiliza con cierto éxito como un tratamiento alternativo en pacientes con sarcoma de Kaposi concomitante con SIDA por VIH o en quienes han demostrado resistencia o intolerancia al IFN-α, asimismo aumenta la capacidad fagocítica en pacientes con SIDA por VIH y enfermedad granulomatosa crónica [15, 18].

2.1.3 Agentes bioquímicos

El fracaso de la terapia antibiótica es frecuentemente atribuible a un sistema inmune comprometido que no puede proporcionar el soporte necesario para que los antibióticos puedan erradicar la infección[5 8]. Algunos autores puntualizan la necesidad de considerar cada vez mas las posibles acciones e interacciones inmunológicas de los antibióticos[20]. Diversos estudios sugieren que muchas de las drogas antimicrobianas pueden modular las defensas del hospedero en diferentes maneras[21, 22]. Algunos antibióticos se concentran en los fagocitos donde potencian la muerte intracelular, otros provocan alteraciones directamente sobre la bacteria lo que las hace mas susceptibles a la fagocitosis, algunos potencian directamente las actividades fagocíticas y/o microbicidas de las células hospederas[23,24]. Actualmente se busca confirmar la capacidad de estos antibióticos para "manipular" la capacidad fagocítica y la capacidad general de defensa inmune del cuerpo.

A consecuencia del reto terapéutico que representa el SIDA por VIH, se ha explorado una diversidad de agentes farmacológicos como inmunomoduladores potenciales[5,8]. Otros inmunoestimulantes, entre ellos agentes polirribosínicos, antroguinonas y pirimidamoles, probablemente actúan a través de su capacidad para inducir la producción de interferones[25]. Estos y muchos otros agentes, entre los que se incluyen el antihelmíntico levamisol (usado con éxito limitado como adyuvante en el carcinoma de colón)[26], se evalúan en relación al potencial de beneficio terapéutico en la inmunodeficiencia, la enfermedad infecciosa, la autoinmunidad, y la terapia antineoplásica. Una droga que ha mostrado propiedades inmunomoduladoras es la Dietilcarbamazina. Este agente antihelmíntico ha sido señalado por diversos autores como una droga con alto potencial inmunomodulador debido a las efectos que ha mostrado sobre los mediadores inespecíficos de la inflamación, sobre la producción de anticuerpos y sobre la producción de citocinas *in vitro*[27,28,29,30].

2.2 DIETILCARBAMAZINA

La 1-Dietilcarbamil-1-4-metil piperazina (Dietilcarbamazina o DEC) ha sido utilizada en el tratamiento de enfermedades parasitarias humanas y veterinarias, particularmente infecciones por filarias. Su acción antifilarial fue descubierta y descrita por Hewitt[31]. La DEC ha sido utilizada contra todas las filariasis humanas: *Brugia malayi, Brugia timori, Loa loa, Mansonella azzardi, Mansonella perstans, Mansonella streptocerca, Onchocerca volvulus y Wuchereria bancrofti*[32].

La DEC fue probada para su uso en el tratamiento de la oncocercosis en México por Mazzotti en 1947[33]. Mazzotti observó asimismo efectos secundarios graves luego de la administración del fármaco en individuos altamente infectados con *Onchocerca volvulus,* en lo que posteriormente fue bautizado como " reacción de Mazzotti". Esta reacción ha sido usada como un recurso diagnóstico de uso restringido para detectar la presencia de *O. volvulus* .

2.2.1 Estructura y Farmacología de la Dietilcarbamazina

DEC es un derivado carbamilo sintético de la piperazina; puede ser sintetizado en forma salina como hidrocloruro, palmoato o dicitrato y es rápidamente soluble en agua. La forma cristalina esta comercialmente disponible bajo una variedad de nombres: Banocide (Wellcome, UK) o Hetrazan (Lederle, UK). El consenso terapéutico moderno recomienda la administración de la DEC en la forma de dicitrato[34].

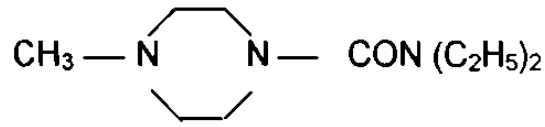


Figura 1. Estructura molecular de la dietilcarbamazina.

En el humano se han probado varios esquemas de dosificación oral, adaptados a la gravedad de la enfermedad filarial y a las reacciones secundarias que puedan ser inducidas. La vida media en plasma de la DEC luego de una dosis oral única de 200-400 mg en voluntarios normales varia desde 6.1 a 8.1 h. Una dosis estándar de 200 mg de DEC produce un pico de concentración en sangre de 1.5-2.0 µg/ml en 2h[35]. Investigaciones anteriores mostraron que una dosis única de 10 mg/kg produce un pico de concentración en sangre de 4-5 µg/ml en 3h el cual declina a cero a las 48 h. La droga alcanza todas las partes del cuerpo en 20-25 min[36]. La absorción rápida por el tracto gastrointestinal y la rapidez con que alcanza altas concentraciones plasmáticas parecen contribuir a los graves efectos secundarios vistos en individuos infectados con filarias.

2.2.2 Mecanismos de Acción Directa Sobre los Parásitos

La DEC es un microfilaricida con moderado efecto macrofilaricida, es decir, tiene mayor efecto contra la larva que contra el gusano adulto. La característica mas notable y sorprendente de la DEC es que no tiene efecto sobre las microfilarias *in vitro*[27]. En contraste a este efecto, la DEC ejerce una respuesta inmediata *in vivo*. La inyección intravenosa de DEC en pacientes infectados con filarias sanguíneas, provoca la disminución de hasta 60% de las microfilarias

circulantes en cuatro minutos y en ratas se logra observar hasta el 80% de eliminación de las microfilarias en sangre[37]. La interpretación original de este efecto era que la DEC actuaba como una opsonina, modificando a las microfilarias, para su posterior captura y destrucción por células del sistema fagocítico mononuclear.

La DEC induce la movilización de las microfilarias por efecto directo sobre el sistema neuromuscular de los parásitos. La administración de la DEC parece potenciar la acción de la acetilcolina microfilarial y resultar en un incremento en la movilidad parasitaria. En la infección por *W. bancrofti* la DEC moviliza a las microfilarias del pulmón a la circulación general. Alteraciones en cAMP/cGMP en las microfilarias pudieran contribuir a esta movilización del parásito[32].

Los parásitos son atrapados por los fagocitos en los capilares esplénicos y hepáticos luego de la administración de la DEC. La observación directa de las microfilarias circulantes en los vasos hepáticos de ratas algodoneras revelaron que minutos después de la administración de la DEC las microfilarias se adhieren a las paredes de los capilares. La adherencia de las microfilarias a los capilares y a los fagocitos fijos (por ejemplo Células de Kupffer) en presencia de DEC podría ser debido al mismo mecanismo por el cual se promueve la adhesividad de los eosinófilos *in vitro*[38].

Martínez-Báez y colaboradores[39] describieron la muerte de las microfilarias de *O. volvulus* en tejido luego de la administración de DEC y los infiltrados celulares mononucleares que rodearon estos parásitos: tipos linfoides y macrófagos. Como se puede observar, en las acciones descritas para la DEC en su mecanismo antifilarial, se involucra importantemente a efectores del sistema inmune.

2.2.3 Efecto Sobre el Sistema Inmune

La DEC tiene efectos fisiológicos directos sobre los granulocitos; horas después del tratamiento con la DEC, los eosinófilos tisulares son hallados desgranulándose en la superficie de las microfilarias[40,41]. La DEC induce la vacuolización de leucocitos *in vitro* de una manera dosis dependiente, los

eosinófilos parecen ser mas sensibles a esta acción que los neutrófilos[41]. En los neutrófilos, la microscopia de luz demostró que la vacuolización fue encontrada mas marcada entre dosis de 0.5 y 1.0 mg/ml, una concentración suprafisiológica de DEC. Niveles menores que 0.1 mg/ml no indujeron vacuolización, aunque estudios mas recientes sugieren que enzimas son liberadas de este tipo celular a bajas concentraciones de la droga. Estudios en nuestro laboratorio y analizando las células con microscopia electrónica mostraron que la vacuolización de los neutrófilos puede darse a concentraciones terapéuticas de 10 µg/ml de DEC[42].

Las plaquetas también parecen ser influenciadas por la DEC. Cesbron *et al.* en 1987[43] demostraron que las plaquetas de voluntarios humanos no infectados tratados con DEC, se adhirieron a las microfilarias de *Loa loa in vitro*, y que plaquetas normales que recibieron DEC *in vitro,* también fueron capaces de eliminar microfilarias de *Brugia.* Un hallazgo frecuente de diferentes grupos de trabajo es que la DEC incrementa la velocidad y el grado de adherencia de las microfilarias a las paredes vasculares, a plaquetas y a granulocitos[41, 44, 45]. En el sistema *L. sigmodonti/Mastomys*, mas del 99% de las microfilarias en circulación se encuentran normalmente libres de cualquier célula adherida; no obstante, a las 4h de la administración de DEC, el 21 % de las microfilarias fueron halladas adheridas a leucocitos[46]. La adherencia de los eosinófilos en particular se incrementa de manera considerable por el tratamiento con DEC[41 44,45] y su capacidad citotóxica, medida como la capacidad de matar a las microfilarias, se ve aumentada.

2.2.4 Efecto Sobre el Metabolismo del Ácido Araquidónico

Mucho del interés despertado por la DEC inicialmente se refería a su posible papel como antiinflamatorio en el asma[47]. Estudios farmacológicos han mostrado que la DEC interfiere con el metabolismo del ácido araquidónico y se sugiere que esta actividad podría ser relevante para su efecto filaricida y un posible efecto antiinflamatorio[27,28].

