

40
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD QUE SOBRE EL
SISTEMA INMUNE TIENE EL QUITOSAN Y LA
FESCDIPINA COMPARADA CON LA ACTIVIDAD
INMUNOESTIMULANTE DE LA VACUNA BCG
(*Bacillus Calmette-Guerin*).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
GABRIELA MARTINEZ AVILA

DIRECTOR: DR. ANDRES ROMERO ROJAS.

259442

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1998.

TESIS CON



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN U. N. A. M.
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

"Evaluación de la actividad que sobre el Sistema Inmune tiene el Quitosan y la Pescidipina comparada con la actividad inmunestimulante de la vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guerin)".

que presenta la pasante: Gabriela Martínez Avila
con número de cuenta: 8958891-2 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Abril de 1997

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Q.F.B. Idalia Avila Miya, s.n.a

SECRETARIO M. en C. Andrés Romero Rojas

PRIMER SUPLENTE M. en C. Victor M. Zandajas Buitrón

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

DEDICATORIA

*Por ser la luz que guía mi camino.
Por ser la esperanza y consuelo mío.
Por lo que me has permitido ser...
Gracias Señor.*

*Por darme la vida y quererme tanto.
Por tu apoyo y comprensión, por tus
consejo, amistad y estímulos para
seguir adelante.
Por la fe y confianza depositadas en mi
y principalmente por ser un gran ejemplo
de fortaleza y superación...
Gracias Mamá.*

*A mi hermana.
Con quien he compartido gran
parte de mi vida.
Por los momentos felices y tristes que hemos
vivido.
Por el amor que nos une.
Gracias Mariana.*

*A mi esposo.
No tengo palabras con que
expresarte mi agradecimiento por u
apoyo y entrega, por tus consejos
sabios y atinados.
Por lo que significas en mi vida.
Por tu gran amor y paciencia y
sobre todo por creer en mí.
Gracias Marco A.*

A toda mi familia.

Por el apoyo recibido. Gracias.

***A mis amigas Adriana, Ernestina, Lucia,
Matilde, Rosa y Patricia.***

***Por todos los momentos alegres,
grtatos y de tensión que vivimos
juntas y por su amistad sincera e
invaluable.***

***Con especial agradecimiento a
mi director de tesis.***

Dr. Andrés Romero Rojas.

***Por la oportunidad brindada al desarrollar
esta tesis.***

Por sus valiosos consejos.

Por su paciencia y ayuda

Por su amistad desinteresada.

Muchas gracias

INDICE

	Pag.
I. LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
II. INDICE DE TABLAS	II
III. INDICE DE FIGURAS	IV
IV. RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE (SI)	1
1.1.1. Organización del Sistema Inmune	5
1.1.2. Moléculas de Importancia	6
1.1.3 Bases celulares de la Respuesta Inmune (RI)	12
1.1.4. Mecanismos no específicos	15
1.2. ELEMENTOS DE INMUNOFARMACOLOGÍA	22
1.2.1. Inmunoestimulantes o inmunopotenciadores.....	25
1.2.1.1. Vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guérin).....	29
1.2.2. Inmunosupresores.....	30
1.3. FESCDIPINA.....	31
1.4. QUITOSAN	32
2. HIPÓTESIS.....	35
3. OBJETIVOS.....	35
4. MATERIAL Y MÉTODOS	37
4.1. Sustancias de Experimentación	37
4.2. Material Biológico	37
4.2.1 Animales de Experimentación	37
4.3. Reactivos	38
4.4. Soluciones Preparadas	38
4.5. Diagrama de flujo	39

4.6. PRUEBAS HEMATOLÓGICAS	40
4.6.1. Hemoglobina	41
4.6.1.1.Procedimiento.....	42
4.6.2. Hematocrito	42
4.6.2.1.Procedimiento.....	43
4.6.3. Conteo celular	44
4.6.3.1.Procedimiento.....	44
4.6.4. Cuenta diferencial.....	46
4.6.4.1.Procedimiento.....	46
4.7. CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES (DOT-ELISA).....	47
4.7.1. Procedimiento.....	49
4.8. ACTIVIDAD FAGOCÍTICA (CARBÓN COLOIDAL).....	51
4.8.1. Procedimiento	52
4.9. PESO DE ORGANOS LINFOÍDES.....	54
4.9.1. Procedimiento	55
4.10.ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
5. RESULTADOS	56
5.1. Pruebas hematológicas	56
5.2. Actividad fagocítica	60
5.3. Cuantificación de Anticuerpos.....	79
5.4. Peso de órganos	80
6. DISCUSIÓN	85
7. CONCLUSIONES	91
8. APENDICE.....	92
9. BIBLIOGRAFIA.....	94

I. LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
adm.	Administración
Ag	Antígeno
ALP	Agua libre de pirógenos
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Ca ⁺⁺	Iones calcio
CD4+	Linfocito T citotóxico
CD8+	Linfocito T cooperador
CP	Acarreador de proteínas
EIE	Ensayo inmunoenzimático
ELISA	Enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte
Fig	Figura
g	Gramos
GM-CFS	Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
hr.	Hora
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
M-CFS	Factor estimulante de colonias de monocitos
m.o	Microorganismo
MDP	Muramildipéptido
mg	Miligramos
mg	Microgramos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min.	Minutos
ml	Microlitros
ml	Mililitros
MM	Matriz mineralizada
NAF	Factor activador de neutrófilos
NC	Nitrocelulosa
nm	Nanómetros
PMN	Polimorfo-nucleares
PSLM	Proteína sérica ligadora de manosa
PRO	Plexo retroorbital
RI	Respuesta inmune
SC	Subcutánea
SI	Sistema inmune
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SRE	Sistema retículo endotelial ó fagocítico mononuclear
SSF	Solución salina fisiológica
THF	Factor tímico humoral
TNF	Factor de necrosis tumoral

II. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Pag.
1. Facetas de la RI: Posibles sitios de acción para inmunestimulación.....	28
2. Manejo de ratones para las pruebas hematológicas y cuantificación de anticuerpos totales.....	40
3. Administración de la suspensión de Carbón Coloidal por vía IV	53
4. Valores hematológicos de ratones Balb/c control	56
5. Valores hematológicos de ratones Balb/c con 0.1 ml de BCG por vía IP.....	56
6. Valores hematológicos de ratones Balb/c con 100mg/Kg de Quitosan por vía IP.....	57
7. Valores hematológicos de ratones Balb/c con 100mg/Kg de Quitosan por vía IP.....	57
8. Valores hematológicos de ratones Balb/c con 100mg/Kg de Fescdipina por vía VIP.....	58
9. Valores hematológicos de ratones Balb/c con 100mg/Kg de Fescdipina por vía IP.....	58
10. Valores hematológicos de ratones Balb/c con 100mg/Kg de Nifedipina por vía IP	59
11. Valores hematológicos de ratones Balb/c Promedio.....	59
12. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con-ALPa una l=650nm.	67
13. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Fescdipina a las 6 hrs. a una l=650nm.....	67
14. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Fescdipina a las 12 hrs. a una l=650nm.....	68
15. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Fescdipina a las 24 hrs a una l=650nm.....	68
16. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con BCG a las 6 hrs a una l=650nm.	68
17. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con BCG a las 12 hrs. a una l=650nm	69
18. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con BCG a las 24 hrs a una l=650nm.	69
19. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Quitosan a las 6 hrs a una l=650nm	69
20. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Quitosan a las 12 hrs. a una l=650nm.....	70
21. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Quitosan a las 24 hrs a una l=650nm.....	70
22. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Nifedipina a las 6 hrs. a una l=650nm.....	70

23. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Nifedipina a las 12 hrs a una $\lambda=650\text{nm}$	71
24. Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratón Balb/c inoculado con Nifedipina a las 24 hrs a una $\lambda=650\text{nm}$	71
25. Valores de K (Indice de actividad fagocítica) en la prueba de eliminación de carbón coloidal.....	75
26. Titulo de anticuerpos por el método DOT-ELISA.....	79
Valores de peso de los organos de ratones Balb/c inoculados con ALP por vía IP.....	80
28. Valores promedio de peso de los órganos de ratones Balb/c.....	81

III. INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
1. Barreras físicas y químicas de los mecanismos de defensa inespecíficos.....	2
2. El linfocito como elemento central de la RI.....	3
3. Tipos de respuesta.....	4
4. Estructura básica de los Ac.....	7
5. Papel del Ac. en la Respuesta Inmune.....	9
6. Clases de Ig.....	10
7. Moléculas de MHC clase I y clase II.....	11
8. Vías de presentación y procesamiento del Ag.....	13
9. Moléculas que participan en la interacción entre linfocitos T y células presentadoras del Ag.....	14
10. Acción del Complemento.....	17
11. Esquema representativo del fraccionamiento de los factores del Complemento.....	18
12. Rutas del complemento y sus factores de iniciación.....	19
13. Proceso de fagocitosis.....	21
14. Sitios de acción de la terapia inmunomoduladora o inmunorestaurativa.....	23
15. Clasificación de la Inmunidad.....	26
16. Estructura de las capas quitinoproteicas.....	34
17. Inmunodot-ELISA.....	49
18. Actividad fagocítica (Método de Carbón coloidal).....	52
19. Rangos de Estimulación.....	54
20. Valores promedio de Hemoglobina de ratones Balb/c.....	60
21. Valores promedio de Hematocrito de ratones Balb/c.....	61

22. Valores promedio de Leucocitos de ratones Balb/c	62
23. Valores promedio de Eritrocitos de ratones Balb/c.....	63
24. Valores promedio de Linfocitos de ratones Balb/c.....	64
25. Valores promedio de Neutrófilos de ratones Balb/c.....	65
26. Valores promedio de Eosinófilos de ratones Balb/c.....	66
27. Valores de logaritmo de la Absorbancia a las 6 hrs.....	73
28. Valores de logaritmo de Absorbancia a las 12 hrs.....	74
29. Valores de logaritmo de Absorbancia a las 24 hrs.....	75
30. Valores de "K" (actividad Fagocítica) a las 6 hrs.....	76
31. Valores de "K" (actividad Fagocítica) a las 12 hrs.....	77
32. Valores de "K" (actividad Fagocítica) a las 24 hrs.....	78
33. Valores promedio del peso de Bazo de ratones Balb/c.....	82
34. Valores promedio del peso de Timo de ratones Balb/c.....	83
35. Valores promedio del peso de Hígado de ratones Balb/c.....	84

IV. RESUMEN

Existen dentro de la inmunología dos áreas de suma importancia cuando se está hablando de efectos sobre el Sistema Inmune que desarrollan algunos productos farmacéuticos y químicos ambientales, se trata de la *inmunofarmacología e Immunotoxicología*. La rama que se encarga del estudio de los mecanismos por los cuales es posible la manipulación de la respuesta inmune de un individuo en el beneficio de éste para el tratamiento de enfermedades es llamada inmunofarmacología; la inmunotoxicología es definida como el estudio de los efectos dañinos de diversas sustancias sobre el Sistema Inmune.

La finalidad de esta trabajo es la de encontrar a) el efecto inmunoestimulante del Quitosan, ya que por sus características moleculares y algunos estudios ya realizados este compuesto tiene un comportamiento inmunoestimulante, y b) el efecto nocivo o tóxico de un agente antagonista del calcio análogo de la nifedipina como es la fescdipina .

El efecto que pudiera encontrarse de los compuestos antes mencionados se ha evaluado haciendo la comparación del efecto desarrollado por el BCG que es un inmunoestimulante bien definido (control positivo) y el del agua libre de pirógenos (control negativo).

El Quitosan trabajado fue extraído del exoesqueleto del camarón y la Fescdipina es producto de la síntesis de Hanszch y que se encuentra en proceso de patente.

Para evaluar los efectos producidos en el Sistema Inmune se realizaron las siguientes pruebas: 1. Hematológicas (cuenta blanca, roja y diferencial), 2. Inmunológicas (cuantificación de anticuerpos totales por el método de DOT-ELISA , y Actividad fagocítica por el método de eliminación de carbón coloidal) y 3. Peso de órganos (timo, bazo e hígado.)

Los resultados muestran que a nivel hematológico el efecto del quitosan y la fescdipina no varía con respecto a los controles; con respecto a los resultados obtenidos a nivel inmunológico se observa que existe una pequeña elevación del efecto del quitosan con respecto al BCG y la fescdipina tiene un comportamiento similar al Agua libre de pirógenos. La comparación de los resultados del peso de órganos no se observó diferencia significativa comparada con los controles.

Por medio de los resultados pudimos concluir que el quitosan es un buen candidato para ser un inmunoestimulante y la fescdipina no tiene efectos nocivos sobre el sistema inmune; pero es importante y necesario que para asegurar estos hechos se realicen otras pruebas complementarias y confirmatorias como son la medición de la actividad de los macrófagos, la formación de placas hemolíticas entre otras.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE (RI)

Existen diferentes mecanismos de defensa del organismo hacia diversos agentes extraños al propio organismo, los específicos y los inespecíficos.⁷³

Algunos mecanismos no específicos impiden la entrada de los agentes infecciosos, mientras que otros se encargan de eliminar aquellos que ya han penetrado, los mecanismos de defensa específicos, mejor conocidos como respuesta inmune (RI) están ligados íntimamente a los de defensa no específica haciendo que la función de estos sea más eficiente.⁶⁴

Los **mecanismos de defensa inespecíficos** (fig. 1) o innata se refiere a la resistencia básica a enfermedades que algunas especies poseen.⁴¹ En este tipo de respuesta están involucrados diferentes mecanismos inespecíficos de defensa que pueden ser a nivel tisular, celular y molecular:

- Mecanismos a nivel tisular: estos se refieren a la intervención de la piel y las mucosas en el mantenimiento de la integridad del organismo.
- Mecanismos a nivel celular: a) Fagocitosis
 b) Células NK
- Mecanismos a nivel molecular: a) Complemento
 b) Lisozima
 c) Interferon
- Mecanismos a nivel fisiológico: a) Inflamación
 b) Respuesta febril^{65,73}

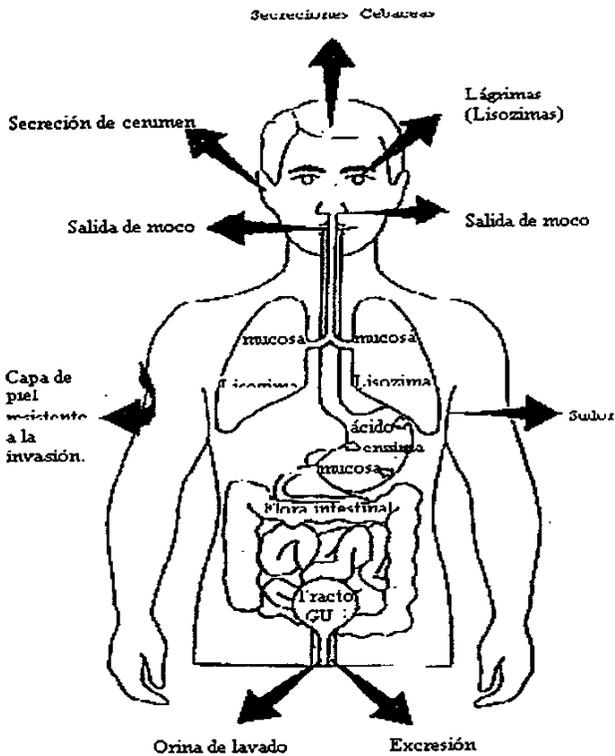


Figura.1. Barreras físicas y químicas de los mecanismo de resistencia.

Los mecanismos de defensa específica o adquiridos reflejan la presencia de un SI funcional que es capaz del reconocimiento específico y eliminación selectiva de microorganismos y moléculas extrañas. A diferencia de los mecanismos no específicos, los adquiridos manifiestan especificidad, diversidad, memoria, y reconocimiento de lo propio y lo no propio; se basan fundamentalmente en la acción de un conjunto de células altamente especializadas: *los Linfocitos* (fig..2).⁴⁶

