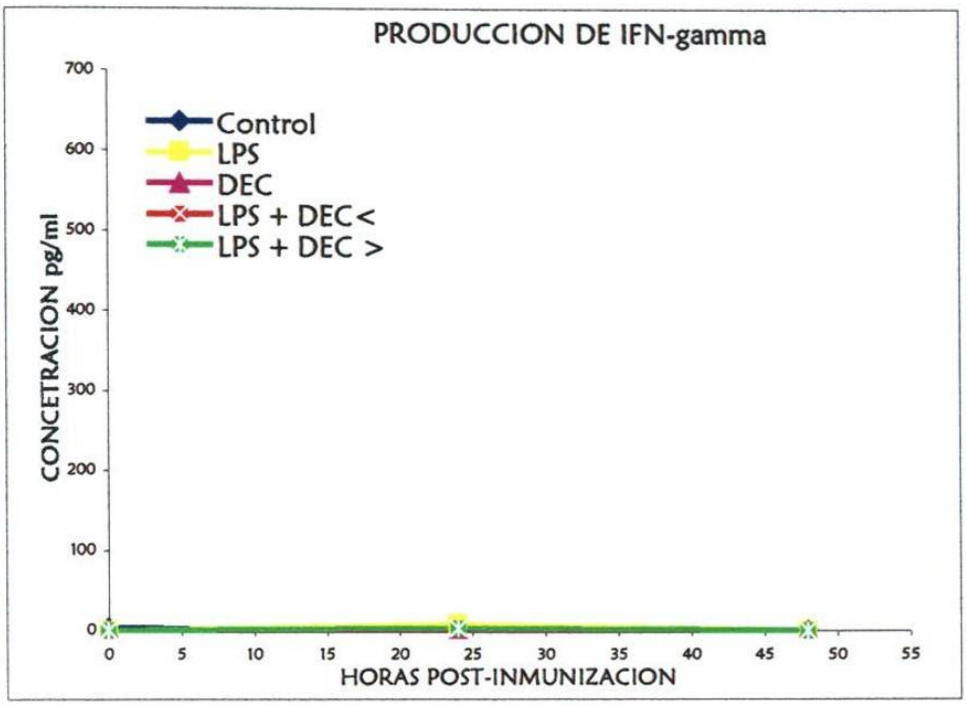
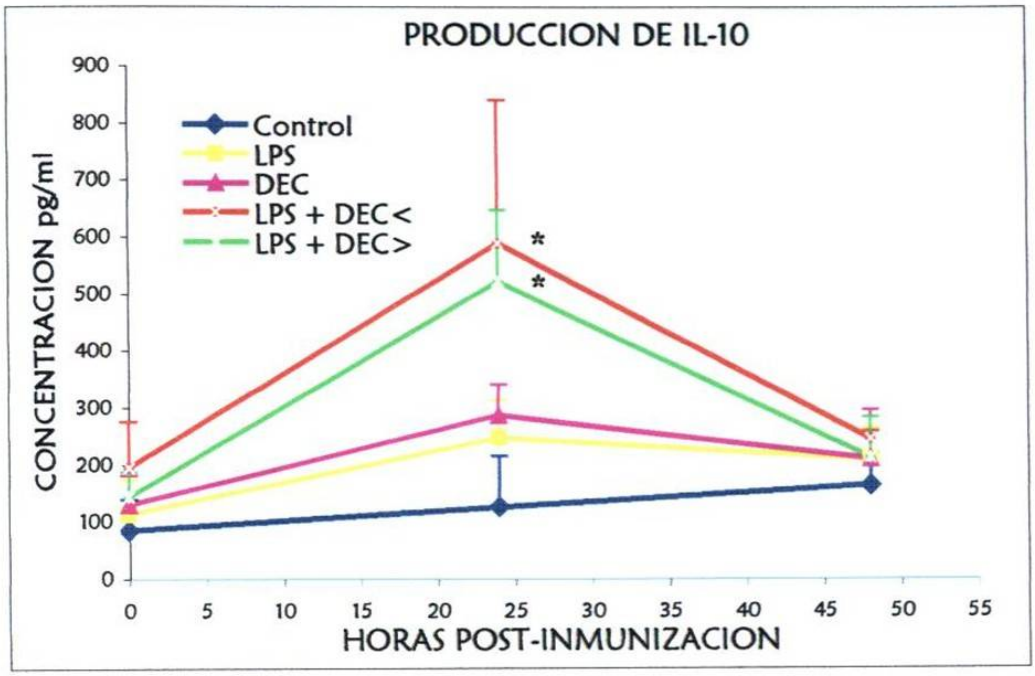


GRAFICA 10. Producción de IFN-γ en suero de ratones inmunizados con LPS, determinada por inmunoensayo enzimático (ELISA). n=5.

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE INF-γ		
HORA	**0**	**24**	**48**
Control (-)	3.00± 24.74*	0.00± 31.33*	0.00±0.00*
LPS	0.00± 16.71*	7.72± 141.24*	0.00±0.00 *
DEC	0.00± 0.00*	0.00± 0.00*	0.00±0.00*
LPS + DEC<	0.00± 6.40*	2.86± 17.92*	0.00±0.00 *
LPS + DEC>	0.00± 6.40*	2.86± 279.53*	0.00±0.00 *

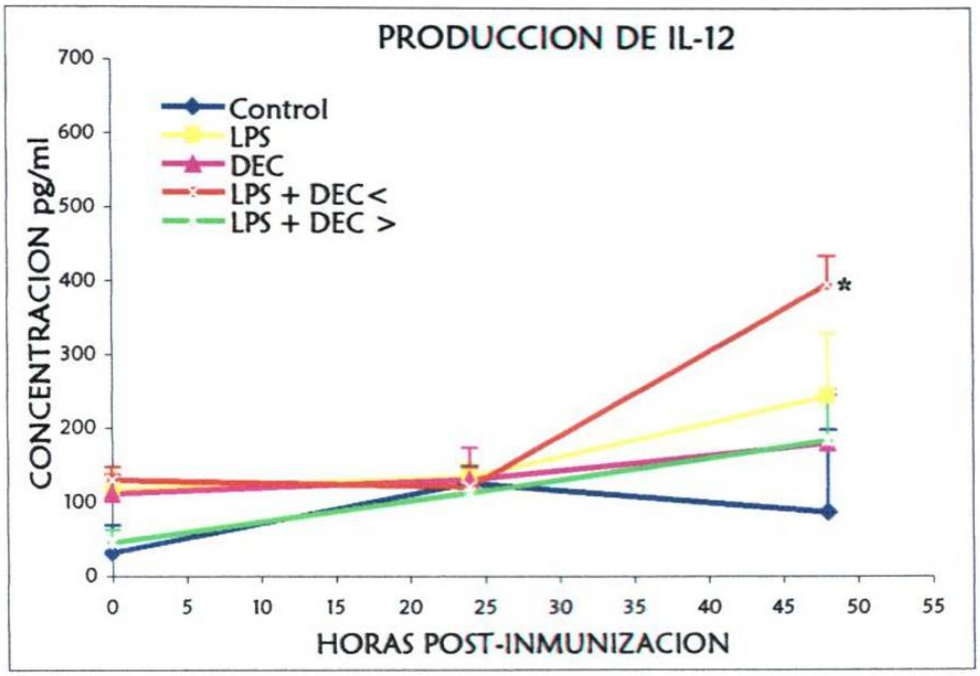
TABLA 13. Valores numéricos de la producción de IFN-γ en suero de ratones inmunizados con LPS, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.



GRAFICA 11. Producción de IL-10 en suero de ratones inmunizados con LPS, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. n=5, *p ≤ 0.001 en comparación con el controles de antígeno y negativo.

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE IL-10		
HORA	0	24	48
Control (-)	85.00± 54.58*	126.32± 89.18*	165.00± 55.98*
LPS	113.00± 61.31*	247.66± 66.57*	209.66± 55.95*
DEC	129.66± 51.50*	287.68± 53.61*	210.34± 86.76*
LPS + DEC<	195.00± 80.51*	589.7± 252.09*	245.66±13.62*
LPS + DEC>	143.66± 43.80*	522.32± 125.02*	213.00± 71.68*

TABLA 14. Valores de la producción de IL-10 en suero de ratones inmunizados con LPS, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.



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

GRUPO n=5	CONCENTRACION DE IL-12		
HORA	0	24	48
Control (-)	31.70±37.45*	126.13±24.80*	87.20±111.85*
LPS	116.38±23.89*	134.38±19.09*	244.38±85.29*
DEC	111.13±25.51*	130.88±43.08*	180.38±66.02 *
DEC<	129.88±17.66*	120.88±27.00*	396.38±39.09*
DEC>	44.88±17.87*	112.88±14.56*	184.38±70.26*

TABLA 15. Valores de la producción de IL-12 en suero de ratones inmunizados con LPS, determinada por ensayo inmunoenzimático (ELISA) según se describe en material y métodos. *Desviación estándar.