La DEC es descrita como un inhibidor de la 5-lipooxigenasa, bloqueando la producción de leucotrienos. Originalmente Orange y sus colaboradores en 1968[48], demostraron que la DEC bloqueaba la síntesis de leucotrienos, y esto fue interpretado como inhibición de la 5-lipooxigenasa, antes de que la cascada sintética de los leucotrienos fuera establecida. Las enzimas subsiguientes en la vía de la lipooxigenasa parecen ser el blanco de la DEC (Fig 1). En mastocitos de ratón, la conversión de 5-HPETE a LTA4 por la LTA4 sintetasa fue bloqueada por la DEC[49], mientras en la línea basófila de la rata, la LT C4 sintetasa fue bloqueada[50].

Kanesa-thasan y colaboradores en 1991[28] demostraron que la DEC bloquea la producción celular endotelial de los productos de la vía de la ciclooxigenasa: PGE2 prostaglandina, PGI2 prostaciclina, y tromboxano A2. No afecta la producción de prostanoides de las plaquetas. Las plaquetas sintetizan preferencialmente tromboxano y 12-HPETE, y si esta observación se mantiene a nivel sistémico, la administración de la DEC podría resultar en un cambio repentino de prostaciclinas a prostanoides y de prostaglandinas a tromboxanos.

2.2.5 Efectos Inflamatorios Adversos Secundarios a la Administración de la DEC como Antihelmíntico

Las reacciones adversas de la DEC en las filariasis, reacción de Mazzotti, es una limitante para su uso general e indiscriminado en las filariasis humanas. La reacción de Mazzotti ocurre entre 1-24 horas posteriores a la toma de la DEC y se caracteriza por prurito intenso, hipotensión, artralgias, náusea, fiebre con cefalea y mialgias. Los efectos secundarios son directamente proporcionales a la cantidad de parásitos y a la dosis de la droga[51]. La terapia con dosis baja se usa para evitar esta reacción.

En el paciente tratado, los eosinófilos de la sangre entran a los tejidos, desgranulan en la piel, y se observa una caída dramática en el numero de eosinófilos periféricos a las 6-8 h post-DEC[52]. Cuatro días después, el número de eosinófilos en la sangre vuelve a niveles pre-tratamiento o inclusive por

encima de ese nivel, a consecuencia de un aumento en los niveles de IL-5[53].

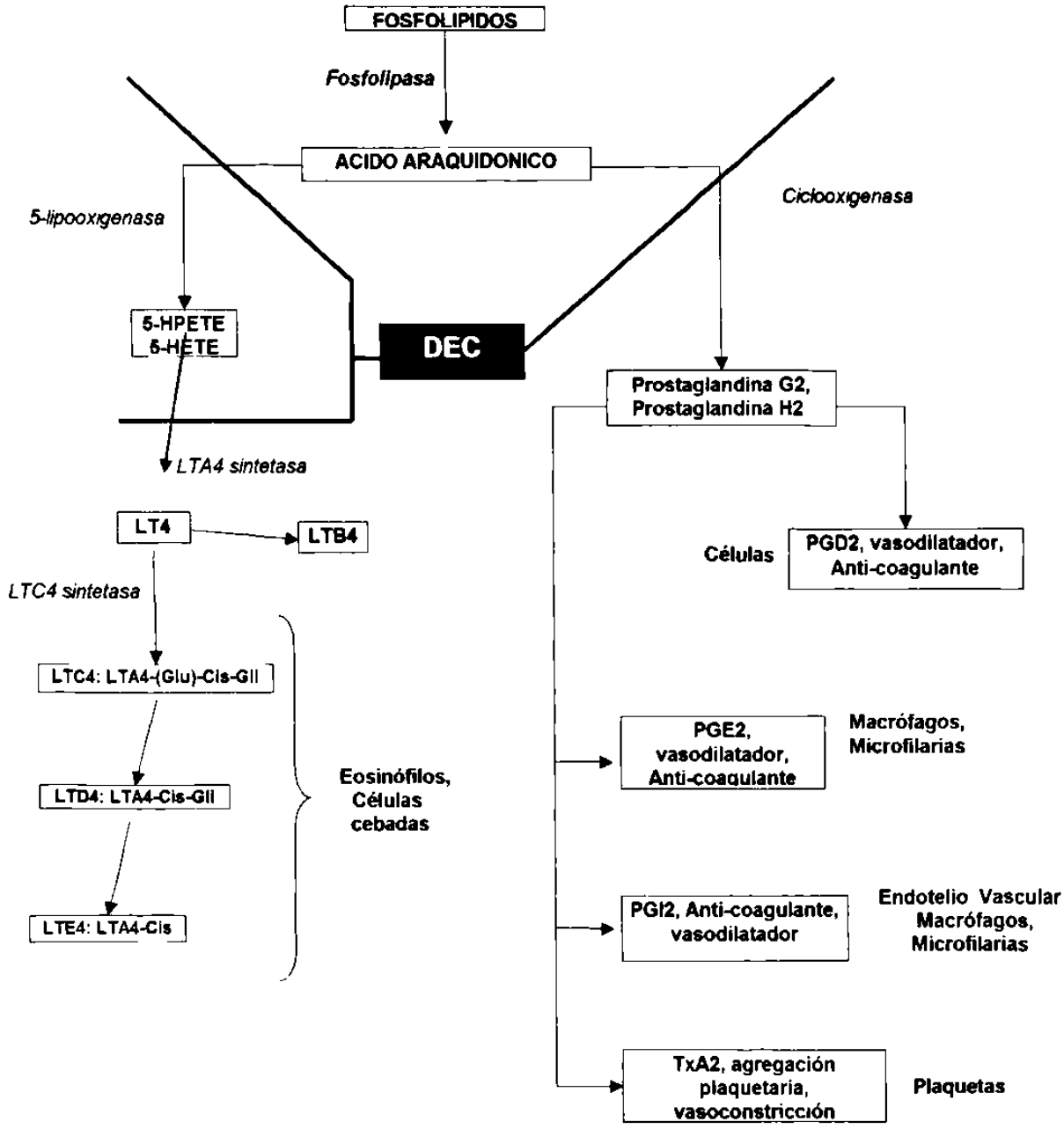


Figura 2. Descripción esquemática del efecto de la DEC sobre las vías metabólicas del ácido araquidónico, sobre la vía de la 5-lipooxigenasa (Mathews & Murphy, 1982) y sobre la vía de la ciclooxigenasa (Kanesa-Tashan *et al.*, 1991).

Mientras los eosinófilos están ausentes en la sangre, los niveles séricos de la proteína básica mayor (MBP) derivada del eosinófilo aumenta considerablemente durante los tres días post-tratamiento, y hay MBP depositada en las uniones de la epidermis y la dermis[52]. Los corticosteroides mejoran exitosamente las reacciones secundarias, con la excepción del prurito.

2.2.6 La Dietilcarbamazina como Inmunomodulador Terapéutico

Los puntos tratados con anterioridad sugieren que la DEC ejerce su mecanismo de acción *in vivo* actuando en estrecha relación con los sistemas de defensa del hospedero y ejerciendo funciones de inmunomodulador. Como ya se mostró, la DEC es un inhibidor de la vía lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico, inhibiendo de manera dependiente de la dosis la formación de leucotrienos A4, B4 y C4. Asimismo, también se ha observado que la DEC inhibe de manera reversible la agregación plaquetaria, sugiriendo así un posible efecto sobre la vía de la ciclooxigenasa. Estos ejemplos nos indican un comportamiento aparentemente paradójico de la droga en lo que respecta al evento inflamatorio, ya que por una parte se observa una actividad estimulante y pro-inflamatoria con respecto a los efectores fagocíticos y por la otra se tiene un efecto anti-inflamatorio con respecto a los mediadores derivados del ácido araquidónico. Por otro lado, con anterioridad se ha mostrado la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias estimuladas por la DEC[54]. También se demostró la producción *in vitro* e *in vivo* de la β-quimiocina RANTES (*Regulated on Activation Normal T Cells Expressed and Secreted*)[30,55] en individuos normales y en células obtenidas de ellos. Es atractivo, cuando menos teóricamente, contar con inmunomoduladores que puedan modificar *in vivo* la producción de quimiocinas ya que por ejemplo en el caso de la infección por VIH, la presencia de la quimiocina RANTES se relaciona con protección contra la progresión de la infección[8,56,57].

En modelos animales se han hecho estudios sobre la respuesta de anticuerpos bajo la influencia de la DEC. Kitchen y colaboradores estudiaron la producción de anticuerpos en gatos inmunizados e infectados con el virus de la

leucemia felina (FeLV)[58]. Cuando el tratamiento con DEC fue comenzado inmediatamente después del diagnóstico de la infección retroviral, se encontró una disminución en los niveles del virus en la circulación, así como una disminución en la velocidad del decline de las cuentas linfocitarias periféricas[59]. Un estudio paralelo indicó que el tratamiento con DEC administrado junto con una sola dosis de Leukocell® (vacuna contra FeLV) aumentó el título y la duración de anticuerpos protectores en el suero[29]. El grupo de Nelson utilizó DEC como adyuvante en el tratamiento del linfoma causado por el FeLV encontrando resultados similares a los de Kitchen con un aumento de las cuentas leucocitarias y un aumento de la sobrevida de los animales[60]. El grupo de Kitchen reportó que el tratamiento con DEC estaba asociado con la prolongación de la supervivencia de ratones infectados con el virus de la leucemia murina (CAS-BR-M)[61]. Ambos retrovirus, el felino y el murino, provocan inmunodeficiencia análoga a la infección causada por los retrovirus linfotrópicos-T humanos (HTLV-II). En estudios donde se trato con DEC a animales inmunosuprimidos farmacológicamente con ciclofosfamida e infectados experimentalmente con bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Heamophilus influenzae*, y hongos como *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, el tratamiento se relacionó con la disminución de los microorganismos infectantes en órganos como cerebro, riñón y pulmón. Asimismo, se evalúo en un modelo murino el efecto de la DEC sobre la administración de una vacuna comercial contra *Streptococcus pneumoniae;* los resultados de este experimento sugieren que la DEC aumentó el título de anticuerpos contra el *Streptococcus pneumoniae*[62]. Estos mismos autores estudiaron el efecto de la DEC asociado con el antifúngico fluconazol. En este estudio utilizaron ratones infectados experimentalmente con *Cándida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, observando que la DEC potenció el efecto terapéutico del fluconazol, medido esto por la disminución de los niveles de microorganismos en cerebro y riñón de los animales tratados con ambos fármacos en comparación con los tratados solo con fluconazol[63]. Los resultados de estos estudios sugieren que la DEC puede ser útil como agente para la prevención–tratamiento de

complicaciones por hongos y bacterias oportunistas en animales o individuos inmunosuprimidos. Los estudios anteriores sugieren y proponen el uso como coadyuvante en la administración con antirretrovirales y antimicrobianos y como adyuvante en la aplicación de vacunas.

III. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de las investigaciones sobre los efectos de la DEC como modulador de la Respuesta Inmune se han desarrollado en forma individual y aislada.

No se han evaluado en un mismo modelo animal o en el humano efectores fagocíticos, celulares y humorales que justifiquen con certeza su uso como un inmunomodulador o adyuvante.

Por lo tanto, es necesario evaluar los efectos inmunológicos del tratamiento con DEC en un modelo murino conocido y bien caracterizado, como lo es el modelo de ratones BALB/c.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la capacidad moduladora de la DEC sobre mediadores humorales y celulares de la respuesta inmunológica, así como la función fagocítica en el ratón BALB/c.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) la respuesta inmune humoral, medida como la respuesta de anticuerpos contra un antígeno timo-dependiente y uno timo- independiente.

2. Evaluar mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) la respuesta inmune celular, medida por la producción de las citocinas: IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12 presentes en suero.

3. Evaluar por citometría de flujo la función fagocítica expresada como el estallido respiratorio de neutrófilos.

V. METODOLOGÍA:

ESTRATEGIA GENERAL

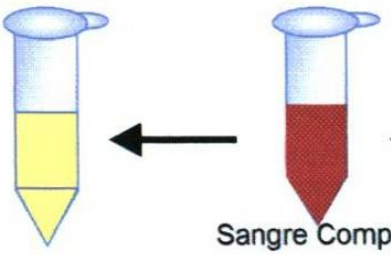
BALB/c 8 Semanas
♀ ó ♂

Inmunización vía sub-cutánea
de: TT o LPS

Administración
vía oral de:
DEC y AZA/7 Días

Administración vía oral
DEC dosis < y >

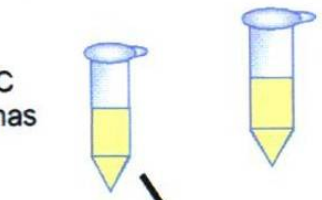
Sangrado plexo retroorbital
Días 0, 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35



Suero

Sangre Completa

Sangrado, 1h y 2½ h



-70°C
Citocinas

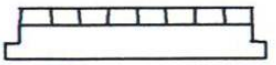
-20°C
Anticuerpos

ELISA comercial

ELISA *vs* LPS, TT
Ac IgG y Totales

ESTALLIDO RESPIRATORIO

Citometría de flujo 123-Dihidro-rodamina



Absorbancia a 450nm

V. MATERIAL Y METODOS

5.1 Animales

Se utilizaron ratones de la cepa singénica BALB/c, hembras y machos, con una edad promedio de 8 semanas (rango de 6-12). Se mantuvieron con alimento nutricubos Purina, agua estéril y suplemento vitamínico, agrupados en jaulas de acrílico con tapa de rejilla metálica, a temperatura constante entre 16-20°C.

5.2 Antígenos

5.2.1 Lipopolisacárido

Este antígeno se adquirió comercialmente en SIGMA (LPS de *Escherichia coli*, serotipo 0111:B4, cat. SIGMA L2630). Se preparó una solución de 100 µg/ml de LPS en solución salina estéril 0.9% (Solución CS, PiSA) para la inmunización de los ratones (Tabla 1). También se preparó una solución de 20 µg/ml de LPS disueltos en buffer carbonatos pH 9 para la fijación de este antígeno en microplacas para el ensayo inmunoenzimático.

5.2.2 Toxoide Tetánico

Se utilizó una suspensión inyectable comercial de esta vacuna (Tetanol Behring AVENTIS). Se preparó una solución de 0.3 UI/ml de toxoide tetánico en solución salina estéril 0.9% (Solución CS, PiSA) para la inmunización de los ratones (Tabla 1). Para el ensayo inmunoenzimático se preparó una solución de 0.3 UI/ml de toxoide tetánico en buffer PBS pH 7.4.

5.3 Fármacos

5.3.1 Dietilcarbamazina

La 1-Dietilcarbamil-1-4-metil piperazina, sal de citrato (Dietilcarbamazina o DEC), fue adquirida en SIGMA (cat. SIGMA D8765). Se prepararon soluciones de 250 µg/ml, 850 µg/ml, 1.75 mg/ml y 2.5 mg/ml de DEC disuelta en solución salina

estéril 0.9% (Solución CS, PiSA) para la administración de 100 µl por vía oral en los modelos murinos utilizados (Tablas 1 y 2).

5.3.2 Azatioprina

La AZA fue adquirida comercialmente como Azatrilem (LEMERY, lote # AU159). Se preparó una solución de 40 mg/ml de AZA en solución salina estéril 0.9% (Solución CS, PiSA) y se administraron 100 µl a los ratones por vía oral (Tabla 1).

5.4 Modelo murino

Se utilizaron 6 grupos de 10 ratones de la cepa singénica BALB/c para cada antígeno. Los ratones fueron inmunizados con 0.1 ml de uno u otro antígeno en solución salina sin adyuvante por vía subcutánea, se separaron en los respectivos grupos de acuerdo al antígeno, al fármaco y a la dosis del fármaco (Tabla 1). Los ratones inmunizados con toxoide tetánico fueron preinmunizados 7 días previo al comienzo del ensayo, se administró la misma dosis mencionada en la tabla 1. Para la administración por vía oral de DEC y de AZA, se utilizaron jeringas de 1 ml (TERUMO, Insulina) y como sonda gastrointestinal un catéter jelco de plástico (Ref. 4050, 22G, 25 mm, Johnson & Johnson). La DEC fue administrada en una dosis de 25 µg equivalente a la dosis estándar administrada en el humano (50 mg) y en una dosis alta de 250 µg, equivalente a la dosis terapéutica mas alta utilizada en el humano (500 mg), comenzando inmediatamente después del estímulo antigénico. Este tratamiento se realizó durante 7 días. Los ratones fueron sangrados por punción del plexo retroorbital, utilizando pipetas Pasteur nuevas, los días 0, 7, 10, 14, 21, 28 y 35 post-inmunización para la determinación de anticuerpos y a las 0, 24 y 48 horas post-inmunización para la determinación de la concentración de citocinas. Se obtuvieron aproximadamente 500 µl de sangre completa de cada uno de los ratones, los sueros fueron obtenidos por centrifugación (BECKMAN, Allegra 64R) a 4°C y a 12 000 rpm por 10 minutos, posteriormente se almacenaron a temperatura de -20°C para determinación de anticuerpos y para la determinación de citocinas los sueros fueron separados en 5 alícuotas y almacenadas a -70°C.

MODELO MURINO PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS Y CITOCINAS		
GRUPOS	**Antígeno Timo-dependiente Toxoide Tetánico**	**Antígeno Timo-Independiente LPS (*E. coli*)**
Control (-)	No inmunizados, no tratados	
Control antígeno	Toxoide Tetánico 0.3 UI [1]	LPS 10 μg[1]
Control fármaco	DEC 25 μg[2]	
DEC <	Toxoide Tetánico[1] + DEC 25 μg[2]	LPS[1] + DEC 25 μg[2]
DEC >	Toxoide Tetánico[1] + DEC 250 μg[2]	LPS[1] + DEC 250 μg[2]
AZA Testigo	Toxoide Tetánico[1] + AZA 250 μg[2]	LPS[1] + AZA 250 μg[2]

Tabla 1. MODELO MURINO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS Y CITOCINAS. Condiciones experimentales del modelo murino utilizado para la determinación de anticuerpos y citocinas en suero: Dosis de DEC y del inmunosupresor testigo (AZA) en los diferentes grupos estudiados. [1] Administración vía subcutánea, [2] administración vía oral. n=10.

5.5 Respuesta inmune humoral: Determinación de anticuerpos por ensayo inmunoenzimático (ELISA) anti-TT y anti-LPS.

La estandarización de ambos inmunoensayos se realizó siguiendo la técnica para el ELISA establecido en el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario de la U. A. N. L., el cual fue originalmente desarrollado para la detección de anticuerpos contra *Nocardia brasiliensis* y es la metodología estándar del laboratorio[64].

5.5.1 Determinación de anticuerpos anti-Lipopolisacárido

5.5.1.1 Obtención de sueros controles de ratón anti-LPS

Se estableció un esquema de inmunización para la obtención de los sueros controles negativo y positivo. Cinco ratones de la cepa singénica BALB/c fueron inmunizados por vía subcutánea con 10 µg de LPS disueltos en solución salina estéril 0.9% (Solución CS, PiSA) emulsificados con adyuvante completo de Freund (cat. SIGMA F5881) el día cero, y con adyuvante incompleto de Freund (cat. SIGMA F5506) los días 7, 14, 21 y 28. Los ratones fueron sangrados los días cero, 28 y 35 post-inmunización. El suero del día cero fue etiquetado como suero control negativo y los sueros de los días 28 y 35 como suero control positivo.