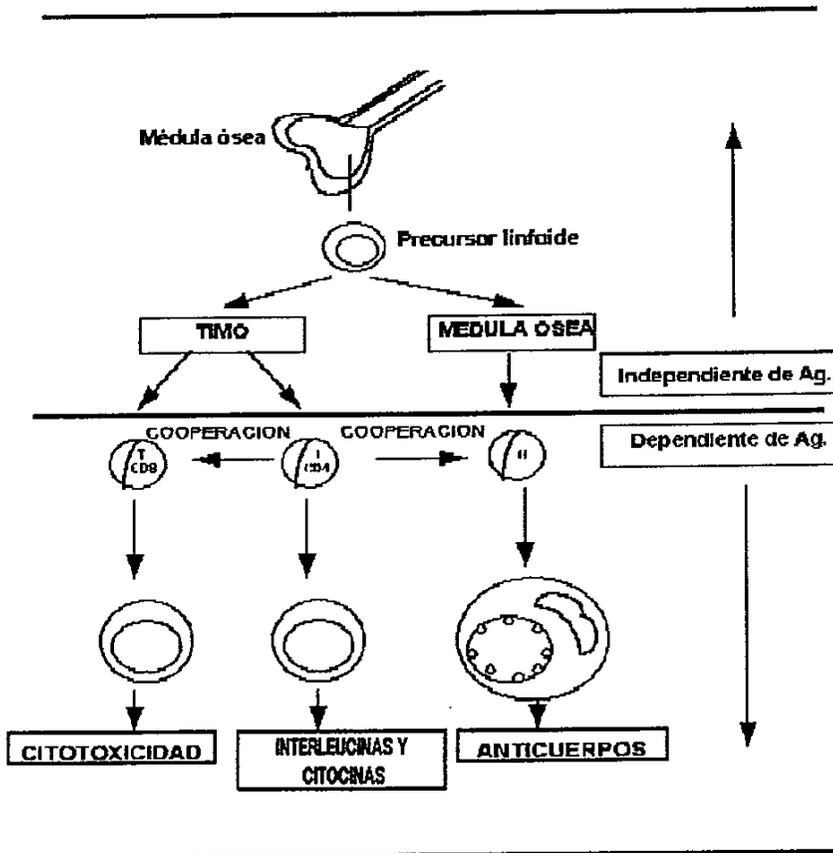


Figura. 2. El linfocito como elemento central de la IR

Existen dos tipos de respuesta específica (fig.3), ambas capaces de intervenir en la homeostasis del individuo y en la protección contra organismos patógenos: una respuesta *humoral*, mediada por factores humorales o circulantes y dependiente de linfocitos B y se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (Ac) en la otra, llamada *celular* dependiente de linfocitos T y es caracterizada por la producción de

linfocitos T sensibilizados específicamente hacia un antígeno (Ag) que puede ser de dos tipos: citotóxicos (CD8+) y productores de citocinas (IL-2, INF- γ , TNF- α).^{13,25,26,73.}

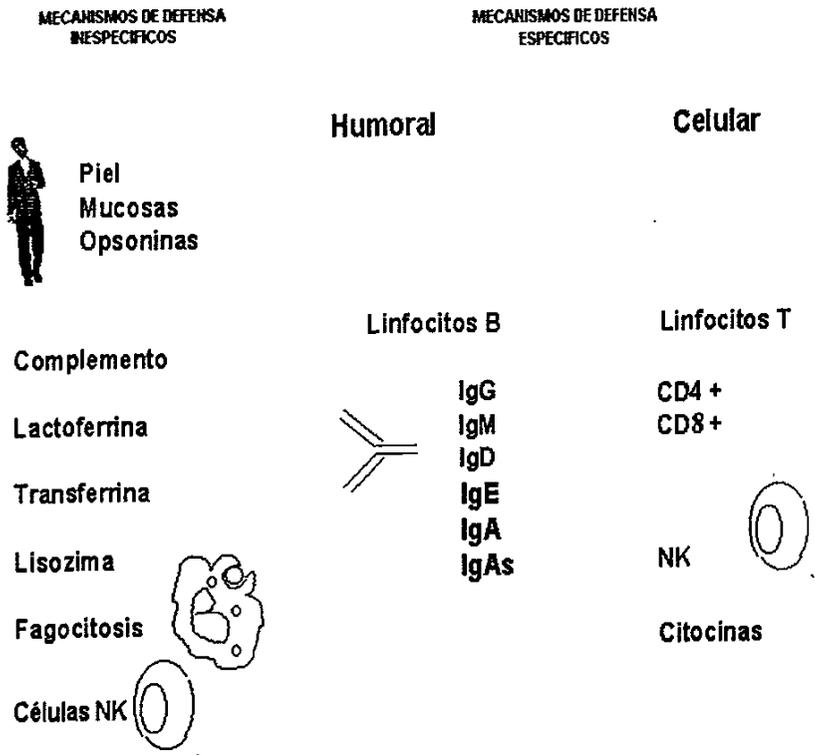


Figura. 3. Tipos de mecanismos de defensa. Estos dependen del tipo, concentración, sitio de entrada y disponibilidad del antígeno.

1.1.1. Organización del SI

El SI es un conjunto de tejidos, células y moléculas cuya principal función es la de mantener al ambiente interno del cuerpo destruyendo organismos infecciosos invasores y a células propias alteradas o transformadas. Sin embargo, el SI también tiene otras funciones relativamente importantes no relacionadas con el combate de infecciones, por ejemplo, algunas citocinas como el TNF- α y IL-1 β actúan sobre el sistema nervioso.⁶⁸

Los órganos del SI se encuentran por todo el cuerpo. En general, son llamados *órganos linfoides* que regulan el crecimiento, desarrollo y despliegue de células⁴³ y cuya población está constituida principalmente por linfocitos. Estos órganos se dividen en primarios y secundarios, *los primarios* incluyen al timo y médula ósea, su principal función es la producción y diferenciación de linfocitos (linfopoyesis); *los secundarios* incluyen a los ganglios linfáticos, bazo, tonsilas, placas de Peyer y demás tejido linfoide asociado con otras estructuras anatómicas, sus principales funciones incluyen la captación del Antígeno (Ag) y el desarrollo de la RI.⁵⁰

Las células inmunes, al igual que las otras células de la sangre, son producidas por la médula ósea. Las células derivadas de las células pluripotentes pueden ser divididas en células mieloides o linfoides. Las dos clases de linfocitos son las *células B* y las *células T*. Las células B completan su maduración en la médula ósea; en contraste, las células T migran al timo.⁴³

En el timo las células T maduran para convertirse en células capaces de producir una RI o de convertirse en células inmunocompetentes. Este proceso es llamado “educación de las células T”. Después de salir de la médula ósea y del timo algunos linfocitos se congregan en los ganglios linfáticos. Otros viajan continuamente a través del cuerpo usando el sistema circulatorio sanguíneo y linfático.⁵⁰

Los ganglios linfáticos contienen compartimentos con linfocitos T, B, macrófagos y células dendríticas capaces de captar Ag y presentarlos a las células T. Así, los ganglios linfáticos congregan los componentes requeridos para iniciar la RI.⁴³

Similarmente, las funciones del bazo como un punto focal o central para las defensas inmunes lo caracterizan como un órgano que contiene dos tipos principales de tejido: la pulpa roja en donde los glóbulos rojos viejos son eliminados y la pulpa blanca que contiene tejido linfoide.⁴³

1.1.2. Moléculas Importantes

Los *antígenos* (Ag) son moléculas que inducen una reacción inmune específica, la mayoría no son constituyentes normales de nuestro cuerpo. Proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos pueden inducir una reacción inmunológica.⁴⁸ Para que un Ag se comporte como tal debe reunir las siguientes características:

- Ajeno al SI del individuo
- Naturaleza química: las moléculas requieren cierta complejidad a nivel estructural
- Tamaño molecular: cuanto mayor es el peso molecular de una molécula mayor es su capacidad inmunogénica
- Alejado filogenéticamente.⁵⁰

Los Ag pueden ser definidos por sus propiedades de: inmunogenicidad, antigenicidad, alergenidad y tolerogenicidad.

Inmunogenicidad es la habilidad para inducir una respuesta humoral o celular:

células B + Ag \Rightarrow células plasmáticas + células de memoria

células T + Ag(unido a células presentadoras de Ag) \Rightarrow células Tcooperadoras + células de memoria

Antigenicidad: es la habilidad o capacidad para combinar específicamente el producto final de la respuesta (esto es el Ac y/o receptores de superficie celular). Aunque todas las moléculas poseen la propiedad de inmunogenicidad también la de antigenicidad, pero no al revés. Algunas moléculas pequeñas son designadas como *haptenos* o *determinantes antigénicos*, estos poseen la propiedad de antigenicidad pero no son capaces, por si mismos de inducir una RI específica, en otras palabras carecen de inmunogenicidad.

Alergenicidad: es la capacidad para inducir reacciones de hipersensibilidad tipo I. Los alérgenos tienden a activar tipos específicos de respuesta humoral, teniendo manifestaciones alérgicas.