6.3 Evaluación del estallido respiratorio de granulocitos y monocitos por citometría de flujo

6.3.1 Histogramas: Estallido respiratorio de granulocitos.

Los resultados del estallido respiratorio de granulocitos son expresados en histogramas que se obtuvieron por análisis de la intensidad media de fluorescencia emitida por las células, lo cual se realizó por el cambio de fluorescencia de la DHR en citometría de flujo, como se describe en material y métodos. Se muestran las regiones analizadas y los histogramas expresan la IMF *vs* la cantidad de células de cada uno de los eventos analizados según la tabla 3 para cada grupo de ratones.

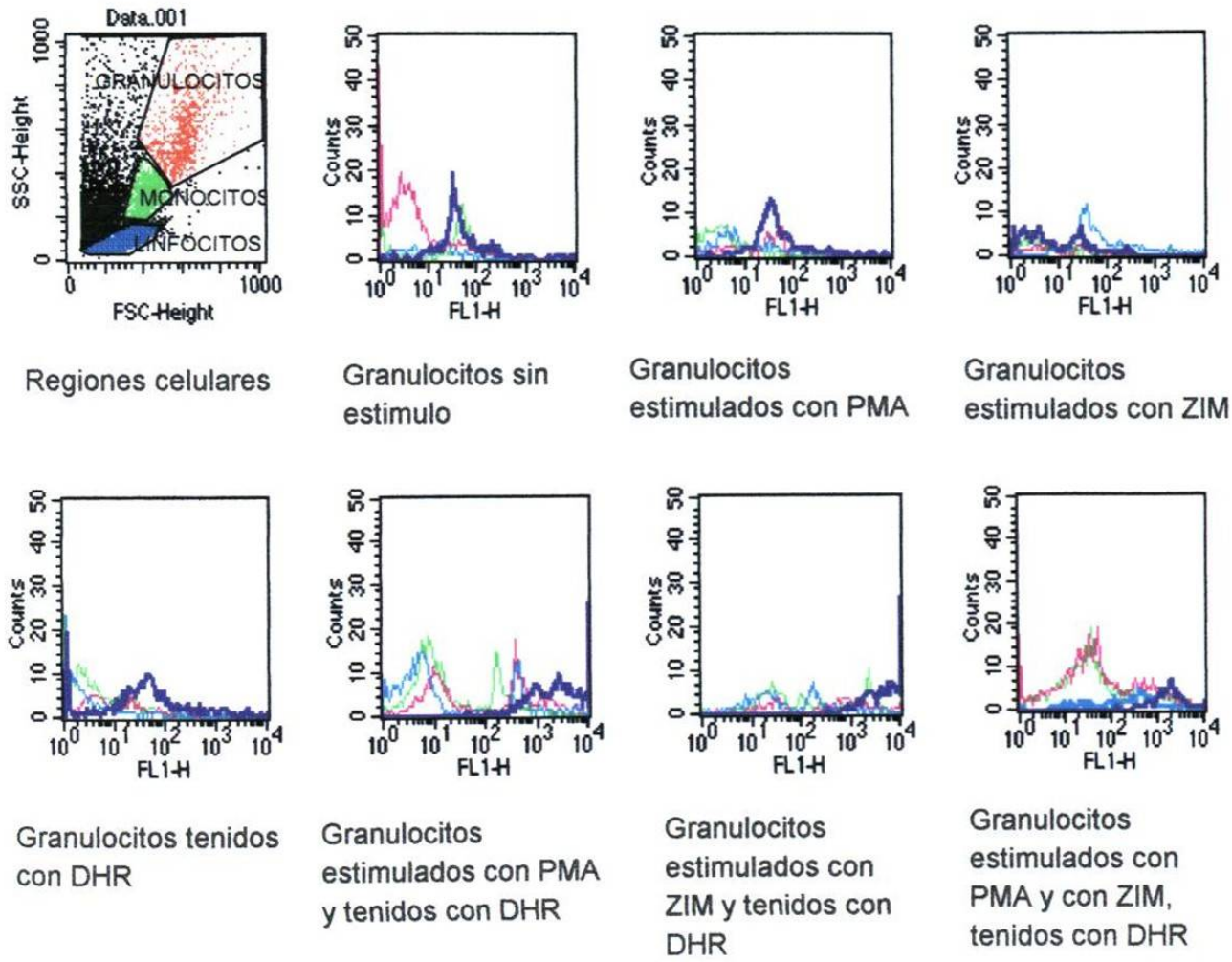


Figura 4. Histogramas obtenidos del análisis del estallido respiratorio de los granulocitos. — Grupo control negativo, — Grupo solución Salina, — Grupo DEC 200 mg, — Grupo DEC 400 mg. n=4.

6.3.2 Histogramas: Estallido respiratorio de monocitos.

La siguiente figura 4 muestra los histogramas del análisis del estallido respiratorio de monocitos por citometría de flujo misma condiciones como se mencionó en material y métodos.