5.5.1.2 Inmunoensayo

5.5.1.2.1 Fijación del Antígeno

Se utilizaron microplacas ELISA de 96 pozos de poliestireno de fondo plano (COSTAR 3590). La concentración del LPS final para el ELISA fue de 0.3 µg por pozo, por lo que se añadieron 200 µl de una solución 50 mg/ml de LPS en buffer carbonatos a pH 9[65]. Posteriormente la microplaca se incubó a 2-8°C por 12 h. El contenido fue descartado y se realizaron 3 lavados de 10 minutos y 3 de 1 minuto con solución de lavado (Buffer PBS-Tween 1:1000). Posteriormente se añadieron 200 µl/pozo de solución bloqueadora (Buffer PBS-Tween 20 1:1000 y leche descremada al 5%), se incubó por 1 hora. Se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 minutos y 3 de un minuto. Las microplacas con el antígeno fijado se conservaron a -20°C hasta su uso posterior.

5.5.1.2.2 Sueros

A cada pozo se añadieron 200 µl de los sueros de prueba diluidos en solución bloqueadora en una relación de 1:5, con sus respectivos controles positivo y negativo. Se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos y 3 de 1 minuto, como se mencionó anteriormente.

5.5.1.2.3 Anticuerpos Conjugados Anti-ratón

Para la determinación de anticuerpos totales se agregaron 200 µl del anticuerpo polivalente anti-ratón conjugado a la peroxidasa (cat. SIGMA A0412) diluido 1:10 000 en solución bloqueadora (Solución PBS-Tween 20 y leche descremada al 1%). Para la determinación de anticuerpos IgG se agregaron 200 µl del conjugado IgG anti-ratón conjugado a la peroxidasa (cat. SIGMA A2554) diluido 1:70 000 en solución bloqueadora. Se incubó 1h a 37 °C. Después de la incubación se lavó como se mencionó anteriormente.

5.5.1.2.4 Sustrato

El sustrato OPD (Dihidro-cloruro de o-fenildiamina, cat. SIGMA P9187) fue disuelto en 20 ml de agua destilada, y se añadieron 100 µl de este. Se incubó en obscuridad a temperatura ambiente por 30 min. La reacción fue detenida con 25 µl H_2SO_4 al 0.1 M y se determinó la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un lector para microplacas ELISA (Microassay Reader, DIAMEDIX BP-96).

5.5.2 Determinación de anticuerpos anti-Toxoide tetánico

5.5.2.1 Obtención de sueros controles de ratón anti-T

Se estableció un esquema de inmunización para la obtención de los sueros controles negativo y positivo, respectivamente. 5 ratones de la cepa singénica BALB/c fueron inmunizados por vía subcutánea con 0.3 UI de TT en solución salina estéril 0.9% (Solución CS, PiSA) emulsificados con adyuvante completo de Freund (cat. SIGMA F5881) el día cero, y con adyuvante incompleto de Freund (cat. SIGMA F5506) los días 7, 14, 21 y 28. Los ratones fueron sangrados los días 0, 28 y 35. El suero del día cero fue etiquetada como suero control negativo y los sueros de los días 28 y 35 como suero control positivo.

5.5.2.2 Inmunoensayo

5.5.2.2.1 Fijación del Antígeno

Se utilizaron microplacas ELISA de 96 pozos de poliestireno de fondo plano (COSTAR 3590). Se añadieron 50 µl de una solución de TT 15 UI diluida en Buffer PBS pH 7.4. La concentración del TT final para el ELISA fue de 0.3 UI por pozo. Posteriormente la microplaca se incubó a 2-8°C por 12 h. El contenido fue descartado y se realizaron 3 lavados de 10 minutos y 3 de 1 minuto con solución de lavado (Buffer PBS-Tween 1:1000). Posteriormente se añadió 50 µl/pozo de solución bloqueadora (Buffer PBS-Tween 20 1:1000 y leche descremada Svelty al 5%), se dejó incubando por 1 h a 37°C. Se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 minutos y 3 de un minuto con solución lavadora. La microplaca se conservó a 2-8°C hasta su posterior uso.

5.5.2.2.2 Suero

Se añadieron 50 µl/pozo de los sueros control (positivo y negativo) y los sueros de prueba diluidos en solución bloqueadora en una relación de 1:5. Se incubó 2 h a 37 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos y 3 de un minuto, como se mencionó anteriormente.

5.5.2.2.3 Anticuerpos conjugados anti-ratón

Para la determinación de anticuerpos totales se añadieron 50 µl de un anticuerpo polivalente anti-ratón conjugado a la peroxidasa (cat. SIGMA A0412) diluido 1:10 000 en solución bloqueadora (Solución PBS-Tween 20 y leche descremada Svelty al 1%). Para la determinación de anticuerpos IgG se agregaron 50 µl del anticuerpo IgG anti-ratón conjugado a la peroxidasa (cat. SIGMA A2554) diluido 1:70 000 en solución bloqueadora. Se dejó incubar 2h a 37 °C. Después de la incubación se realizaron los lavados como se mencionó anteriormente.

5.5.2.2.4 Sustrato

El sustrato OPD (Dihidrocloruro de o-fenildiamina, cat. SIGMA P9187) fue disuelto en 20 ml de agua destilada, y se añadieron 50 µl/pozo. Se incubó en obscuridad a temperatura ambiente por 30 min. La reacción fue detenida con 25 µl H_2SO_4 al 0.1 M y se determinó la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un lector para microplacas ELISA (Microassay Reader, DIAMEDIX BP-96).

5.6 Determinación de la producción de citocinas *in vivo* por ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Los sueros de los ratones tomados a las cero, 24 y 48 horas post-inmunización, fueron almacenados a -70°C, posteriormente descongelados para llevar a cabo la determinación de las concentraciones de las siguientes citocinas: IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN-γ, mediante la técnica de ELISA comercial. Las determinaciones se realizaron según las especificaciones del fabricante incluidas en los kits para cada una de las citocinas. Los kits utilizados fueron los siguientes: IL-6 (Mouse Interleukin-6 ELISA, EM2IL62, PIERCE), IL-2 (Mouse Interleukin-2 ELISA, EMIL22, PIERCE), IL-10 (Mouse Interleukin-10 ELISA, EM2IL10, PIERCE) IL-12 (Mouse Interleukin 12 p70 ELISA, EMIL122, PIERCE), IFN-γ (Mouse IFN gamma ELISA, EM10012, PIERCE).

5.7 Determinación del estallido respiratorio de fagocitos de sangre periférica

5.7.1 Modelo Murino

Dos grupos controles y dos grupos de prueba, cada uno con 5 ratones BALB/c, en donde el primer grupo es el control, el segundo grupo incluyó ratones tratados con 0.1 ml de solución salina, y los grupos de prueba incluyeron ratones a los que se les administró una dosis de 85 µg y una de 170 µg de DEC (equivalentes a una dosis de 200 mg y una dosis alta de 400 mg en el humano) en 0.1 ml de solución salina (Tabla 2).

MODELO MURINO PARA EVALUACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO	
Grupo	**Tratamiento v. o.**
1	Ninguno
2	S. Salina
3	DEC 85 µg *
4	DEC 170 µg*
5	DEC 85 µg**
6	DEC 170 µg**

Tabla 2. MODELO MURINO PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO: Condiciones experimentales del modelo murino utilizado para la evaluación del estallido respiratorio de granulocitos y monocitos de sangre periférica de ratón. Dosis baja, sangrados a la h *. Dosis alta, sangrados a la h *. Dosis baja, sangrados a las 2½ h **. Dosis alta, sangrados a las 2½ h **.

5.7.2 Tratamiento con Dietilcarbamazina

El experimento comenzó con el tratamiento por vía oral de cada uno de los grupos: los ratones del grupo 2 fueron tratados con 0.1 ml de solución salina al 0.9% (Solución CS, PiSA), los del grupo 3 y 5 tratados con una dosis equivalente a 200 mg de DEC. Los del grupo 4 y 6 tratados con la dosis equivalente a 400 mg de DEC en 0.1 ml de solución salina al 0.9% (Solución CS, PiSA). Los ratones fueron sangrados a la hora y a las 2:30 h posteriores a la administración del fármaco (Tabla 2). La obtención de sangre periférica por punción del plexo retroorbital se realizó tal como se menciona en el punto 5.4.

5.7.3 Determinación del anión superóxido por la técnica 123-dihidro-rodamina mediante citometría de flujo.

La técnica de determinación del estallido respiratorio (anión superóxido) mediante la tinción con 123-dihidro-rodamina fue desarrollada por Emmendörffer[66,67] utilizando la citometría de flujo para la obtención de la intensidad media de fluorescencia emitida por las células fagocíticas luego de la estimulación con éster forbólico del ácido mirístico (PMA) y Zimosan (ZIM).

Obtención de leucocitos

Se obtuvieron 700 µl de sangre completa en tubos con EDTA. Se añadieron 7 ml de solución de lisis previamente incubada a 37°C (FACS, BECTON DICKINSON). Se agitó ligeramente y se dejó incubando por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 1 300 rpm (Centrífuga, EPPENDORF 5403), el sobrenadante fue descartado y el botón celular se lavó con buffer PBS pH 7.4, se centrifugó, y se repitió el lavado 2 veces mas. Posteriormente las células se resuspendieron en 7 ml de PBS pH 7.4 para una concentración final aproximada de 2.5 x 10^6 células/ml. Para cada ratón se analizaron 7 eventos como se muestra en la tabla 3.

PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO	
Tubo	**Contenido Muestra**
1	Células sin estimular
2	Células estimuladas con éster forbólico del ácido mirístico (PMA)
3	Células estimuladas con Zimosan (ZIM)
4	Células teñidas con 123-Dihidro-rodamina (DHR)
5	Células estimuladas con PMA y teñidas con DHR
6	Células estimuladas con ZIM y teñidas con DHR
7	Células estimuladas con PMA y ZIM y teñidas con DHR

Tabla 3. PROTOCOLO DE EVALUACIÓN PARA EL ESTALLIDO RESPIRATORIO: Contenido de cada una de las muestras a adquirir y analizar por citometría de flujo.

5.7.4 Estimulación con PMA o con Zimosan

Se utilizó el éster forbólico del ácido mirístico (PMA, Phorbol-myristate acetate, cat. SIGMA P8139), el cual fue preparado en una concentración de 2 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO, cat. SIGMA D5879) y posteriormente diluido en una relación de 1:100 en PBS pH 7.4. Fue almacenado en varias alícuotas de 100 µl a -20°C. Se añadieron 10 µl de esta dilución a los tubos correspondientes, como se muestra en tabla 3. Además se utilizó Zimosan (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*, cat. SIGMA Z4250), el cual se preparó con 12.5 mg de este en 1 ml de solución salina estéril al 0.9% (Solución CS, PiSA). Se añadieron 10 µl a los diferentes tubos (Tabla 3). Posteriormente se dejó incubar por 10 min. a 37°C.

5.7.5 Tinción con 1, 2, 3 - Dihidro-rodamina

La 123-DHR (cat. SIGMA D1054) fue disuelta en N,N-dimetilformamida (cat. SIGMA D4551) en una concentración de 15 µg/ml y se almacenó en volúmenes de 20 µl a -20°C, cada una de estos fue diluido en 1 ml de buffer PBS pH 7.4. Se añadieron 5 µl de esta solución a los tubos correspondientes (Tabla 3), se dejó incubar por 15 minutos a 37°C.

5.7.6 Adquisición y Análisis de Muestras.

La medición de la intensidad media de fluorescencia de las células se realizó utilizando un Citómetro de flujo marca Becton Dickinson modelo FACsort, utilizando el software Cellquest. Se adquirieron 10 000 eventos para cada uno de los tubos, en el orden anteriormente mencionado en la tabla 3. Se analizaron dos regiones: la región correspondiente a los granulocitos-neutrófilos y la correspondiente a los monocitos. Los resultados se obtuvieron mediante el análisis estadístico de la intensidad media de fluorescencia y porcentaje de células que fueron detectados para ambas poblaciones celulares en histogramas de intensidad de fluorescencia.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para la validación de los resultados obtenidos en las determinaciones de anticuerpos, citocinas y estallido respiratorio se aplicó la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney para determinar si existe diferencia significativa entre los grupos estudiados. Los datos fueron alimentados en una computadora personal Toshiba satellite con el uso de los paquetes estadísticos SPSS (versión 10.00 para Windows, 1998) y Excel (Office 2000).

VI. RESULTADOS

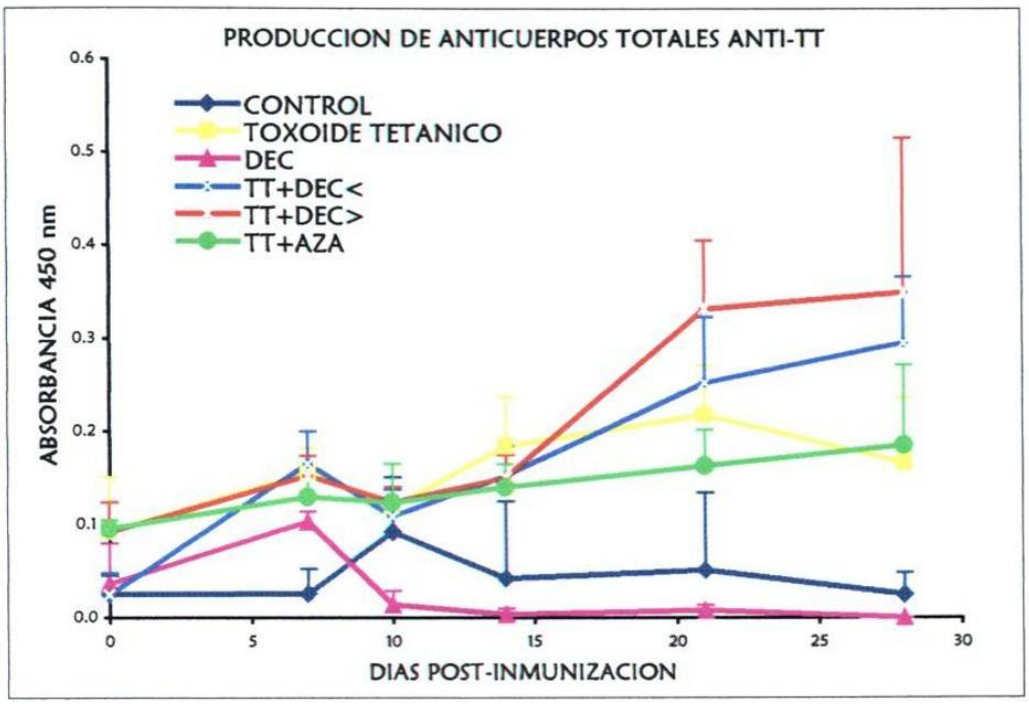
6.1 Determinación de anticuerpos ANTI-LPS y ANTI-TT por inmunoensayo enzimático (ELISA).

6.1.1 Anticuerpos totales anti-TT.

Se utilizaron 6 grupos con 7 ratones de la cepa BALB/c inmunizados con TT según las condiciones descritas en material y métodos. La gráfica 1 muestra los resultados obtenidos en la determinación de la producción de anticuerpos totales anti-TT. Como se puede apreciar el grupo de ratones inmunizados con TT y tratados con DEC, en dosis tanto alta como baja, mostraron una producción de Ac mayor que el grupo control de antígeno. De acuerdo al análisis estadístico esta diferencia entre los grupos con DEC y el control es estadísticamente no significativa ($p \geq 0.001$). El grupo testigo (AZA) tuvo un comportamiento similar al control de antígeno y los grupos no estimulados antigénicamente no presentan producción de Ac, no encontrándose así diferencia entre estos dos grupos (ver tabla 4).

6.1.2 Anticuerpos IgG anti-TT.

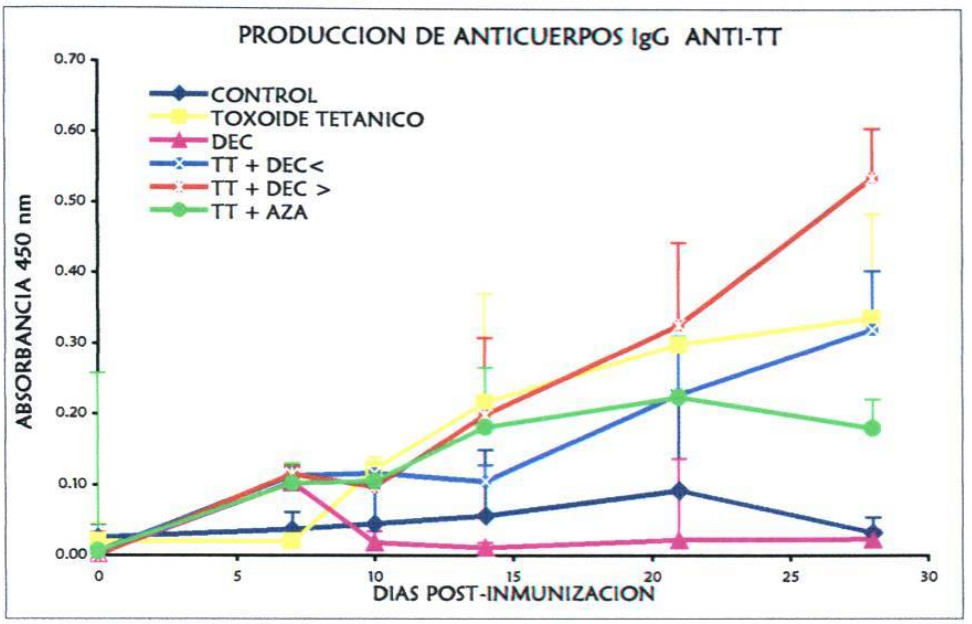
La gráfica 2 muestra la producción de Ac IgG específicos anti-TT. Puede observarse que la producción de estos Ac es similar a la producción de Ac totales anti-TT (gráfica 1). Como puede observarse, el grupo que recibió una dosis alta de DEC presenta una producción de 0.5 veces mas que el control antigénico, pero la diferencia entre estos dos grupos no es estadísticamente significativa ($p \geq 0.001$). Además, tanto el grupo que recibió una dosis baja de DEC, como el grupo testigo tuvieron una producción similar a la del control antigénico, y los grupos no estimulados antigénicamente, no presentan producción de Ac (ver tabla 5).



GRAFICA 1. Producción de anticuerpos totales específicos anti-TT determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA), de acuerdo a lo descrito en material y métodos. n=7.

GRUPO n=7	ANTICUERPOS TOTALES ANTI-TOXOIDE TETÁNICO					
	Día 0	Día 7	Día 10	Día 14	Día 21	Día 28
Control	0.02±0.02*	0.03±0.03*	0.09± 0.06*	0.04± 0.08*	0.05± 0.08*	0.03± 0.02*
TT	0.09±0.06*	0.16± 0.03*	0.12± 0.02*	0.18 ± 0.05*	0.22± 0.05*	0.20± 0.07*
DEC	0.04±0.04*	0.10± 0.01*	0.01± 0.01*	0.03± 0.01*	0.01± 0.01*	0.00± 0.00*
DEC <	0.02±0.02*	0.17± 0.03*	0.11±0.03 *	0.15± 0.03*	0.15± 0.07*	0.30± 0.07*
DEC >	0.09±0.03*	0.15± 0.02*	0.12± 0.02*	0.15± 0.02*	0.25± 0.07*	0.35± 0.17*
AZA	0.09±0.01*	0.13± 0.02*	0.12± 0.04*	0.14± 0.02*	0.30± 0.04*	0.20± 0.0*

TABLA 4. Valores numéricos para la producción de anticuerpos totales de ratón específicos anti-TT, determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la observación de la *desviación estándar.