Tolerogenicidad: no hay respuesta inmunológica específica en el campo humoral ni en el mediado por células.⁴²

Históricamente los *Anticuerpos (Ac)* fueron los primeros componentes del SI que se encontró que tienen un papel importante en la inmunidad. Solo después fue determinado que los linfocitos producen los Ac y que estos linfocitos circulan por todo el cuerpo y están organizados en tejidos linfoides; estos colectivamente componen el Sistema linfóide. Cada molécula de Ac consiste de una o más unidades básicas, cada una conteniendo cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Los dos brazos tienen la misma estructura y ellos son la parte de la molécula que se combina con el Ag.⁶⁸ La estructura básica del Ac es mostrada en la fig. 4:

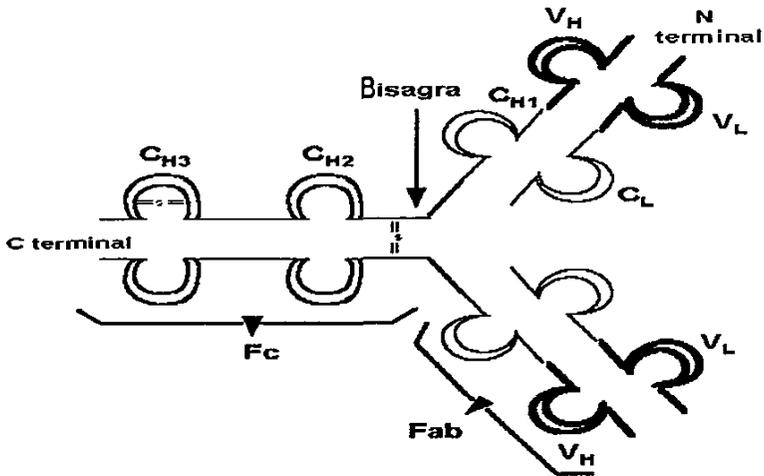


Figura 4. Estructura básica de los Anticuerpos. Cada molécula posee una V_H-región variable de la cadena pesada, V_L-región variable de la cadena ligera, C_H-región constante de la cadena pesada, C_L-región variable de la cadena ligera, Fc- fracción cristalizante y Fab - sitio activo.

Cada cadena pesada está compuesta de 4-5 dominios de aproximadamente 110 aminoácidos unidos por puentes de disulfuro.¹⁴ La mayor parte de la molécula es muy similar en diferentes Ac:

- Región constante- solo una pequeña porción varía de Ac a Ac y dan el carácter isotípico y alotípico
- Región variable- dentro de las regiones variables hay pequeñas subregiones que son únicas para cada Ac y dan el carácter idiotípico.
- Región hipervariable- existe una región hipervariable para cada una de las cadenas polipeptídicas y la organización tridimensional de la molécula es tal, que las subregiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras se contraponen formando entre ellas los sitios activos del Ac, es decir, la región que reacciona con el Ag.⁵⁰

La combinación del Ag con el Ac es una reacción fisicoquímica que involucra enlaces no-covalentes, en cierta forma se asemeja a la combinación de las enzimas con su sustrato, Los Ac no dañan directamente a los Ag, muchos Ac solo neutralizan a las toxinas producidas por bacterias, la destrucción o eliminación de un Ag requiere en muchas ocasiones de la participación de otras moléculas y células del SI (Fig.5).

La región Fc del Ac determina esta participación, las partes o dominios de los Ac's tienen diferentes funciones: la región V une al Ag con especificidad inmunológica; la región C se combina con otras moléculas o células para realizar la eliminación y destrucción del Ag.¹⁴

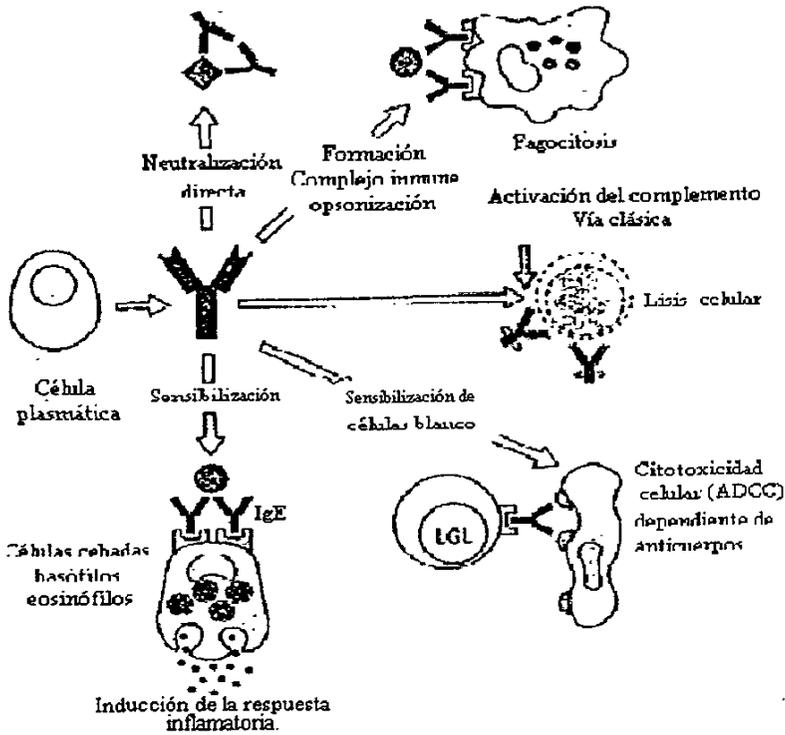


Figura 5. Papel del Anticuerpo en la Respuesta Inmune.

Se conocen cinco isotipos de Ac o Inmunoglobulinas (Ig): IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (fig. 6), en la molécula de Ig se reconocen dos zonas con funciones distintas. Por un lado el sitio activo o fragmento Fab constituido por los dominios variables y que confieren la especificidad a la Ig, por otro lado, los dominios constantes asociados con el fragmento Fc responsable de las funciones biológicas como la activación del complemento y la opsonización o la adhesión a fagocitos u otras células con receptores para Fc.^{50,68}

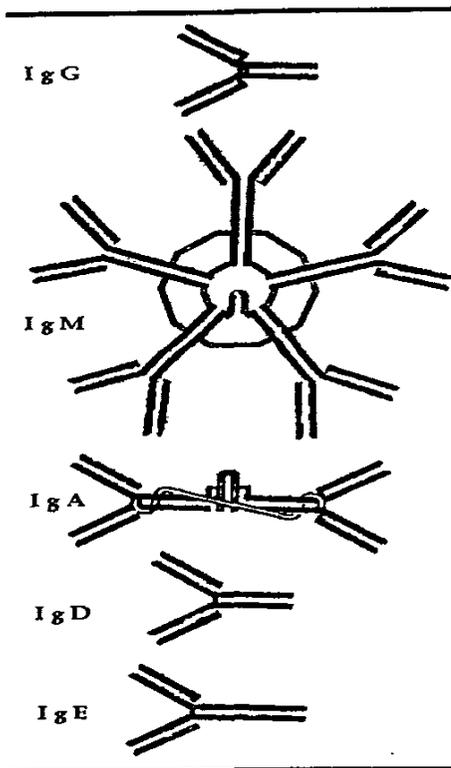


Figura.6. Clases de Inmunoglobulinas. Las IgG e IgM se encuentran en la circulación sanguínea y constituyen a los Ac denominados anticuerpos séricos. Las IgA se encuentra presente en la circulación sanguínea al igual que en secreciones del epitelio del tracto respiratorio, digestivo y genitourinario, así como en la leche, saliva y lágrimas. La IgE es un Ac denominado citofílico ya que se encuentra en la membrana citoplasmática de algunas células como las cebadas y basófilos.