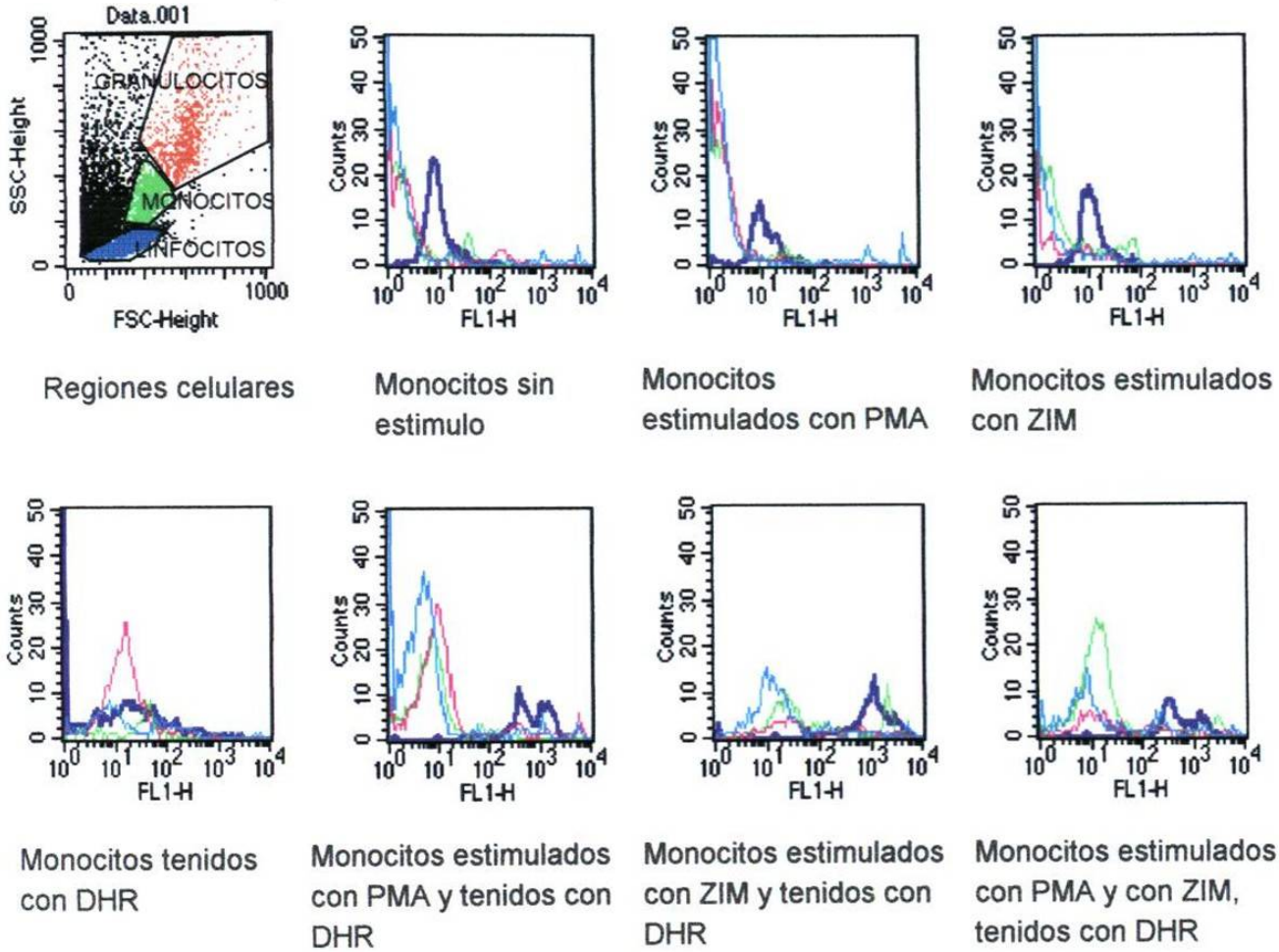


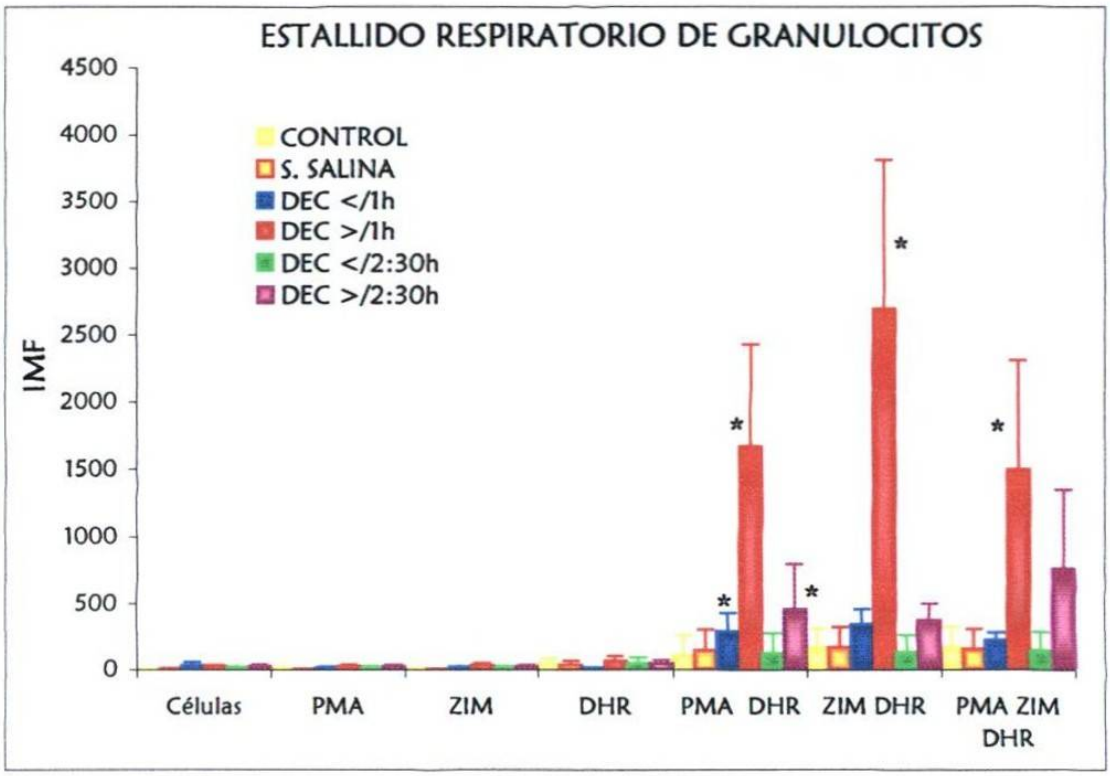
Figura 5. Histogramas obtenidos del análisis del estallido respiratorio de monocitos. — Grupo control negativo, — Grupo solución Salina, — Grupo DEC 200 mg, — Grupo DEC 400 mg. n=4.

6.3.3 Estallido respiratorio de granulocitos

Con respecto a la evaluación del estallido respiratorio de los granulocitos, los resultados expresados en la gráfica 13 muestran que las células de los ratones que recibieron una dosis baja de DEC tienen un comportamiento similar a las células de los grupos controles (sin DEC). Entre ellos no hubo diferencia significativa en cuanto a la IMF, por el contrario puede apreciarse que el estallido respiratorio de las células de ratones tratados con dosis alta de DEC fue potenciado significativamente en comparación ($p \leq 0.001$) con los demás grupos (ver tabla 16), puede observarse un efecto dependiente de la dosis del fármaco.

6.3.4 Estallido respiratorio de monocitos

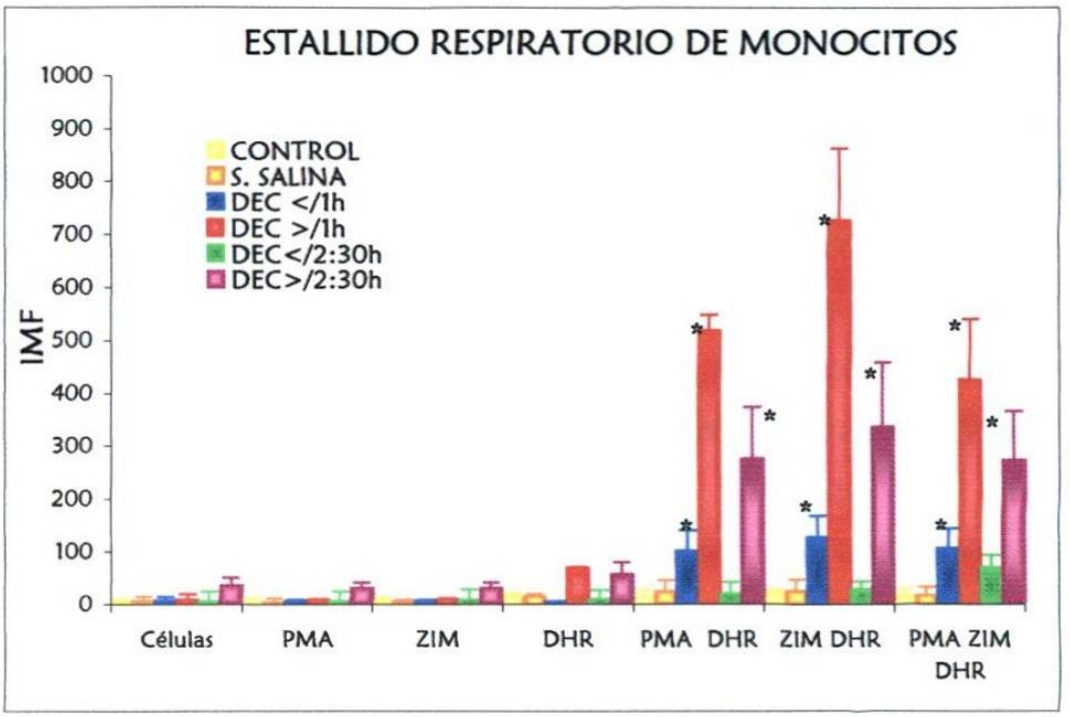
De acuerdo a los resultados mostrados en la gráfica 14, puede observarse que los grupos a los que se les administró DEC, tanto la dosis alta como la baja, y que fueron sangrados a los tiempos de 1 y 2:30 h, presentaron un estímulo significativo en la IMF de los monocitos en comparación con la IMF de los monocitos de los grupos controles, esta diferencia es estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$). También puede apreciarse que la IMF de los monocitos es mucho menor que la de los granulocitos (gráficas 13 y 14). En el caso de los monocitos puede verse que ambos parámetros tanto la dosis como el tiempo influenciaron el estímulo del estallido respiratorio por la DEC (Ver tablas 16 y 17).



GRAFICA 13. Estallido respiratorio de granulocitos-neutrófilos. n=5, *p≤0.001 en comparación con las demás condiciones experimentales estudiadas. DEC< (dosis equivalente a la dosis terapéutica baja administrada en el humano) y DEC>, (dosis equivalente a la dosis terapéutica mas alta administrada en el humano), a diferentes tiempos, como se detalla en material y métodos.

TUBO	INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA (IMF) GRANULOCITOS					
	Control	Sol. Salina	DEC </1h	DEC >/1h	DEC </2½h	DEC >/2½h
1	3.6 ± 5.4*	6.8 ± 8.2*	11.8 ± 18.6*	28.6 ± 10.4*	20.1 ± 3.2*	3.2 ± 12.2*
2	5.3 ± 7.5*	4.1 ± 1*	7.2 ± 16.8*	26.5 ± 12*	13.5 ± 16.8*	25.2 ± 8.9*
3	5.8 ± 4.2*	5 ± 1.8*	7.8 ± 15.1*	29.8 ± 16.1*	12.8 ± 15.1*	26.9 ± 4.6*
4	20.6 ± 37.4*	17.6 ± 31.1*	22.3 ± 42.5*	49.6 ± 33.1*	50.4 ± 42.5*	43.7 ± 25.1*
5	54.8 ± 149.8*	83.1 ±158.4*	73.8 ± 147.4*	1551.1 ± 753.8*	129.4 ± 147.4*	456.2 ± 339.6*
6	110. 1 ± 144.8*	105.8 ±152.9*	86.1 ± 140*	2515.7 ± 1112.3*	130.8 ± 129.4*	376.6 ± 126.8*
7	109. 1 ± 154. 3*	94.4 ±156.4*	88.7 ± 140*	1305.8 ± 811.5*	142.9 ± 140*	765 ± 585.4*

TABLA 16. Intensidad media de fluorescencia del estallido respiratorio de granulocitos-neutrófilos, promedios y *desviación estándar. [1]Células sin estímulo, [2]Células + PMA, [3]Células + Zimosan, [4]Células + DHR, [5]Células + PMA + DHR, [6]Células + Zimosan + DHR, [7]Células + PMA + ZIM + DHR.