GRAFICA 2. Producción de anticuerpos IgG específicos anti-TT determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA), de acuerdo a lo descrito en material y métodos. n=7.

GRUPO n=7	ANTICUERPOS IgG ANTI-TOXOIDE TETÁNICO					
	Día 0	Día 7	Día 10	Día 14	Día 21	Día 28
Control	0.03±0.02*	0.04±0.02*	0.05±0.06*	0.06±0.09*	0.09±0.14*	0.03±0.02*
TT	0.02±0.03*	0.02±0.01*	0.12±0.02*	0.22±0.15*	0.30±0.00*	0.34±0.15*
DEC	0.00±0.02 *	0.10±0.01*	0.02±0.02*	0.01±0.01*	0.02± 0.12*	0.02±0.01*
DEC <	0.01±0.02*	0.11±0.01 *	0.12±0.01*	0.11±0.02*	0.23±0.08*	0.32±0.08*
DEC >	0.00±0.03*	0.12±0.01*	0.10±0.02*	0.20±0.11*	0.33±0.00*	0.54±0.07*
AZA	0.01±0.25*	0.10±0.03*	0.11±0.02*	0.18±0.08*	0.23±0.12 *	0.18±0.04*

TABLA 5. Valores numéricos para la producción de anticuerpos IgG de ratón específicos anti-TT, determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la observación de la *desviación estándar.

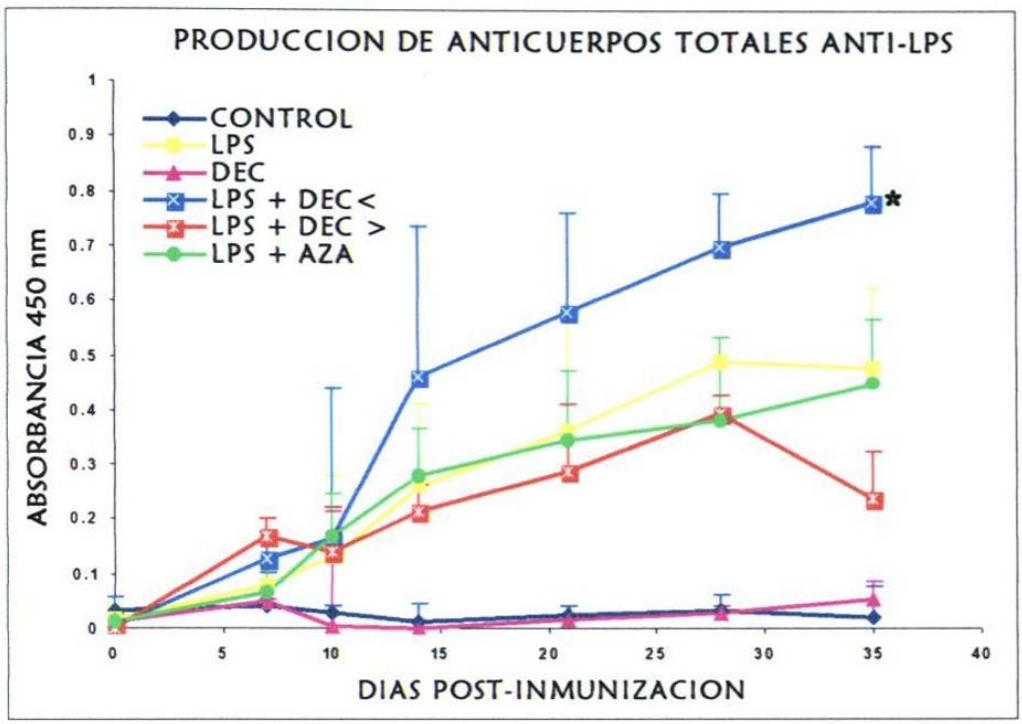
6.1.3 Anticuerpos totales anti-LPS.

En cuanto a la determinación de Ac totales anti-LPS, se observa que el grupo de ratones tratado con una dosis baja de DEC tiene una producción aumentada de Ac aproximadamente 2 veces mayor que el grupo control antigénico y los otros grupos estimulados antigénicamente (dosis alta de DEC y testigo). Este aumento se observa a partir del día 14, pero resulta ser estadísticamente significativo hasta el día 21 ($p \leq 0.001$) en comparación con el control de antígeno (gráfica 3). El grupo testigo se comportó similar al control antigénico (ver tabla 5) .

6.1.4 Anticuerpos IgG anti-LPS.

En la determinación de Ac IgG anti-LPS, obtuvimos resultados muy similares a los obtenidos en la determinación de Ac totales anti-LPS (gráfica 4). Estos resultados muestran que la DEC en una dosis baja estimuló la producción de Ac, ya que puede observarse un aumento en la producción de estos a partir del día 14, y hasta el día 21 esta diferencia es estadísticamente significativa (aproximadamente el aumento es 2 veces mas, $p \leq 0.001$) en comparación con el control antigénico (ver tabla 7).

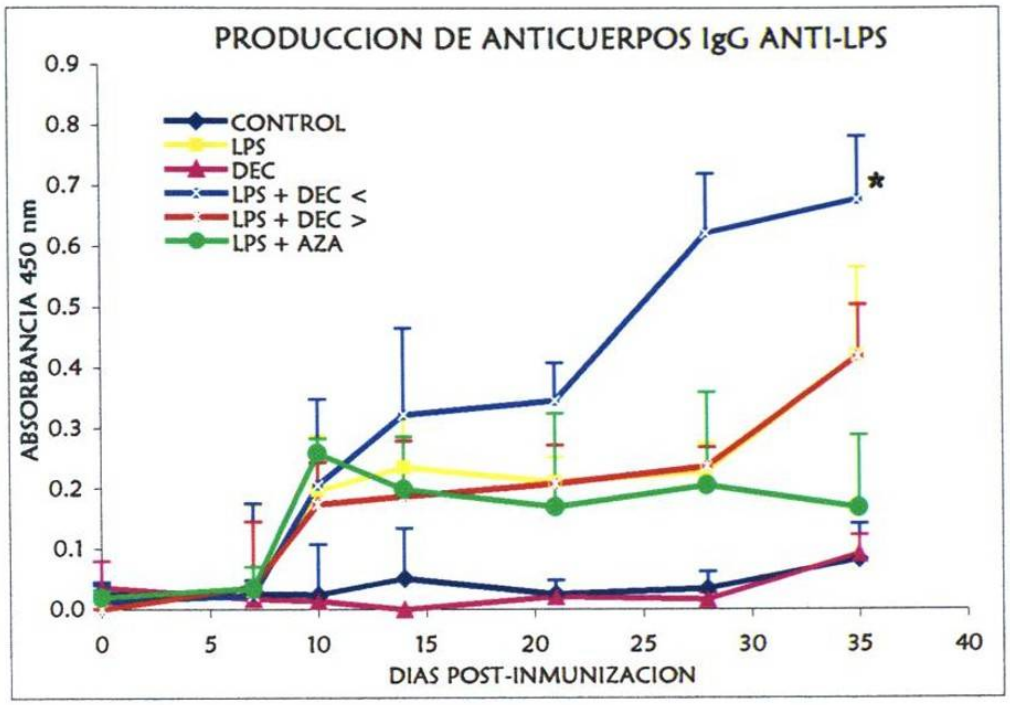
En el grupo testigo con AZA pudimos observar que la producción de anticuerpos fue similar a la del control de antígeno en ambos casos (TT/LPS), esto podría deberse a que se administró AZA solamente por una semana, y para provocar inmunosupresión de la respuesta inmune en estos, la AZA se administra por tiempo mas prolongado, alrededor de cuatro semanas[68]. Para nuestro estudio no fue relevante el hecho de que el grupo testigo no estuviera inmunosuprimido, solo quisimos comparar el efecto de un inmunosupresor con el efecto de la DEC, bajo las mismas condiciones experimentales; en este sentido los resultados fueron como se esperaban, es decir, la producción de Ac fue menor o igual que el grupo control.



GRAFICA 3. Producción de anticuerpos totales específicos anti-LPS determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA), de acuerdo a lo descrito en material y métodos. n=7, *p ≤ 0.001 en comparación con los controles negativo y de antígeno.

GRUPO n=7	ANTICUERPOS TOTALES ANTI-LPS						
	Día 0	Día 7	Día 10	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
Control	0.02±0.03*	0.03±0.06*	0.01±0.01*	0.02±0.03*	0.03±0.02*	0.03±0.03*	0.02±0.06*
LPS	0.02±0.03*	0.13±0.03*	0.26±0.15*	0.36±0.15*	0.49±0.22*	0.49±0.05*	0.48±0.15*
DEC	0.04±0.02*	0.01±0.01*	0.00±0.21*	0.02±0.00*	0.03±0.01*	0.03±0.01*	0.05±0.03*
DEC <	0.01± 0.01*	0.16±0.05*	0.46±0.28*	0.58±0.27*	0.70±0.18*	0.70±0.10*	0.78±0.10*
DEC >	0.00±0.00*	0.14±0.04 *	0.22±0.08*	0.7± 0.05*	0.40±0.12*	0.40±0.03*	0.24±0.08*
AZA	0.04±0.01*	0.17±0.05*	0.26±0.08*	0.78±0.09*	0.38±0.13*	0.38±0.15*	0.45±0.12*

TABLA 6. Valores numéricos para la producción de anticuerpos totales de ratón específicos anti-LPS, determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA). *Desviación estándar.