El *Complejo Principal de Histocompatibilidad* (MHC) es un conjunto de glicoproteínas polimórficas que de acuerdo a sus características estructurales han sido agrupadas en tres clases:

- Las moléculas de Clase I están constituidas por proteínas integrales que se asocian de forma no covalente con la β -2-microglobulina, esta última codificada por un gene localizado fuera de la región del MHC(Fig.7). Estas moléculas se expresan sobre la superficie de todas las células nucleadas y plaquetas, sobre estas moléculas se acomoda el Ag que será reconocido por los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$).^{26,37}
- Las moléculas de Clase II están constituidas por dos proteínas integrales de membrana; estas cadenas que se denominan α y β , se asocian de forma no covalente formando un heterodímero. Las moléculas de clase II se expresan sobre linfocitos B y T, células del

sistema fagocítico mononuclear y algunas células accesorias cuya función es la de presentar al Ag. Sobre el heterodímero de las moléculas de clase II se acomoda el Ag que será reconocido por linfocitos T cooperadores (CD4⁺).^{26,37}

- Las moléculas de Clase III, aunque también polimórficas, no contribuyen al reconocimiento del Ag e incluyen entre otros a los genes que codifican para varios factores del complemento, TNF.^{26,37}

El MHC está compuesto de aproximadamente 100 genes e isotipos arreglados dentro de la cadena de DNA en el cromosoma 6 en humanos⁶⁷, y en ratones 58 genes y fracciones de genes en el cromosoma 7⁷⁷ y referido como el sistema HLA en humanos y H-2 en ratón.⁴²

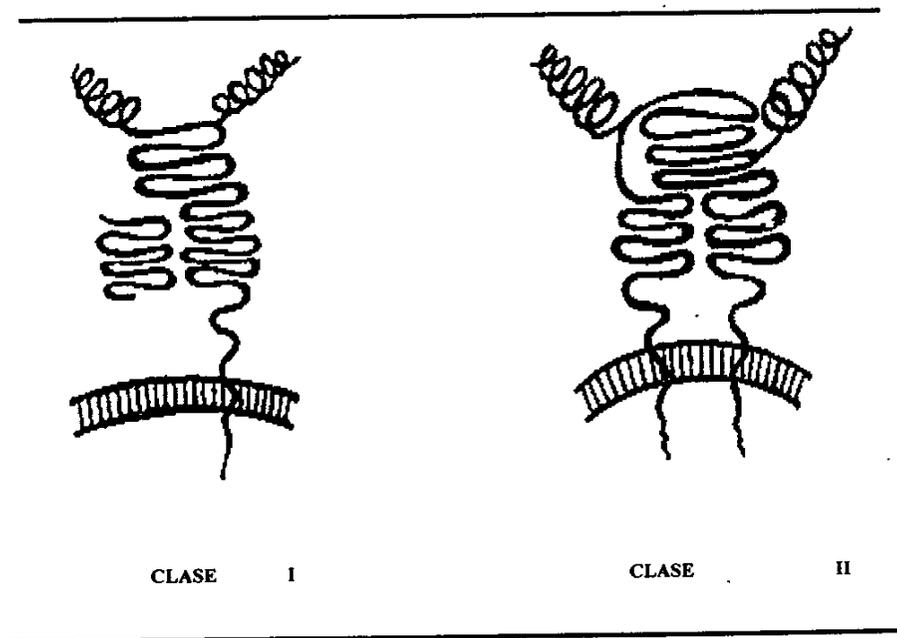


Figura. 7. Moléculas del MHC clase I y clase II

Los linfocitos T tienen la función de producir *linfocinas*, también denominadas *interleucinas o citocinas*; ellas son glicoproteínas con homología estructural; son producidas por diferentes células, aquellas producidas por linfocitos activados reciben el nombre de linfocinas, mientras que aquellas particularmente relevantes en la comunicación entre linfocitos son denominadas interleucinas; tienen una vida media corta (30 min. aproximadamente), su actividad biológica es muy alta (actividad específica de 10^6 a 10^8 unidades/mg), las células estimulables por citocinas presentan sobre su membrana receptores específicos; existen formas solubles de los receptores que pueden ser importantes para bloquear, de forma específica, la actividad de su citocina complementaria.¹⁶ Una citocina particular puede exhibir una acción autócrina relacionada a la misma célula que la secretó; una acción parácrina ligada a la célula más cercana y en algunas ocasiones puede exhibir una acción endócrina ligada a una célula distante.⁴²

Las citocinas regulan la intensidad y duración de una RI estimulando o inhibiendo la proliferación de algunas células o la secreción de Ac u otras citocinas. Sumado a la complejidad de la función de una citocina, dos citocinas pueden presentar sinergismo en donde sus efectos combinados en la actividad celular es más grande que los efectos de las citocinas individuales. En otros casos presentan antagonismo, los efectos de una inhiben los de la otra.⁴²

1.1.3. Bases Celulares de la RI

Al proceso de degradación de las proteínas hasta péptidos y a la asociación de los péptidos con las moléculas de clase I o clase II se le conoce como *procesamiento y presentación del Ag* (Fig.8). En el mecanismo de procesamiento los únicos péptidos que se pueden asociar a las moléculas de clase I son producto de la degradación de proteínas sintetizadas intrínsecamente por la célula presentadora; estos péptidos se generan en el citoplasma y son transportados al lumen del retículo endoplasmático rugoso donde se asocian con las proteínas de clase I sintetizadas²⁹

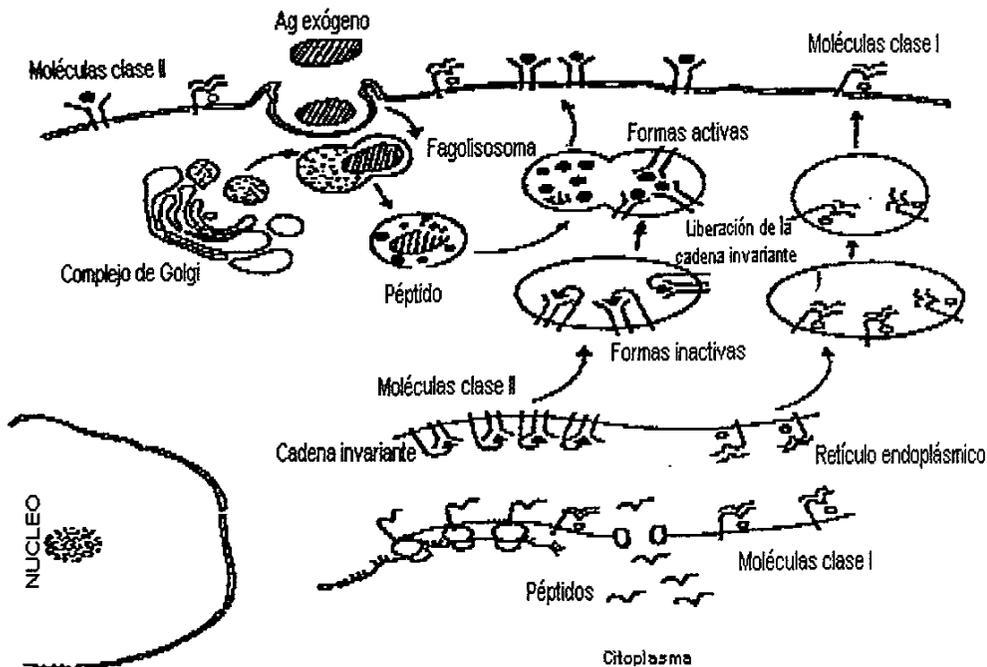


Figura. 8. Vías de procesamiento y presentación de los Antígenos

El procesamiento y presentación de Ag asociados a las moléculas de clase II involucran endocitosis y degradación en los fagolisosomas, estas funciones las realizan principalmente células del sistema fagocítico mononuclear. La asociación de los péptidos con moléculas de clase II ocurre en la vacuola fagocítica durante el transporte de estas proteínas hacia la cara externa de la membrana plasmática. Normalmente, los péptidos generados durante la digestión en las vacuolas fagocíticas no tienen contacto con el citoplasma, por lo que no tienen oportunidad de asociarse con las moléculas de clase I.³¹

Puesto que las moléculas de clase II sólo se expresan sobre linfocitos B, células del sistema fagocítico mononuclear y células accesorias, solo estas células tendrán la capacidad de presentar Ag a los linfocitos TCD 4.²⁹

El reconocimiento del Ag a través del receptor del linfocito T no es el único requisito para iniciar la activación, para que ésta se lleve a cabo se requiere de otra serie de señales, algunas de ellas proporcionadas por la misma célula presentadora del Ag y otras proporcionadas por otros linfocitos activados. De hecho, la asociación entre el MHC y péptido con el receptor T es de baja afinidad, por lo que requiere de la participación de varios pares de moléculas que aseguran una adecuada interacción entre la célula presentadora y el linfocito T.(Fig.9).^{37,57}