GRAFICA 14. Estallido respiratorio de monocitos. n=5, *p≤0.001 en comparación con las demás condiciones experimentales estudiadas. DEC< (dosis equivalente a la dosis terapéutica baja administrada en el humano, 200 mg) y DEC>, (dosis equivalente a la dosis terapéutica mas alta administrada en el humano, 400 mg), a diferentes tiempos, como se detalla en material y métodos.

TUBO	INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA (IMF) MONOCITOS					
	Control	Sol. Salina	DEC </1h	DEC >/1h	DEC </2½h	DEC >/2½h
1	3.3 ± 7.1*	5.1 ± 7.9*	6.3 ± 17.1*	8.44 ± 0.1*	6.3 ± 18.6*	36.7 ± 14.7*
2	3.2 ± 5.33*	2.9 ± 2.8*	5.0 ± 18.5*	8.69 ± 1.5*	5.0 ± 18.9*	30.4 ± 11.1*
3	5.9 ± 4.7*	5.2 ± 5.7*	8.1 ± 15.4*	9.16 ± 1.9*	8.1 ± 20.3*	31.4 ± 10.1*
4	9.9 ± 10.8*	13.1 ± 18.5*	10.2 ± 19.9*	69.26 ± 26.2*	10.2 ± 17.0*	58.2 ± 22.4*
5	14.8 ± 5.5*	25.0 ± 20.0*	20.8 ± 13.4*	517.02 ± 122.3*	20.8 ± 21.9*	276.0 ± 96.4*
6	69.7 ± 215.6*	61.7 ± 203.8*	52.5 ± 282.3*	725.28 ± 113.7*	28.7 ± 14.8*	334.0 ± 122.1*
7	42.3 ± 85.9*	39.4 ± 74.1*	43.5 ± 104.6*	421.08 ± 155.7*	70.8 ± 22.8*	271.6 ± 93.9*

TABLA 17. Intensidad media de fluorescencia del estallido respiratorio de monocitos, promedios y *desviación estándar. Estallido respiratorio de monocitos. [1]Células sin estímulo. [2]Células + PMA. [3]Células + Zimosan. [4]Células + DHR. [5]Células + PMA + DHR. [6]Células + Zimosan + DHR. [7]Células + PMA + ZIM + DHR. *Desviación Estándar.

VII. DISCUSIÓN

En los últimos 25 años se ha observado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la enfermedad humana y animal, mediante el uso de sustancias que modulen o potencien a los efectores del sistema inmune o potencien el efecto de los agentes antimicrobianos usados contra la enfermedad infecciosa[2,8]. Siguiendo esta nueva conceptualización de la terapéutica del presente y del futuro, nosotros tuvimos como objetivo general en el presente trabajo, el evaluar el efecto de la DEC sobre la respuesta inmune adquirida, así como también la función fagocítica innata en el ratón BALB/c. La DEC es una droga antifilarial con propiedades inmunofarmacológicas que la hacen un serio candidato a una evaluación como inmunomodulador con potencial terapéutico. Se han realizado estudios del efecto de la DEC de manera individual y aislada para evaluar este efecto; en el presente estudio se buscó evaluar la acción de la DEC sobre los efectores humorales y celulares en ratones BALB/c inmunizados con un antígeno timo-dependiente y uno timo-independiente, asimismo, sobre efectores fagocíticos en ratones de la misma cepa.

La modificación positiva de la respuesta de anticuerpos bajo la influencia de la DEC en un modelo felino, ha sido estudiada principalmente por Kitchen y sus colaboradores[29]. Ellos estudiaron el efecto del fármaco en gatos expuestos al virus de la leucemia felina (FeLV), inmunizados con un antígeno timo-dependiente: la vacuna Leukocell® (vacuna *vs* FeLV), y además tratados con DEC por vía oral por 2 semanas. Según los resultados de estos estudios los títulos de anticuerpos a las 6 semanas fueron mayores en los gatos tratados con DEC en comparación con los de los no tratados. A las 10 semanas los títulos de los anticuerpos de los gatos tratados permanecieron aproximadamente en el mismo nivel y en los no tratados los títulos declinaron, mostrando en conjunto que el tratamiento incidía en la vacunación del animal produciendo mas anticuerpos por un mayor tiempo[29]. Un efecto similar fue encontrado por el mismo grupo utilizando una vacuna comercial de cápsulas polisacáridas de *Streptococcus pneumonie* sobre ratones[62].

Nosotros seguimos una metodología similar para evaluar este efecto en el modelo BALB/c utilizando el toxoide tetánico (TT) como antígeno timo-dependiente,

y lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* como timo-independiente, administrando una dosis alta (equivalente a 500 mg totales en el humano) y una baja (equivalente a 50 mg) de DEC. Es importante aclarar que si bien la DEC es un fármaco de baja toxicicidad nosotros decidimos, para una correlación mas directa de nuestros resultados al humano, utilizar el rango terapéutico en el mismo (50-500mg dosis total). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Kitchen y colaboradores, ya que en general el tratamiento con DEC aumentó la producción de anticuerpos. Es importante notar que se observó una respuesta diferente de acuerdo al antígeno empleado y a la dosis, en donde la producción de anticuerpos IgG y totales anti-TT fue mayor con la dosis alta de DEC. Ya que nuestros experimentos tuvieron como limite 28 días post-inmunización, no es posible hacer una inferencia con respecto a una duración aumentada de estos anticuerpos en relación a los animales sin tratamiento.

Por el contrario, en el caso de la inducción de anticuerpos anti-LPS la dosis baja de DEC produjo un efecto significativamente mayor. A nuestro conocimiento no se ha utilizado previamente un antígeno timo-independiente para retar animales tratados con DEC. Estos resultados sugieren que el efecto potenciador de la respuesta humoral que ejerza la DEC puede ser variable de acuerdo a la naturaleza del antígeno. Este último, es un factor que debe ser considerado si se desea utilizar la DEC como un posible adyuvante de administración concomitante a la de una vacuna. Las diferencias observadas sugieren que el posible efecto adyuvante de este fármaco debe ser identificado con estudios individuales y específicos de la respuesta humoral para cada agente inmunizante. A este respecto nos remitimos a los resultados de Kitchen y cols quienes con dos modelos animales diferentes, usando Leukocell®[29] y una vacuna capsular de *Streptococcus pneumoniae*[62], obtuvieron una respuesta de anticuerpos cuantitativamente mayor a la observada en nuestro estudio. Nuestros resultados de la inmunización con LPS en lo particular, nos hacen proponer estudios de la respuesta humoral contra agentes infecciosos que antigénicamente contienen lipopolisacáridos, bajo la influencia de la DEC. Por ejemplo, sería de utilidad observar la respuesta humoral usando DEC y aplicando la vacuna contra *Salmolnella typhi*, que no confiere una protección aceptable.

Asimismo, es posible sugerir el uso de la DEC como adyuvante en el tratamiento de infecciones prolongadas e insidiosas causadas por enterobacterias (*Pseudomonas*) o como adyuvante en la inmunización de animales *vs Brucella*[69]. En estos últimos casos señalados, el efecto de la DEC seria sobre una respuesta inmune ya iniciada y estaría por demostrarse un efecto similar al observado en nuestro estudio.

El efecto de la DEC sobre la producción de citocinas ha sido estudiado principalmente en células aisladas humanas o en individuos tratados terapéuticamente con DEC. Nuestro grupo reportó con anterioridad que la DEC estimula la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente IL-6, así como la IL-2 de células mononucleares *in vitro*[54]. También hemos reportado la producción aumentada de la quimiocina RANTES *in vitro* e *in vivo*, en voluntarios humanos sanos[30,55]. Un aumento de RANTES y de la IL-6 *in vivo* también ha sido observado por Gopinath y cols[70], lo que parece corroborar un efecto de la DEC a nivel de estos mediadores. Nosotros evaluamos el efecto de la DEC sobre la producción de citocinas tipo Th1, Th2 y proinflamatorias *in vivo*, representadas por IFN-γ, IL-2, IL-10 e IL-12. En ratones inmunizados con TT, como se mencionó, la dosis alta de DEC aumentó la producción de anticuerpos y encontramos un aumento concomitante en la producción de IL-2 e IL-12, lo cual se correlaciona con el aumento en la producción de anticuerpos anti-TT[15]. También en estos animales se observó la disminución significativa de la producción de IL-10, por lo que estos resultados en conjunto sugieren una respuesta tipo Th1, ya que como es conocido, si la concentración de IL-12 se encuentra elevada, los niveles de la IL-10 están disminuidos, y por otro lado la IL-12 induce la producción de IL-2, conduciendo así a una respuesta de tipo celular o Th1[15].