GRAFICA 4. Producción de anticuerpos IgG específicos anti-LPS determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA), de acuerdo a lo descrito en material y métodos. n=7, *p ≤ 0.001 en comparación con los controles negativo y de antígeno.

GRUPO n=7	ANTICUERPOS IgG ANTI-LPS						
	Día 0	Día 7	Día 10	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
Control	0.02±0.02*	0.03± 0.02*	0.02± 0.08*	0.05±0.08 *	0.03±0.02 *	0.03± 0.03*	0.08± 0.06*
LPS	0.02± 0.01*	0.03± 0.14*	0.20± 0.09*	0.24± 0.08*	0.21± 0.04*	0.23± 0.05*	0.42± 0.15*
DEC	0.04± 0.04*	0.02± 0.01*	0.01± 0.01*	0.00±0.00*	0.02± 0.01*	0.02± 0.01*	0.09± 0.03*
DEC <	0.01± 0.03*	0.02± 0.15*	0.21± 0.14*	0.32± 0.14*	0.35± 0.06*	0.62± 0.10*	0.68± 0.10*
DEC >	0.00±0.00*	0.04± 0.11*	0.17± 0.07*	0.19± 0.09*	0.21± 0.06*	0.24± 0.03*	0.42± 0.08*
AZA	0.02± 0.01*	0.03± 0.04*	0.26± 0.02*	0.20± 0.09*	0.17± 0.15*	0.21± 0.15*	0.17± 0.12*

TABLA 7. Valores numéricos de la producción de anticuerpos IgG de ratón específicos anti-LPS, determinados por ensayo inmunoenzimático (ELISA). * Desviación estándar.

6.2 Determinación de la concentración de citocinas

6.2.1 Determinación de citocinas en ratones inmunizados con TT

Se utilizaron 5 grupos de 5 ratones BALB/c los cuales fueron inmunizados con TT. Se determinó la concentración de las citocinas IL-2, IFN-γ, IL-10 e IL-12 a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la inmunización. Esto se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático comercial (ELISA), de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

6.2.1.1 Producción de IL-2

En relación a la determinación de la concentración de IL-2 en suero de ratones inmunizados con TT, esta se realizó a las cero, 24 y 48 horas, mediante un inmunoensayo enzimático y se utilizaron grupos de 5 ratones, según se describe en material y métodos. Según se observa en la gráfica 5 la DEC en dosis baja estimuló la producción de la IL-2 a las 24 horas. Esta producción muestra diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) con el control negativo (gráfica 5). El resto de los grupos no presenta diferencias (ver tabla 8).

6.2.1.2 Producción de IFN-γ

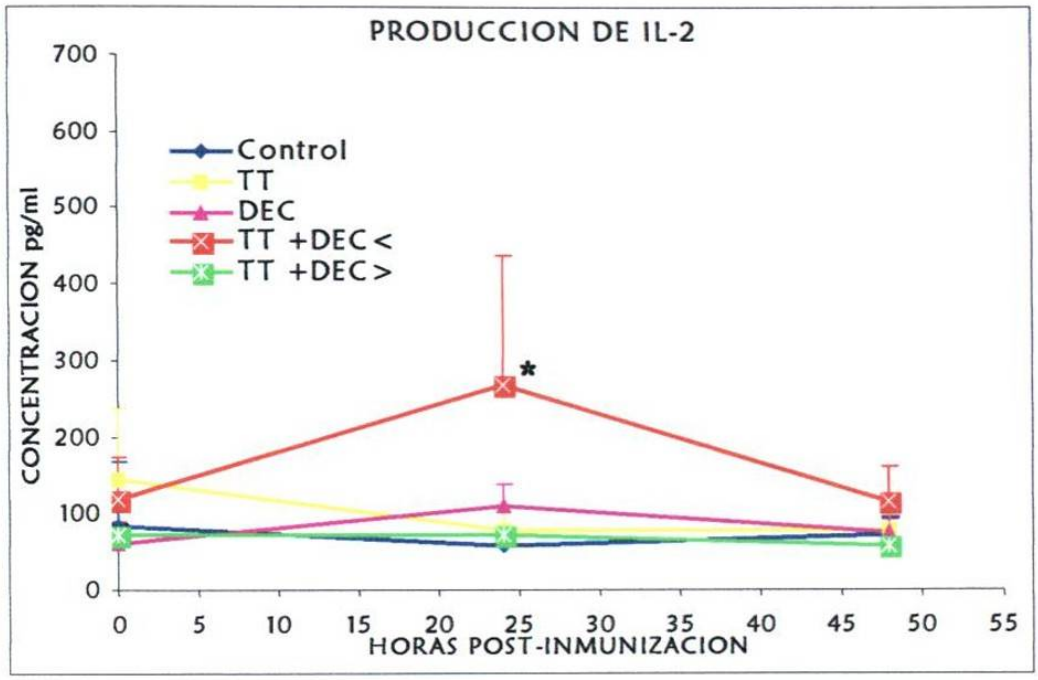
En esta determinación no detectamos niveles significativos de IFN-γ, en ninguno de los grupos observamos producción de esta citocina (ver gráfica 6 y tabla 9).

6.2.1.3 Producción de IL-12

De acuerdo a los resultados de este experimento, observamos que el grupo de ratones que recibió la DEC presentó una producción de IL-12 mayor que el resto de los grupos. Esta diferencia en comparación con el grupo control negativo, es estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) tal como se muestra en la gráfica 7 (Ver tabla 10).

6.2.1.4 Producción de IL-10

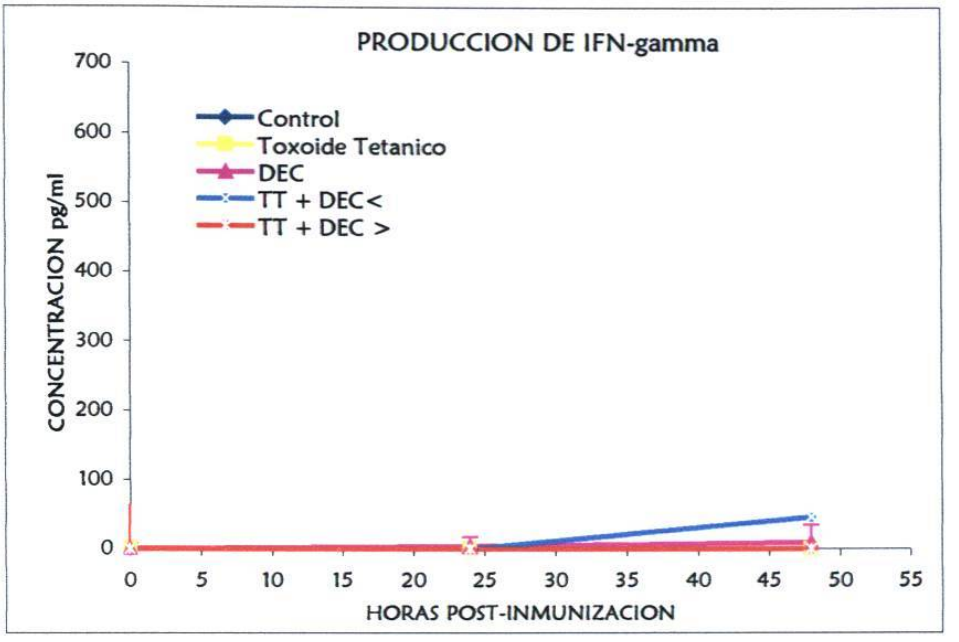
Los resultados obtenidos en la producción de IL-10 se muestran en la gráfica 8, se puede observar que aunque hubo producción de esta citocina, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados (ver gráfica 8 y tabla 11).



GRAFICA 5. Producción de IL-2 en suero de ratones inmunizados con TT. n=5, * p ≤ 0.001 en comparación con el control negativo, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA) según se describe en material y métodos.

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE IL-2		
HORA	0	24	48
Control (-)	83.00±85.37 *	57.20± 17.46*	71.44± 24.59*
Toxoide tetánico	143.22±93.28 *	78.58± 27.04*	76.76± 28.49*
DEC	60.12± 29.53*	108.36± 31.30*	76.12± 17.16*
LPS + DEC<	117.90± 54.49*	267.88± 170.53*	116.34± 46.07*
LPS + DEC>	71.22± 16.42*	71.22± 9.64*	57.46± 5.93*

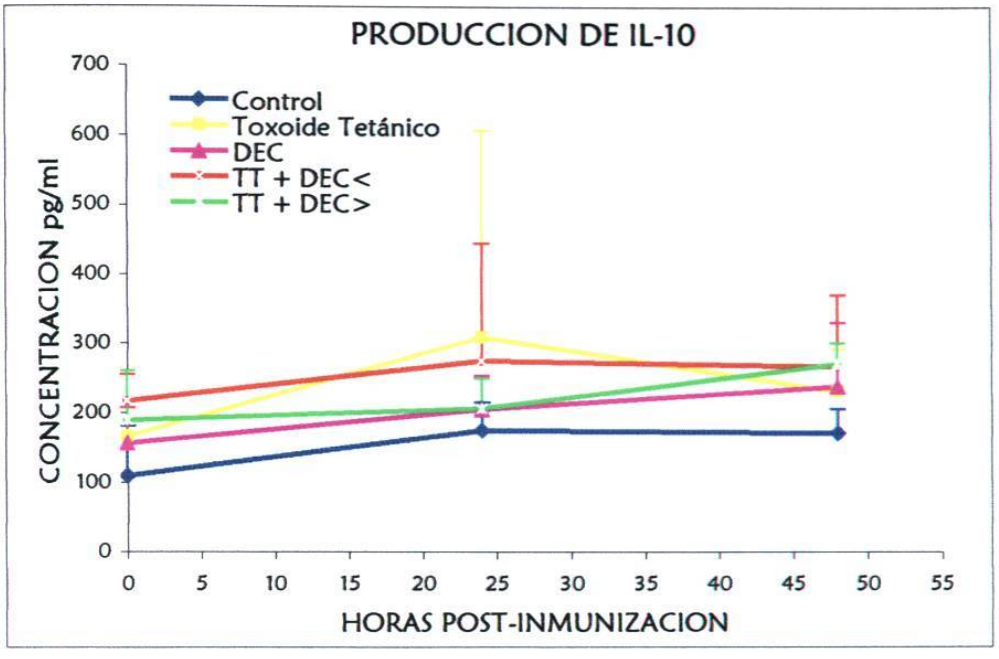
TABLA 8. Valores numéricos de la producción de IL-2 en suero de ratones inmunizados con TT, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.