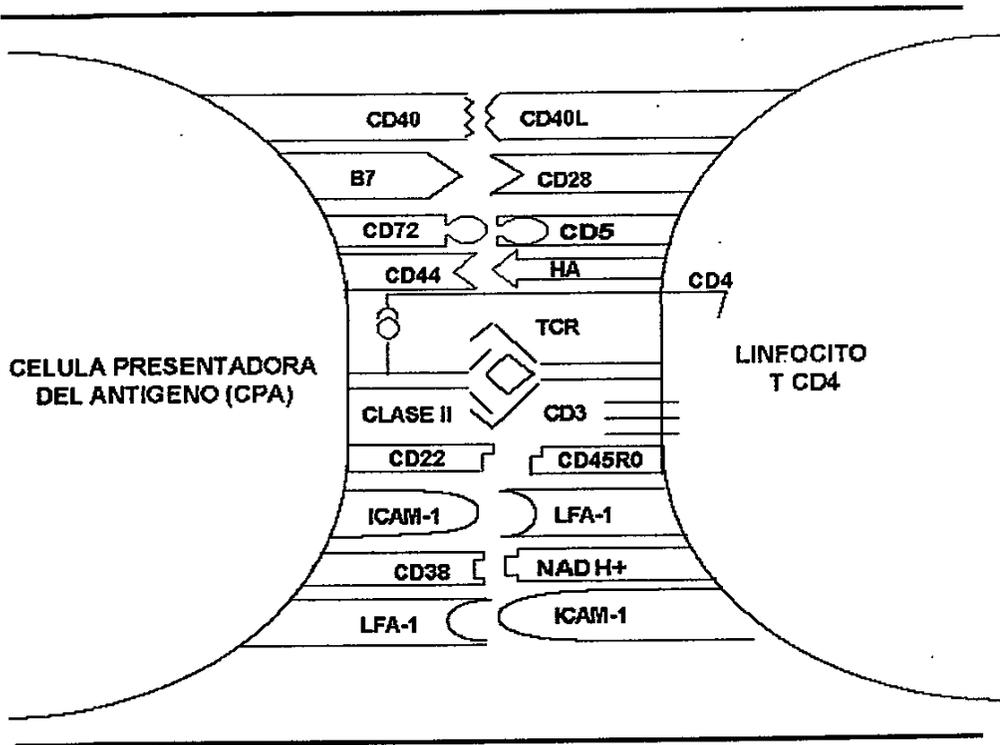


Figura. 9. Moléculas que participan en la interacción entre linfocitos T y células presentadoras del Antígeno. CD22 es una glicoproteína integral presente únicamente en la superficie de los linfocitos B y se encuentra preferentemente en células que ya han complementado su proceso de maduración

A diferencia de la célula T, el linfocito B no requiere de presentación del Ag por células, el Ag tampoco requiere ser procesado, por lo que el linfocito B reconoce fundamentalmente Ag conformacionales (esto es, que dependen de la estructura tridimensional de la molécula), mientras que la célula T reconoce Ag's secuenciales (dependen del orden de los aminoácidos).

El linfocito B puede reconocer Ag independientemente de su naturaleza química, por ejemplo: proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos e incluso Ag's sintéticos. Sin embargo, como en el caso de la célula T, la estimulación antigénica a través de su receptor específico no es tampoco suficiente para completar el proceso de activación. En este caso también se requiere de una serie de señales proporcionadas por las interleucinas (IL), además de moléculas presentes en las membranas del linfocito T. Es importante enfatizar que la comunicación entre células B y T no es unidireccional, ya que el linfocito B a su vez proporciona una serie de señales a través de IL y de moléculas de la superficie que activan también a la célula TCD4 (fig.9.)^{44,57,65}

La activación del linfocito TCD4 requiere de que el Ag le sea presentado sobre moléculas del CMH clase II, además requiere de IL-1 α . También participan moléculas de activación tales como el CD3 del linfocito T y las moléculas clase II de la célula presentadora del Ag⁴⁴

1.1.4.Mecanismos No Específicos

Como ya se sabe el objetivo de los mecanismos de defensa es la de destruir Ag extraños, si estos son moléculas inertes u organismos invasores. Aunque algunas clases de Ac son buenos para neutralizar partículas antigénicas, muchos otros factores, tales como la concentración del Ag, el sitio de entrada del Ag, la disponibilidad del Ac y la velocidad de la RI, pueden influir en la eliminación del Ag. Ciertamente los mecanismos no específicos pueden favorecer los efectos realizados por los Ac. Los principales son las ***células fagocíticas*** (leucocitos polimorfonucleares), las cuales eliminan al Ag (incluyendo

bacterias), y el *complemento*, que puede destruir directamente un organismo o facilitar la fagocitosis.¹⁴

Los macrófagos pueden presentar Ag a los linfocitos pero ellos probablemente lo hacen menos efectivamente que las células dendríticas. El principal papel del macrófago es el de “destruir”, mientras que el papel de las células dendríticas es para concentrar Ag sobre su superficie membranal (la cual puede tener una enorme área superficial) para hacerlos accesibles a los linfocitos.⁶⁸

Los macrófagos tienen prominentes gránulos lisosomales que contienen hidrolasas ácidas y otras enzimas degradantes con las cuales destruyen al material fagocitado. Para llevar a cabo su función efectivamente, los macrófagos deben ser activados, en este estado muestran una actividad fagocítica incrementada y una actividad asesina. Esta estimulación puede deberse a las citocinas o mediadores inflamatorios solubles como el C5a.¹⁴

En el proceso de fagocitosis los macrófagos reconocen al material extraño, lo adhieren a su membrana celular y los “engloban” en una vacuola membranal. Las bacterias ingeridas son asesinadas dentro de las vacuolas, probablemente por la generación de NO y reactivos del oxígeno y después digeridos por enzimas lisosomales.⁶⁸

Las células cebadas del tejido conjuntivo contienen gránulos de sustancias farmacológicamente activas. Tienen Ac de clase IgE fijados en su superficie membranal y cuando estos se enlazan con Ag específicos las células son disparadas para degranularse liberando las sustancias de los gránulos provocando inflamación local, llevando a la acumulación de polimorfonucleares, monocitos, trayendo a ese sitio las células más hábiles para enfrentarse con el Ag y destruirlo. Un gran número de células cebadas están asociadas con las mucosas; ellas son importantes en la respuesta contra Ag inhalados como el polen y el polvo casero.⁶⁸

Los *basófilos* son células polimorfonucleares, contienen gránulos y funciones similares a las de las células cebadas⁶⁸

Los eosinófilos están estrechamente relacionados con los neutrófilos y son células especializadas importantes en la destrucción extracelular de parásitos demasiado grandes para ser fagocitados por otras células por esto ellos dependen de la IgE que cubren al

parásito. Esta destrucción no es una propiedad propia de los eosinófilos, los monocitos, macrófagos y algunos linfocitos pueden eliminar a los microorganismos cubiertos por Ac.¹⁴

Las células asesinas naturales o células NK no dependen de Ac específicos,⁶⁸ pueden ser activadas por agentes tales como mitógenos o interferon. Las células NK no son células inmunes en el sentido estricto porque, no están clonalmente restringidas, no muestran especificidad y no tienen memoria.¹⁴

El sistema del complemento consiste de más de 30 componentes, los cuales actúan en una cascada que conduce a la aparición de tres importantes efectos:

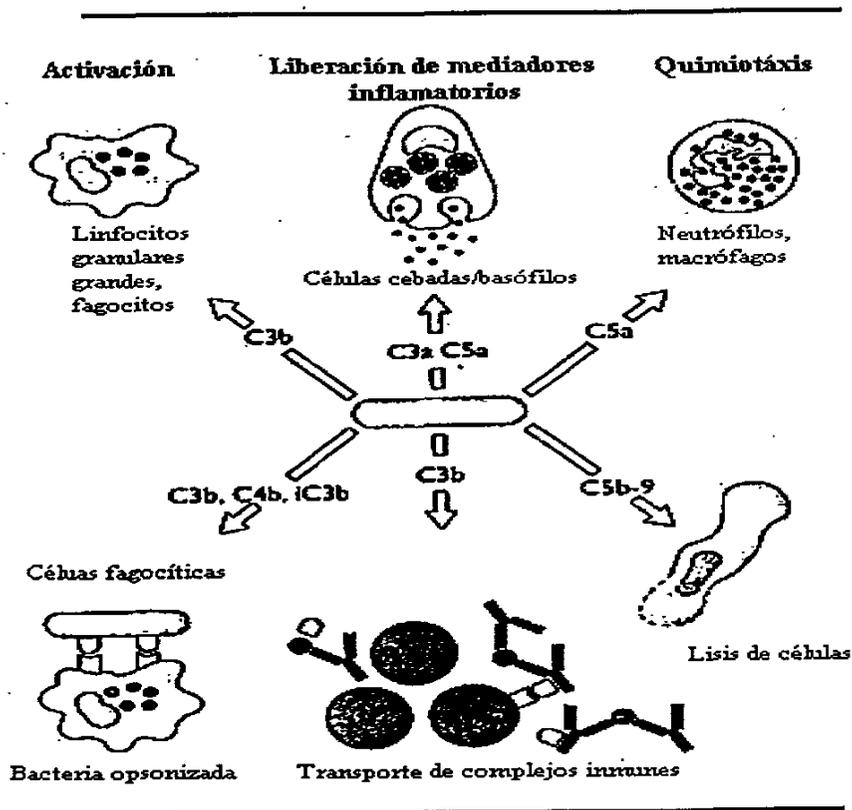


Figura.10. Activación del Complemento. El sistema del complemento está formado por una serie de proteínas séricas que son activadas en secuencia o cascada.