Por otra parte, la dosis baja de DEC en animales inmunizados con LPS, indujo un aumento en la producción de anticuerpos. En este caso se detectaron niveles elevados de IL-10 y no se detectó concentración de IL-2. Esto concuerda con el paradigma establecido de interacción entre las citocinas Th1 y Th2, en donde la IL-10 inhibe la producción de IL-2, por tanto, inclina el equilibrio regulador a favor de las respuestas inmunitarias humorales, es decir, se promueve la producción de

anticuerpos[15]. Por ello, nuestros resultados sugieren una respuesta de tipo Th2, bajo la estimulación de este antígeno y el tratamiento con DEC. Por otro lado y de manera un tanto sorprendente, no se detectaron niveles significativos en la producción de IFN-γ para la respuesta a ambos antígenos. En el caso particular de los animales inmunizados con TT, esto fue mas llamativo, ya que la IL-2 e IL-12 inducen la producción del IFN-γ[15]. Una explicación posible a esta observación, es el hecho de que el IFN-γ se encuentra elevada en las primeras horas post-inmunización y al tiempo en que nosotros medimos su producción esta ya había declinado; esto tendría que ser confirmado con otros estudios a tiempos mas tempranos después de la inmunización.

En base a los antecedentes en humanos, es posible que la DEC estimule la producción de otras citocinas que no fueron examinadas en el presente estudio[70]. Interesantemente, en los experimentos realizados para establecer la dosis de LPS que sería administrada a ratones para nuestro estudio, inmunizamos ratones con 30 μg de LPS (dosis elevada) por vía subcutánea; los ratones fueron también tratados con DEC oral en dosis baja y alta. Estos ratones, además del cuadro general ocasionado por el LPS, presentaron una lesión necrótica en la piel (comenzando el día 7 y siendo mas severa al día 10 post-inmunización), precisamente en el área donde fue inyectado el antígeno. Ratones inmunizados con esa misma dosis, sin DEC oral o con AZA, solo sufrieron el cuadro sistémico y no mostraron lesiones en piel. Ya que no es de esperarse un efecto de hipersensibilidad con participación de anticuerpos citotóxicos o complejos inmunes por tratarse de ratones no retados con anterioridad, es posible que otro mediador potente, tal como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), haya participado en la génesis de la lesión. Recientemente, Pinsky y cols[71] han descrito un aumento en la producción *in vivo* de TNF-α en perros a quienes la droga les fue administrada para observar sus propiedades antiinflamatorias relacionadas con el bloqueo de la producción de leucotrienos. Este hallazgo, que se encuentra fuera de los objetivos planeados de esta tesis, merece particular atención para dilucidar su origen, ya que es un fenómeno jamás reportado en la literatura concerniente al uso de esta droga.

Para la función fagocítica, se evaluó la producción del intermediario reactivo del oxígeno, el anión superóxido, con la técnica de tinción con 123-DHR por citometría de flujo[66,67]. La racional de nuestros experimentos, usando las mismas dosis empleadas en los experimentos de inmunidad celular y humoral, se basó en los tiempos de llegada de la droga a los lugares de donde obtendríamos las células monocíticas y los granulocitos neutrófilos, la sangre del animal. Los tiempos diferentes: a la 1h (tiempo en el cual la DEC ya esta en circulación sanguínea y en contacto con las células circulantes) y a las 2:30 h (tiempo en el cual la DEC alcanza su pico máximo de concentración sanguínea en el humano) posteriores a la toma del fármaco[36]. Los resultados nos obligaron a reconsiderar los tiempos de presencia plasmática máxima de la droga en roedores. El único estudio encontrado por nosotros, posterior a los experimentos, fue un reporte de Roy y cols, quienes en un modelo de rata del algodón, determinaron que la concentración plasmática de DEC ocurre durante la primera hora después de la ingesta[72]. La intensidad media de fluorescencia celular (IMF), que es el parámetro medido, fue estimulada de manera significativamente mayor en los granulocitos neutrófilos con la dosis alta de DEC a la 1h, en comparación con los demás grupos estudiados. Ya que a las 2:30h con esta misma dosis, no encontramos tal diferencia entre los grupos (gráfica 13), nuestra interpretación de esta observación es que la DEC, en correspondencia con el tiempo máximo de concentración plasmática mostrado por Roy y cols[72], actúa sobre los granulocitos neutrófilos durante este tiempo. Por otro lado, en los monocitos, ni la dosis ni el tiempo de la obtención de las células parecieron ser factores determinantes, ya que el estallido respiratorio (IMF) se encontró estimulado en los grupos que recibieron tanto la dosis baja como la alta de DEC y que fueron sangrados a los dos tiempos de prueba, encontrándose diferencia significativa entre estos grupos y los grupos controles (gráfica 14). La producción del anión superóxido estimulada por la DEC fue evaluada de manera secundaria por Pascual y cols, en sus estudios sobre diferentes drogas en los que probaron desde antioxidantes flavinoides y quelantes hasta bloqueadores del canal de calcio[73]. Ellos midieron la producción de intermediarios reactivos del oxígeno por quimioluminiscencia utilizando luminol[73]. Si bien el diseño metodológico, el estímulo celular, las dosis y la

técnica de evaluación de ambos estudios son diferentes, el resultado final del estímulo del estallido respiratorio parece ser el mismo, si bien en el estudio de Pascual el aumento en el estímulo del estallido respiratorio no fue estadísticamente significativo. Es notable que en nuestro estudio las diferencias de IMF en las comparaciones intergrupales fueron mucho mas evidentes y claras, y asimismo la citometría de flujo permitió diferenciar las dos poblaciones de fagocitos. Es importante destacar que las células empleadas por nosotros fueron estimuladas en el animal vivo, a diferencia del estudio de Pascual y cols[73], en las que la estimulación se hizo *ex vivo*. A nuestro conocimiento, el presente trabajo es el primero que estudia el estallido respiratorio *in vivo*, bajo la influencia de la DEC. Asimismo, estos resultados están en correspondencia con los estudios morfológicos que encontraron una activación metabólica y un aumento de actividad antifilarial dependiente del estallido respiratorio en los granulocitos neutrófilos, tanto en tejidos como *ex vivo*[27,42]. Por otro lado y en relación a otros posibles efectores fagocíticos que pudieran ser activados por la DEC, estudios recientes que buscaban demostrar la intervención del oxido nítrico (NO) en la capacidad antifilarial de la droga, encontraron que la DEC es incapaz de inducir la producción de NO en macrófagos y/o o en células endoteliales de rata, y que no parecían mostrar un sinergismo con el IFN-γ y el TNF-α en la inducción de la NO sintetasa[74]. A pesar de estos indicios, consideramos que esta es una vía efectora/inmunomoduladora que deberá estudiarse también en el humano. En suma, en relación al efecto sobre el estallido respiratorio en ambas células fagocíticas, nuestros resultados proveen el sustento experimental suficiente como para sugerir el uso de la DEC en infecciones piógenas, crónicas o recidivantes, e inclusive por el efecto tan sobresaliente en los monocitos, es posible especular su uso en infecciones por microparásitos intracelulares en las cuales pudiese cumplir un papel terapéutico auxiliar. Asimismo, estos resultados apoyan la investigación mas profunda del uso terapéutico de la DEC en condiciones de inmunodeficiencia fagocítica.

Entre los adyuvantes usados en el humano, el único usado con regularidad es el hidróxido de aluminio[75]. Dentro de los mecanismos de acción inmunopotenciadora de los adyuvantes reconocemos los siguientes: 1) la formación

de un deposito prolongado de antígeno en el sitio de la inoculación, 2) la internalización aumentada por parte de células presentadoras de antígeno, y 3) la inducción de la síntesis y secreción de factores potenciadores de la respuesta inmune, como las citocinas[75]. Los resultados aquí presentados así sugieren que la DEC pudiera estar actuando mediante este último mecanismo, es decir, incrementando la secreción de citocinas, con repercusión en la respuesta humoral y directamente sobre la fagocítica.

Un adyuvante para uso humano debe ser estable, barato, no tóxico y tener influencia sobre las células de la respuesta inmune: tales condiciones son cumplidas por la DEC. La búsqueda de inmunomoduladores y adyuvantes es una tarea larga, difícil y cara, y por ello las pruebas iniciales deben ser conducidas en modelos murinos estables y conocidos, como en nuestro caso. Si bien la experiencia indica que compuestos que parecían prometedores en el modelo murino no funcionaron en el humano, estos resultados, aunados a otros de nuestro grupo de trabajo en humanos y además de los resultados obtenidos por otros investigadores (en humanos y animales) nos sugieren que el uso experimental como inmunomodulador y/o adyuvante de la DEC esta justificado y que existe apoyo experimental para justificar regímenes experimentales de inmunomodulación en el humano.

VIII. CONCLUSIONES

1. La DEC a dosis terapéuticas altas tiene un efecto potenciador del estallido respiratorio en PMN y MN.

2. La DEC a dosis terapéuticas bajas, 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 Th2.

4. La producción de Ac esta aumentada con el estímulo de LPS y dosis terapéuticas bajas de DEC.

5. Una dosis terapéutica baja (25 µg) de DEC induce un estímulo en la respuesta inmune humoral y celular, es decir, en la respuesta inmune adquirida.

6. Una dosis terapéutica alta (250 µg) de DEC induce un estímulo en la respuesta fagocítica, es decir, en la respuesta inmune innata.