GRAFICA 6. Producción de IFN-γ en suero de ratones inmunizados con TT, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. n=5.

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE INF-γ		
HORA	0	24	48
Control (-)	0.00±0.00*	0.00± 0.00*	0.00± 0.55*
Toxoide tetánico	0.00± 0.00*	0.00± 0.00*	0.00± 186.80*
DEC	0.00± 7.92*	3.54± 13.74*	9.06± 25.37*
LPS + DEC<	0.00± 63.28*	0.00± 0.00*	45.94± 0.00*
LPS + DEC>	0.00± 0.00*	0.00±0.00 *	0.00± 0.00*

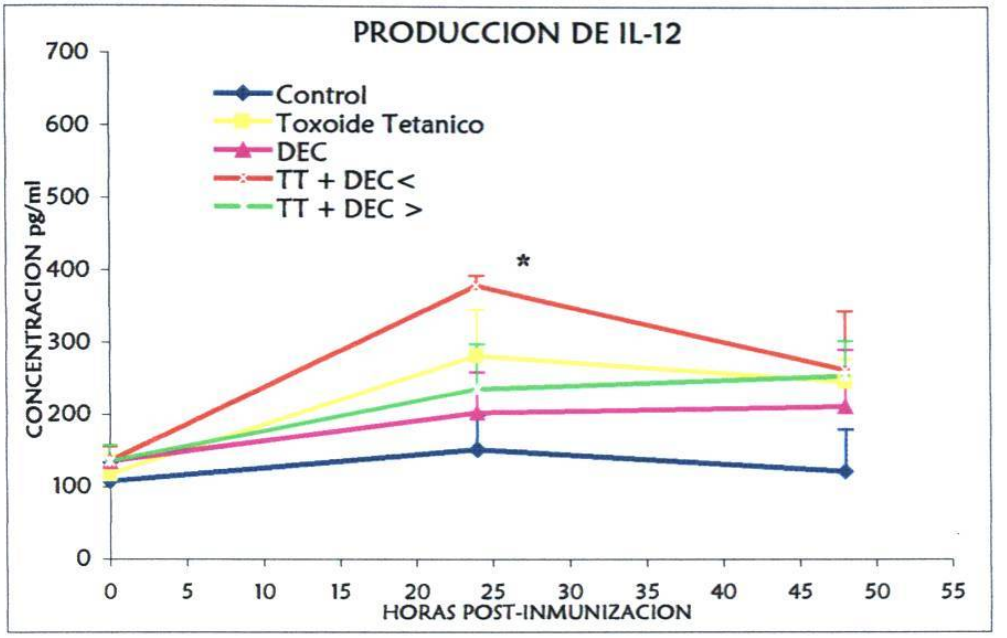
TABLA 9. Valores numéricos de la producción de IFN-γ en suero de ratones inmunizados con TT, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.



GRAFICA 7. Producción de IL-10 en suero de ratones inmunizados con TT, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. n=5.

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE IL-10		
HORA	0	24	48
Control (-)	109.00±72.03*	175.66±40.51*	171.66± 35.38*
Toxoide tetánico	165.66±40.09 *	309.64±298.28*	231.66± 60.81*
DEC	155.68±52.04*	205.68±48.50*	239.02± 92.36*
LPS + DEC<	216.98±38.53*	275.66±169.78*	267.66±103.86*
LPS + DEC>	189.00±71.67*	207.02±43.92*	271.48± 30.39*

TABLA 10. Valores numéricos de la producción de IL-10 en suero de ratones inmunizados con TT, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.



GRAFICA 8. Producción de IL-12 en suero de ratones inmunizados con TT, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. n=5, * $p \leq 0.001$ en comparación con el control de antígeno.

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE IL-12		
HORA	0	24	48
Control (-)	107.38± 26.24*	152.38± 47.90*	121.88± 57.90*
Toxoide tetánico	117.63± 25.38*	281.80± 63.68*	245.80± 31.57*
DEC	134.88± 21.57*	203.13± 55.75*	211.88± 78.75*
LPS + DEC<	135.38± 20.36*	379.38± 13.85*	262.88± 80.83*
LPS + DEC>	135.13± 22.05*	235.88±62.75 *	254.38±48.29 *

TABLA 11. Valores numéricos de las producción de IL-12 en suero de ratones inmunizados con TT, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.

6.2.2 Determinación de citocinas en ratones inmunizados con LPS

Se utilizaron 5 grupos con 5 ratones BALB/c los cuales fueron inmunizados con LPS. Se determinó la concentración de las citocinas IL-2, IFN-γ, IL-10 e IL-12 en suero a las 0, 24 y 48 horas posteriores a la inmunización. Esto se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático comercial (ELISA), de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

6.2.2.1 Producción de IL-2

En cuanto a la producción de IL-12, como se observa en la gráfica 9, no hubo diferencia significativa entre los grupos estudiados. Algo que resalta en estos resultados es que a las 48 h no se detectan niveles de concentración de esta citocina en el grupo de ratones que recibieron una dosis baja de DEC (ver tabla 12).

6.2.2.2 Producción de IFN-γ

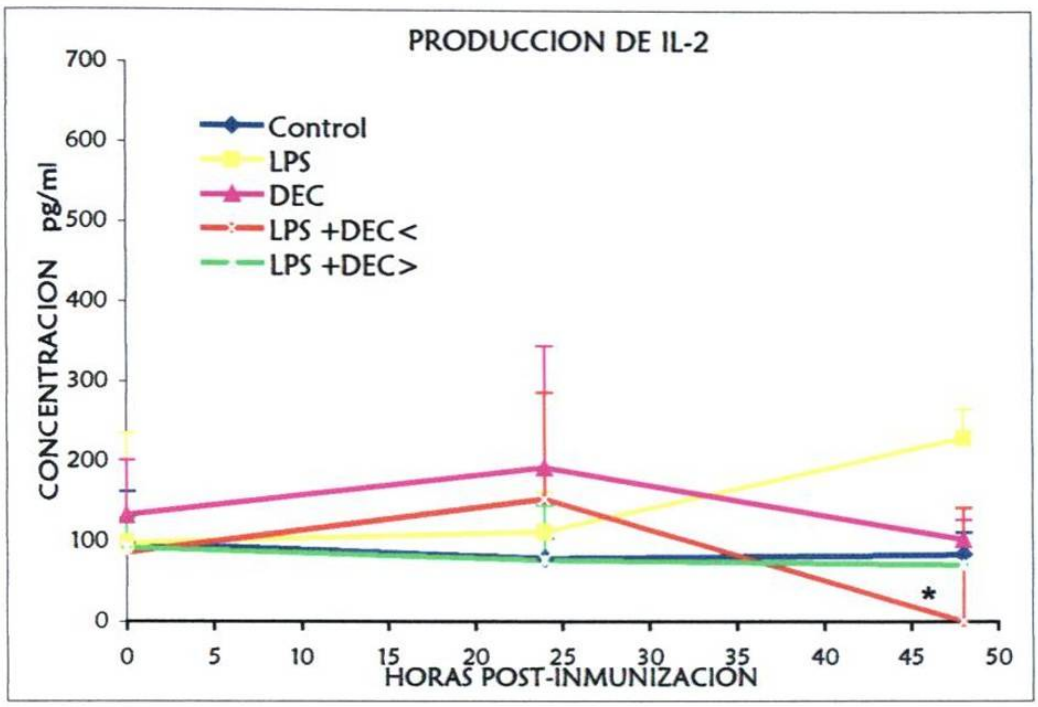
Los resultados expresados en la gráfica 10, muestran que no se detectaron niveles de concentración de IFN-γ en ninguno de los grupos estudiados en este experimento (ver tabla 13).

6.2.2.3 Producción de IL-12

En cuanto a la producción de IL-12 en suero de ratones inmunizados con LPS, se observa una diferencia significativa ($p \leq 0.001$) entre el grupo que recibió una dosis baja de DEC y el control negativo a las 48 h, entre los demás grupos como puede observarse no se presentaron diferencias significativas (ver gráfica 11 y tabla 14).

6.2.2.4 Producción de IL-10

Los resultados presentados en la gráfica 12 señalan que la concentración de IL-10 se encontró estimulada a las 24 h posteriores a la inmunización con LPS en los grupos a los que se les administró DEC en ambas dosis (gráfica 12). Esta producción muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) en comparación con los controles antigénico y negativo (ver tabla 15).



GRAFICA 9. Producción de IL-2 en suero de ratones inmunizados con LPS, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA). n=5, * No hubo detección de IL-2 a las 48 h.

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE IL-2		
HORA	0	24	48
Control (-)	97.64± 64.13*	79.00± 24.44*	83.9± 27.37*
LPS	98.12± 136.95*	112.12± 50.34*	230.54± 36.32*
DEC	132.78± 68.47*	192.58±153.02*	102.98± 24.16*
LPS + DEC<	85.89± 11.65*	153.36± 133.67*	0.27± 142.62*
LPS + DEC>	91.88± 36.31*	77.02± 68.67*	71.00± 13.34*

TABLA 12. Valores de la producción de IL-2 en ratones inmunizados con LPS, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.