la liberación de péptidos activos en la inflamación, depósito de C3b sobre membranas celulares; este péptido es un potente favorecedor de la fagocitosis (opsonización) y por último, daños sobre la membrana celular que conduce a la lisis. (Fig 10).⁶⁸

Cada precursor de la cascada es cortado en dos o más fragmentos(Fig.11)⁶⁸

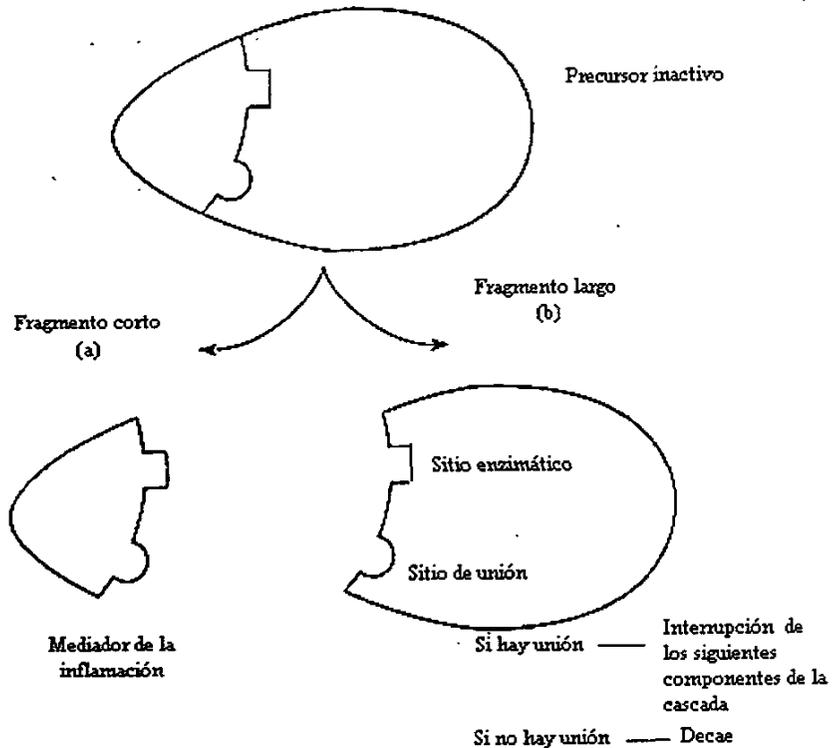


Figura 11. Esquema representativo del fraccionamiento de los factores del complemento. El fragmento largo (usualmente designado "b") tiene dos sitios biológicamente activos: uno para unirse a la membrana celular o al complejo desencadenante y el otro para el desprendimiento del próximo componente del complemento. Los fragmentos cortos generados por el desprendimiento del complemento tienen propiedades biológicas importantes en la fase fluida como es la actividad quimiotáctica (designados con una "a"); también contribuyen a la respuesta inflamatoria, mientras que otros atraen neutrófilos y macrófagos para la subsecuente opsonización y fagocitosis.

La activación del complemento ocurre en dos fases: Primero la activación del componente C3 y después la activación de la secuencia lítica o de "ataque". El fragmento mayor (C3b), activado por C3 convertasa es mediador de un número de actividades biológicas como la opsonización, lisis y la inflamación. El paso crítico es el desprendimiento de C3 por enzimas derivadas del complemento llamadas C3-convertasas, este desprendimiento se logra por dos rutas: la clásica y la alternativa, ambas pueden generar C3-convertasas pero en respuesta a diferentes estímulos (Fig.12).¹⁴

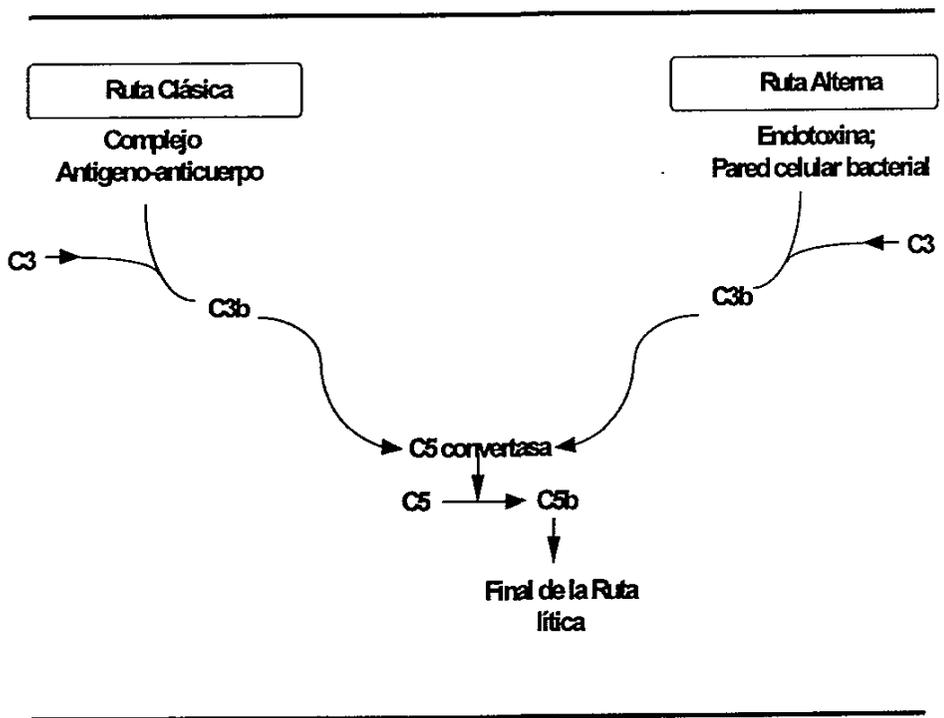


Figura.12 Rutas del Complemento y sus factores de iniciación. La vía clásica es considerada como un mecanismo dependiente de Ac, la vía alternativa es un mecanismo filogenéticamente más primitivo y por ende no requiere de Ac y se encuentra activo a un nivel bajo constantemente.

Se ha encontrado una vía adicional innata independiente de Ac que puede activar la vía clásica:

1. Colectinas: son un grupo de proteínas que comparten características estructurales similares a la colágena y funcionales con lectinas. los principales miembros de esta familia son la proteína-sérica-ligadora-de-manosa (PSLM), las proteínas surfactantes pulmonares A y D y la congulinina. Todas ellas se adhieren al m.o. vía carbohidratos en la superficie de estos; a su vez pueden unirse a los receptores de C en los fagocitos aumentando así la fagocitosis.. PSLM puede activar la vía clásica emulando la función C1q.

Las proteínas de fase aguda aumentan sustancialmente su concentración en respuesta a ciertos mediadores de “alarma” como IL-1 β e IL-6. Entre estas proteínas se encuentra la proteína C-reactiva la cual al unirse a fosforilcolina en la superficie de m.o. activa al C, con la consecuente opsonización por deposición de C3b.⁷¹

Existen numerosas células capaces de ingerir material extraño, pero la posibilidad de aumentar esta actividad en respuestas a una opsonización mediada por anticuerpos y/o complemento, está restringida a las células de la serie mieloide, principalmente PMN, monocitos y macrófagos que en conjunto se engloban en el término **fagocitos**.⁵

La fagocitosis es una función realizada por dos tipos de células: neutrófilos y monocitos y/o macrófagos. Los neutrófilos son las células más abundantes entre los leucocitos circulantes. Los monocitos reciben este nombre mientras se encuentran en la circulación sanguínea ya que en los órganos y tejidos se les denominan macrófagos. Estos últimos son particularmente importantes por su participación en los procesos infecciosos, los macrófagos alveolares del pulmón, las células de Kupffer en el hígado y los macrófagos asociados a los órganos linfoides secundarios.⁷