IX. APÉNDICE

10.1 ESTANDARIZACION DEL ELISA ANTI-LPS

10.1.1 Fijación del LPS

Se utilizaron microplacas para ELISA de 96 pozos de poliestireno de fondo plano (COSTAR 3590) en las cuales se colocaron tres concentraciones diferentes de LPS: 0.1, 0.3 y 0.5 µg en 200 µl de 4 buffers diferentes. Los buffers utilizados fueron: Acetato, pH 4.4; PBS, pH 7.4; Tris-HCl, pH 8; y Carbonatos, pH 9 (Fig. 5). Las microplacas con el antígeno se incubaron entre 2-8°C toda la noche. Posteriormente se descartó el contenido de cada pozo y se realizaron 3 lavados de 10 minutos y 3 de 1 minuto con solución de lavado. Posteriormente se añadieron 200 µl/pozo de solución bloqueadora, se incubó 1 hora. Se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 minutos y 3 de un minuto con la solución lavadora. La microplacas se conservaron a -20°C hasta su uso posterior.

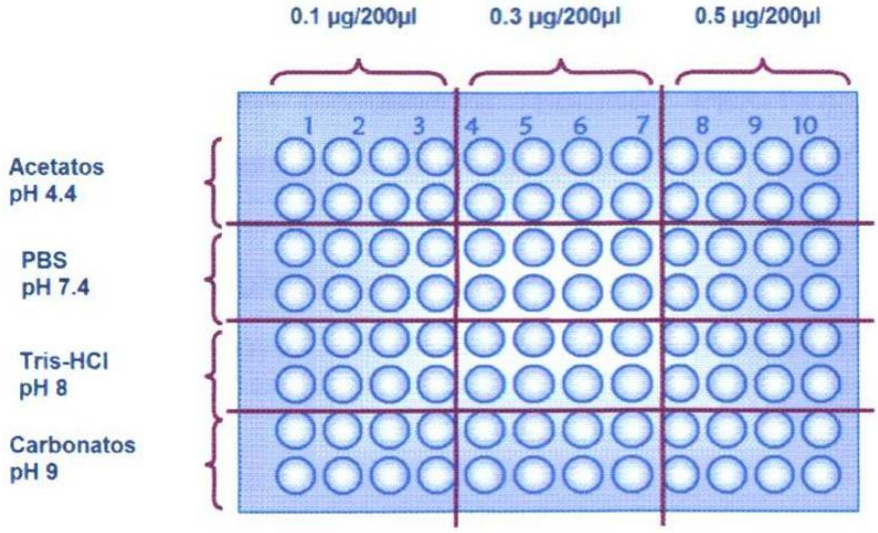


Figura 6. Distribución del LPS en las microplacas a diferentes concentraciones y diferentes pH para la estandarización del ELISA.

10.1.2 Sueros Controles anti-LPS

Se colocaron 200 µl de los sueros controles negativo y positivo en diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000. La distribución de los sueros se realizó según la figura 3. Se

incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos y 3 de un minuto, como se mencionó anteriormente.

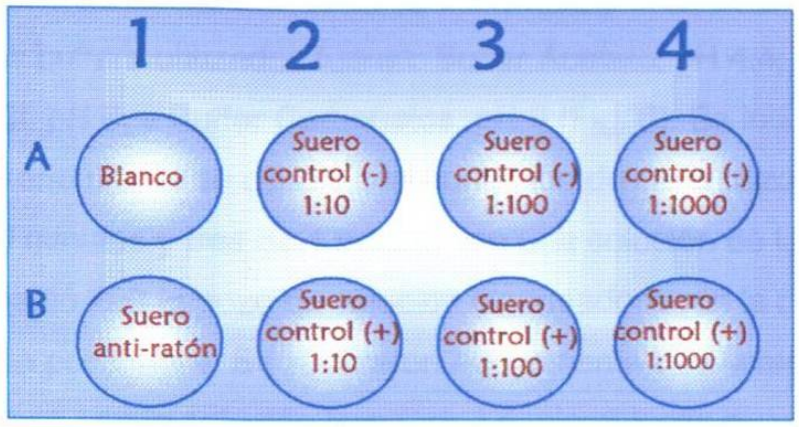


Figura 7. Distribución de las diluciones de sueros control anti-LPS en microplacas.

10.1.3 Anticuerpo Conjugado

Para la determinación de anticuerpos totales se añadieron 200 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 200 µl del anticuerpo IgG anti-ratón conjugado a la peroxidasa (cat. SIGMA A2554) diluido 1:70 000 en solución bloqueadora. Se dejó incubar 1h a 37 °C. Luego de la incubación se realizaron los lavados como se mencionó anteriormente.

10.1.4 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).

10.2 Estandarización ELISA anti-TT

10.2.1 Fijación de TT

Se utilizaron microplacas ELISA (COSTAR 3590) en las cuales se colocaron tres concentraciones diferentes de LPS: 0.01, 0.03 y 0.05 UI en 200 µl de 4 Buffers diferentes. Los buffers utilizados fueron: Buffer Acetato, pH 4.4; Buffer PBS, pH 7.4; Buffer Tris-HCl, pH 8; y Buffer Carbonatos, pH 9 (Fig. 6). Se incubaron a 2-8°C toda la noche. Posteriormente se descarto el contenido de cada pozo y se realizaron tres lavados de 10 minutos y tres de 1 minuto con una solución de lavado. Luego de los lavados se añadió 200 µl/pozo de solución bloqueadora con la cual la microplaca se dejo incubando por 1 hora. Se realizaron nuevamente tres lavados de 10 minutos y tres de un minuto con la solución lavadora. La microplacas con el antígeno fijado se conservaron a 2-8°C hasta su posterior uso.

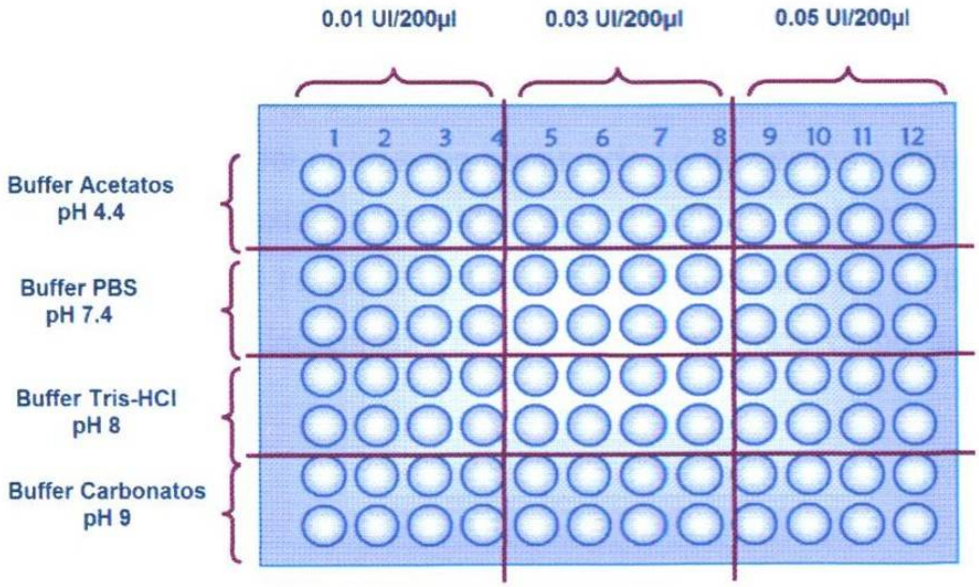


Figura 8. Distribución del TT en las microplacas a diferentes concentraciones y diferente pH para la estandarización del ELISA.

10.2.2 Sueros Controles anti-TT

Se colocaron 200 µl de los sueros control negativo y positivo en diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, un control, al cual se le adiciono solución bloqueadora y en el paso siguiente se le adicionó suero anti-ratón, y un blanco, al que solo se le añadió solución bloqueadora. La distribución de los sueros se realizó según el diagrama 2.

Se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente se realizó una serie de lavados de 10 minutos y 3 de un minuto, como se mencionó anteriormente.

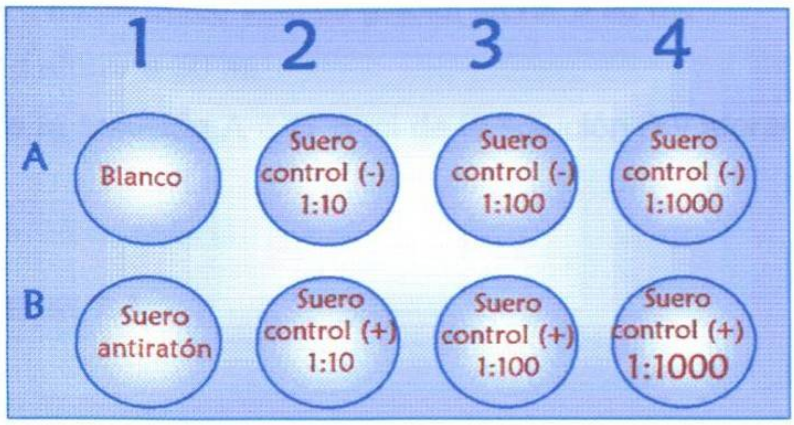


Figura 7. Distribución de las diluciones de sueros control anti-TT en microplacas.

10.2.2 Anticuerpos Conjugados

Se agregaron 200 µl del anticuerpo conjugado (Anticuerpos polivalentes anti-ratón conjugados con peroxidasa, SIGMA A0412) diluido 1:10 000 en solución bloqueadora (Solución PBS-Tween 20 y leche descremada al 1%), se dejo incubar 1h a 37 °C. Luego de la incubación se lavó la microplaca como se mencionó anteriormente.

10.2.3 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).

10.3 Soluciones

Buffer Acetatos pH 4.4

Solución A: 0.5775 ml de ácido acético glacial aforar a 50 ml.

Solución B: 1.36 g aforar a 50 ml.

Mezclar 7.4 ml de la solución A y 17.6 ml de la solución B y aforar a 50 ml. Ajustar pH a 4.4

Buffer PBS 0.1 M pH 7.4

8.0 g de NaCl

0.2 g de KH_2PO_4

2.8 g de $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$

0.2 g de KCl

Aforar en 1 L de agua destilada y ajustar a pH 7.4

Buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8

3.03 g de Tris y aforar a 500ml con agua destilada. Ajustar pH con HCl 5 M.

Buffer Carbonatos pH 9

1.36 g de Na_2CO_3

7.35 g de $NaHCO_3$

Aforar a 950 ml con agua destilada y ajustar a pH 9.

Solución de Lisis (FACS, BECTON DICKINSON)

Se utilizó diluida 1:10.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. **Chang,** C. C., Naiki, M., Halpern, G. M. & Gershwin, M. E. (1993). Pharmacological regulation of the immune system. *J Investig Allergol Clin Immunol* 3, 8-18.

2. **Ballow**, M. & Nelson, R. (1997). Immunopharmacology: immunomodulation and immunotherapy. *Journal American Medical Association* 10:278, 2008-17.

3. **Chirigos, M**. A., (1992). Immunomodulators: current and future development and application. *Thymus* 19, 1:S7-20

4. **Hassner,** A. & Adelman, D. C. (1991). Biologic response modifiers in primary immunodeficiency disorders. *Ann Intern Med* 115(4):294-307.

5. **Hadden,** J. W. (1991). Immunopharmacology and immunotoxicology. *Adv Exp Med Biol* 288:1.

6. **Balwell,** F. R. & Burke, F. (1989). The cytokine network. *Immunology Today* 10:299.

7. **Selig,** C. & Nothdurft, W. (1995). Cytokines and progenitor cells of granulocytopoiesis in peripheral blood of patients with bacterial infections. *Infect Immun* 63, 104-109.

8. **Masihi,** K. N. (2001). Fighting infection using immunomodulatory agents. *Expert Opin Biol Ther* 4, 641-53.

9. **Blackwell,** S. & Crawford J. (1992). Colony-stimulating factors: Clinical applications. *Pharmacotherapy* 12:21S.

10. **Wilson,** M., Seymour, R. & Henderson, B. (1998). Bacterial Perturbation of Cytokine Networks. *Infection and Immunity* 6, 2041-2049.

11. **Atkins,** M. B. (2002). Interleukin-2: clinical application. *Semin Oncol* 29, (suppl 7)12-7.

12. **Imboden**, J. B., & Seaman, W. E. (2002). Linfocitos T y células asesinas naturales. En: Inmunología básica y clínica. Parslow, Stites, Terr, Imboden (Editores) México, El Manual Moderno. pp 149-166.

13. **Mitsuyasu**, R. (2002). Immune therapy: non-highly active antiretroviral therapy management of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 15, (Suppl 2): S115-22.

14. **Piscitelli,** S. C., Bhat, N. & Pau, A. (2000). A risk-benefit assessment of interleukin-2 as an adjunct to antiviral therapy in HIV infection. *Drug Saf* 22, 19-31.

15. **Oppenheim**, J. J., & Ruscetti, F. W. (2002). Citocinas. En: Inmunología básica y clínica. Parslow, Stites, Terr, Imboden (Editores) México, El Manual Moderno. pp 167-187.

16. **Nelson,** S. (2001). Novel nonantibiotic therapies for Pneumonia. Cytokines and Host Defense. *Chest* 119 (Suppl 2):419S-425S.

17. **Biet,** F., Locht, C. & Kremer L. (2002). Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med* 80: 147-62.

18. **Kedzierska,** K., Azzam, R., Ellery, P., Mak, J. Jaworowski, A. & Crowe, S. M. (2003). Defective phagocytes by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol* 26:247-63.

19. **Tompkins,** W. A. (1999). Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. *J Interferon Cytokine Res* 8, 817-28.

20. **Parant,** M. (1988). Host resistance against bacterial infections, immunomodulation by antimicrobials and synthetic immunoenhancers. In: Escobar M. R., Litz J. P., Eds. The reticuloendothelial system, a comprehensive treatise. New York: Plenum Press 85.

21. **Van der Auwera,** P. (1998). The immunomodulating effects of antibiotics. *Curr Opin Infect Dis* 1:363.

22. **Carlone,** N. A., Cuffini, A. M., Tullio, V. & Caballo, G. (1991). Interactions of antibiotics with phagocytes *in vitro*. *J Chemother* 3 (Suppl 1):98.

23. **Lingaas,** E. & Midvedt, T. (1989). The influence of cefoperazone, cefotaxime, ceftazidime and aztreonam on phagocytosis by human neutrophils *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 23:701.

24. **Carlone,** N. A., Cuffini, A. M., Tullio, V. & Caballo, G. (1994). Immunotherapy of infections. 17 Carbapenems and Potential Immunomodulating. Edited by K. Noel Masihi, Marcel Dekker, Inc.

25. **De Simone,** C. (1991). Inosine pranobex in the treatment of HIV infection: A review. *Int J Immunopharmacol* 13:19S.

26. **Amery,** W. K. & Bruynseels, J. P. (1992). Levamisole, the story and the lessons. *Int J Immunopharmacol* 14, 481-486.

27. **Maisels,** R. M. & Denham, (1992). Diethylcarbamazine (DEC): Immunopharmacological interactions of and anti-filarial drug. *Parasitology*, 105, S49-S60.

28. **Kanesa-Thasan,** N., Douglas, J. G. & Kazura, J. W. (1991). Diethylcarbamazine inhibits endothelial and microfilarial prostanoid metabolism *in vitro. Molecular and Biochemical Parasitology* 49, 11-20.

29. **Kitchen,** L. W. (1987). Effect of diethylcarbamazine on cats given feline leukemia virus vaccine. *Vaccine* 5, 266-7.

30. **Medina-De la Garza,** C. E., Brattig, N. W. & Salinas-Carmona, M. C. (2000). Producción *in vitro* de RANTES por Dietilcarbamazina e Ivermectina. *Memorias XIV Congreso Nacional de Inmunologia* (Sociedad Mexicana de Inmunologia, A. C.) pp. 104.

31. **Hewitt,** R. I., White, E., Wallace, W. S., Stewart, H. W., Kushner, S. & Subbarow, Y. (1947). Experimental chemotherapy of filariasis. II. Effect of piperazine derivatives against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 32, 1304-13.

32. **Mackenzie,** C. D. & Kron, M. A. (1985). Diethylcarbamazine: a review of its action in onchocerciasis, lymphatic filariasis and inflammation. *Tropical Diseases Bulletin* 82, R1-37.

33. **Mazzotti,** L., (1948). Posibilidad de utilizar como medio diagnóstico en la oncocercosis, las reacciones alérgicas consecutivas a la administración de Hetrazan. *Revista Instituto Salubridad y Enfermedades Tropicales* (México) 10, 95-99.

34. **Abdi,** Y. A., Ericsson, O., Gustafsson, L. L. & Hellgren, U. (1995). Handbook of drugs for tropical parasitic infections. Taylor & Francis. 2nd Edition.

35. **Rée,** G. H., Hal, A. P., Hutchinson, D. B. A. & Weatherley, B. C. (1979). Plasma levels of diethylcarbamazine in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 542-43.

36. **Hillman,** J.R., Westerfield, L., Ewwert, A & Wang, Y. X. (1983). Serum levels of filaricida, diethylcarbamazine citrate, in cats following differents rotes of administration. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 14, 171-175.

37. **Hawking,** F., Sewell, P., & Thurston, J. P. (1950). The mode of action of Hetrazan on filarial worms. *British Journal of Pharmacology* 5, 217-38.

38. **King,** C. L. & Nutman, T. B. (1991). Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Immunology Today* 12, A54-8.

39. **Martínez-Báez,** M. (1949). Desintegración de las microfilarias de *Onchocerca volvulus* en la piel de los pacientes onchocercosos tratados con Hetrazan. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* (México) 10, 95-99.

40. **Mackenzie,** C. D. (1980). Eosinophil leukocytes in filarial infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74 (suppl.), 51-8.

41. **Kephart,** G. M., Gleich, G. J., Connor, D. H., Gibson, D. W. & Ackerman, S. J., (1984). Deposition of eosinophil granule major basic protein onto microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin of patients treated with diethylcarbamazine. *Laboratory Investigation* 50, 51-61.

42. **Medina-De la Garza,** C. E., Sepúlveda-Saavedra, J., Ballesteros-Elizondo, R. & Navarro-Cervantes, A. L. (1992). Influencia de la dietilcarbamazina sobre los granulocitos neutrófilos humanos: estudio ultraestructural preeliminar. *Memorias X Encuentro de Investigación BioMédica* (Facultad de Medicina, U. A. N. L.). pp. 107.

43. **Cesbron,** J. Y., Capron, A., Vargaftig, B. B., Lagarde, M., Pincemail, J., Braquet, P., Taelman, H. & Joseph, M. (1987). Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Parasitology* 100, 407-15.

44. **Rácz,** P., Tenner-Rácz, K., Büttner, D. W. & Albiez, E. J. (1982). Ultrastructural evidence for eosinophil-parasite adherence (EPA) reaction in human onchorcecal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. *Tropenmedizin und Parasitologie* 33, 213-18.

45. **Medina-De la Garza,** C. E., Brattig, N. W., Tischendorf, F. W. & Jarret, J. M. B. (1990). Serum-dependent interaction of granulocytes with *Onchocerca volvulus* microfilariae in generalized and chronic hyper-reactive diethylcarbamazine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 701-6.

46. **Zahner,** H., Soulsby, E. J. L., Weidner, E. & Lämmler, G. (1978). Effect of diethylcarbamazine on the microfilariae of *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*: dynamics of cell adhesion, immobilization and elimination of microfilariae. *Tropenmedizin und Parasitologie* 29, 15-26.

47. **Salazar-Mallen,** M. (1965). Treatment of intractable asthma with diethylcarbamazine citrate. Annals Allergy. 2, 534-537.

48. **Orange,** R. P., Valentine, M. D. & Austen, K. F. (1968). Inhibition of the release of slow-reacting substance of anaphylaxis in the rat with diethylcarbamazine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 127, 127-32.

49. **Mathews,** W. R. & Murphy, R. C. (1982). Inhibition of leukotriene biosynthesis in mastocytoma cells by diethylcarbamazine. *Biochemical Pharmacology* 31, 2129-32.

50. **Bach,** M. K.& Brashler, J. R. (1986). Inhibition of leukotriene synthetase of rat basophil leukemia cells by diethylcarbamazine, and synergism between diethylcarbamazine and piriprost, a 5-lipoxygenase inhibitor. *Biochemical Pharmacology* 35, 425-33.

51. **Francis,** H., Awadzi, K. & Ottesen, E. A. (1985). The Mazzotti reaction following treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine: clinical serverity as a function of infection intensity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34, 529-36.

52. **Ackerman**, S. J., Kephart, G. M., Francis, H., Awadzi, K., Gleich, G. J., & Ottensen, E. A. (1990). Eosinophil degranulation. An immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti reaction in human onchocerciasis. *Journal of immunology* 14, 3961-9.

53. **Limaye,** A. P., Abrams, J. S., Silver, J. E., Ottesen, E. A. & Nutman, T. B. (1990). Regulation of parasite induced eosinophilia: selectively increases interleukin-5 production in helminth-infected patients. *Journal of Experimental Medicine* 172, 993-6.

54. **Medina-De la Garza,** C. M., García-López, H. L. & Salinas-Carmona, M. C. (1996). Producción de citocinas *in vitro* por estimulación con antifilariales. XXI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. III Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia.

55. **Medina-De la Garza,** C. M., Guerrero-Ramírez, G. & Salinas-Carmona, M. C. (2002). Producción de RANTES estimulada por DEC *in vivo*. XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica.

56. **Paxton,** W. A., Liu, R., Kang, S., Wu, L., Gingeras, T. R., Landau, N. R., Mackay, C. R. & Koup, R. A. (1998). Reduced HIV- 1 infectability of $CD4^+$ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology* 25;244:66-73.

57. **Zagury,** D., Lachgar, A., Chams, V., Fall, L. S., Bernard, J., Zagury, J. F., Bizzini, B., Gringeri, A., Santagostino, E., Rappaport, J., Feldman, M., O'Brien, S. J., Burny, A. & Gallo, R. C. (1998). C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 3857-61.

58. **Kitchen,** L. W. & Cotter, S. M. (1988). Effect of diethylcarbamazine on serum antibody to feline oncornavirus-associated cell membrane antigen in feline leukemia virus cats. *Journal Clinical Laboratory Immunological* 25, 101-3.

59. **Kitchen,** L. W., Mather F. J. & Cotter, S. M. (1988). Effect of continuous oral diethylcarbamazine treatment on lymphocyte counts of feline leukemia virus-infected cats. *Journal Clinical Laboratory Immunological* 27, 179-181.

60. **Nelson,** P., Sellon, R., Novotney, C., Devera, C. Davidian, M., English, R. & Tompkins, W. (1995). Therapeutic effects of diethylcarbamazine and 3'-azido-3'-deoxythymidine on feline leukemia virus lymphoma formation. *Immunol immunopathol* 46, 181-194.

61. **Kitchen,** L. W., Mather, F. J., Chapple, F. E. & Bilello, J. A. (1990). Effet of administration of diethylcarbamazine on murine leukemia virus (Cas-Br-M) infected mice. *Journal Clinical Laboratory Immunological* 33, 97-105.

62. **Kitchen,** L. W., Ross, J. A., Hernández, J. E., Zarraga, A. L. & Mather, F. J. (1992). Effect of administration of diethylcarbamazine on experimental bacterial and fungal infections in mice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1, 259-68.

63. **Kitchen,** L. W., Ross, J. A., Hernández, J. E., Zarraga, A. L. & Mather, F. J. (1993). Effect of administration of diethylcarbamazine with and without fluconazole on experimental fungal infections in mice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2, 237-46.

64. **Salinas-Carmona,** M. C., Welsh, O. & Casillas, S. M. (1993). Enzyme linked Inmunoabsorbent Assay For Serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation with Mycetoma Infections. *J Clin Microbiol* 11, 2901-6.

65. **Barr,** T. A., & Heath A. W., (1999). Enhaced In Vivo Immune Responses to Bacterial Lipopolysaccharide by Exogenous CD40 Stimulation, *Infection and Immunity*, 3637-3640.

66. **Emmendörffer,** A., Hecht, M., Lohmann-Matthes, M. L., & Roesler J. (1990). A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *Journal of Immunological Methods* 131, 269-275.

67. **Emmendörffer,** A., Nakamura, M., Rothe, G., Spiekermann K., Lohmann-Matthes, M. L., & Roesler J. (1994). Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometric)* 18, 147-55.

68. **Imboden**, M. D. & Davis, J. Jr. (2002). Tratamiento inmunosupresor, antiinflamatorio e inmunomodulador. En: Inmunología básica y clínica. Parslow, Stites, Terr, Imboden (Editores) México, El Manual Moderno. pp 873-891.

69. **Levin,** M. M. (1999). 33 Thypoid fever vaccines. In: Vaccines. Plotkin, S. A. & Orenstein, W. A. (Editors). Thrid Edition. USA. pp 781-814.

70. **Gopinath,** R., Hanna, L. E., Kumaraswami, V., Perumal, V., Kavitha, V., Vijayasekaran, V. & Nutman, T. B. (2000). Perturbations in eosinophil homeostasis following treatment of lymphatic filariasis. *Infection and Immunity* 68, 93-99.

71. **Pinsky,** M. R., Roman, A., Buurman, W., Content, J. & Vincent, J. L. (2000). Effect of ibuprofen and diethylcarbamazine on the hemodynamic and inflammatory response to endotoxin in the dog. *European Surgical Research* 32, 74-86.

72. **Roy,** T. K., Satyavan Sharma & Srivastava, V. M. L. (1981). Comparative tissue distribution and urinary excretion of diethylcarbamazine and centperazine. *Indian Journal Medical Research* 565-571.

73. **Pascual,** C., González, R. & Romay, C. (1991). Drugs effects on superoxide generation and chemiluminescence response of human leukocytes. *Agents and Actions* 32, 277-282

74. **Rajan,** T. V., Shultz, L. D., Babu, S., Doukas, J., Greiner, D. & Porte, P. (1998). Diethylcarbamazine (DEC) does not induce nitric oxide (NO) synthesis. *Exp Parasitol* 88, 217-222.

75. **Ada,** G. (1999). The Immunology of vaccination. In: Vaccines. Plotkin, S. A. & Orenstein, W. A. (Editors). Thrid Edition. USA. pp 28-39.

TIPO DE ADQUISICION
DONA VO