El proceso de fagocitosis se divide en diferentes fases (Fig. 13)⁵⁰

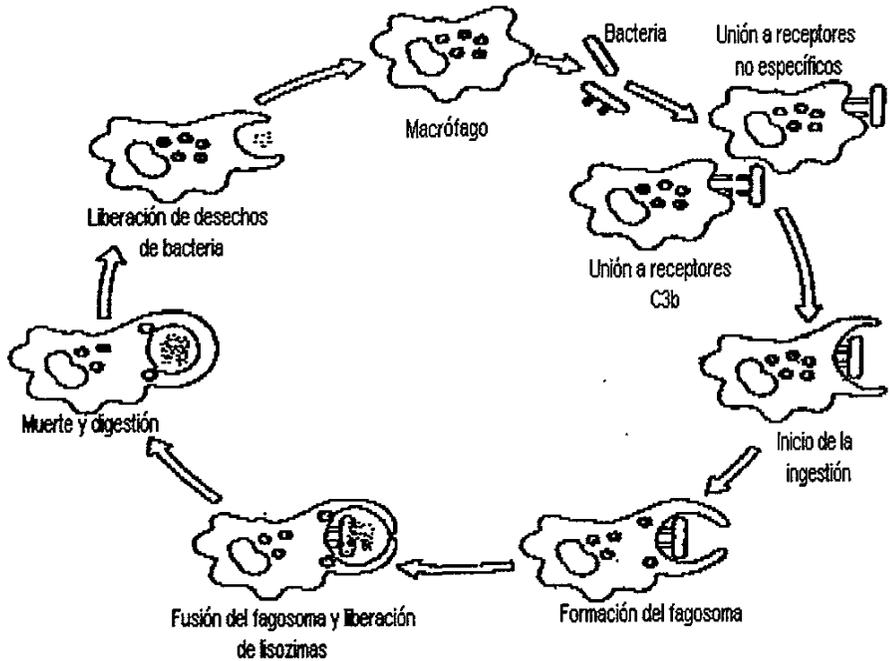


Figura.13. El proceso de Fagocitosis. 1.Acercamiento del fagocito al patógeno; en este momento son importantes factores con propiedades quimiotácticas como algunas citocinas y fracciones del complemento.2.Adherencia: el fagocito establece contacto con el patógeno a través de su membrana citoplasmática.3.Interiorización, el patógeno es englobado por la membrana citoplasmática del fagocito hasta quedar incluido en una vacuola denominada *fagosoma*. 4.Fusión con los lisosomas; los lisosomas vierten su contenido enzimático al interior del fagosoma formándose el denominado *fagolisosoma*.

Las reacciones inflamatorias son el resultado de un daño celular que resulta en la liberación de factores (como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos entre otros) cuyo efecto neto es vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Estos cambios traen como consecuencia la salida de células sanguíneas (granulocitos, monocitos y linfocitos) y proteínas plasmáticas (complemento e Ig) que en su conjunto participan en el ataque a los patógenos.⁵⁰

1.2.ELEMENTOS DE INMUNOFARMACOLOGIA

Aunque la mayoría de los individuos tienen un SI que responde apropiadamente contra Ag extraños hay pacientes cuya enfermedad es causada por RI's excesivas o defectuosas. La inmunología clínica tiene como objetivo corregir estas anomalías.¹⁴

La Inmunofarmacología es una rama de la inmunología clínica que se encarga del estudio de los mecanismos por los cuales es posible la manipulación de la RI de un individuo en beneficio de éste para el tratamiento de enfermedades⁶³, esto puede ser posible por dos formas: inmunosupresión ó inmunopotenciación .

La Inmunofarmacología es aún una disciplina farmacológica y terapéuticamente joven. Para muchas personas quiere decir, el efecto de agentes inmunofarmacéuticos sobre el SI y sus funciones (fig. 14), estos agentes pueden ser de origen endógeno, sintético o microbiano. Otros consideran que inmunofarmacología es lograr efectos farmacológicos con productos inmunológicos, por ejemplo Ac, linfocinas y otros factores, en su mayor parte constituidos por proteínas. Para los clínicos , la inmunofarmacología es la base para el tratamiento de enfermedades del SI, particularmente las enfermedades autoinmunes y anafilácticas y reacciones atópicas.²⁴

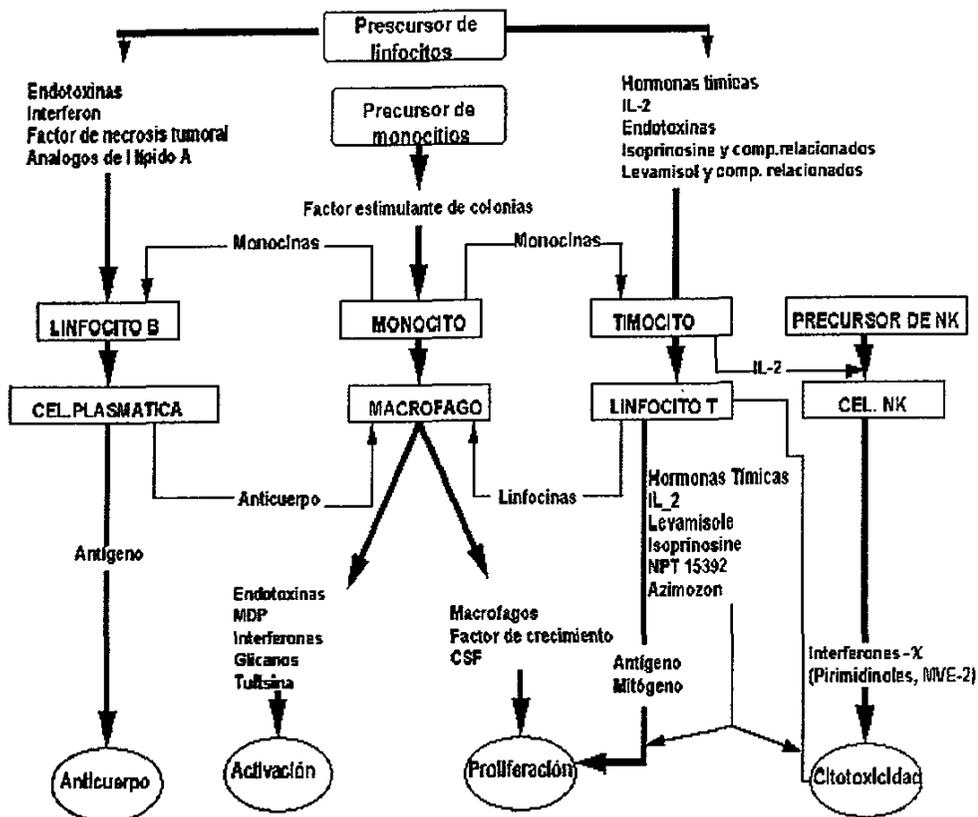


Figura. 14. Sitios de acción de la terapia inmunomoduladora o inmunorestaurativa.

Existen diferentes sustancias llamadas “Inmunomoduladores” que tienen un efecto activador o represor de la RI. En una buena parte de los casos, los inmunomoduladores se usan como medida terapéutica en situaciones que involucran a la RI como en el caso de las enfermedades autoinmunes, infecciones crónicas e inmunoterapia de cáncer. Se consideran cinco tipos de inmunomoduladores:

- Citocinas
- Inmunoestimulantes
- Adyuvantes
- Agentes Inmunosupresores
- Inmunotoxinas.³¹

Como ya se mencionó el origen de cada una de estas sustancias es variado:

1. Endógeno:

- * Sistema Inmune: Interferon- γ , interleucinas, hormonas tiroideas, tuftsinas, etc.

2. Microbial:

- *Bacterias y Hongos: Glicanos, endotoxinas, muramildipéptido, etc.

3. Sintético:

- *Compuestos que contienen sulfuro
- *Purinas y pirimidinas
- *Polinucleótidos y otros.³³

Actualmente existen otros métodos de manipulación inmunitaria que producen beneficios clínicos definitivos por mecanismos poco entendidos. Esto se ilustra bien con la terapia con Ig intravenosas y Ac monoclonales: ellos pueden suprimir, potenciar o modificar la RI dependiendo de su especificidad y circunstancias clínicas.¹⁴

Dentro de la inmunología se encuentra la *Inmunotoxicología* que está definida como el estudio de los efectos de diversas sustancias sobre el SI. La función más importante del SI como ya se ha mencionado es la de mantener los mecanismos de defensa del huésped. Existen dos tipos de consecuencia que no son deseables y que pueden originarse por la interacción de fármacos o químicos del medio ambiente y el SI:

1. Alteración en los mecanismos de defensa del huésped dando como consecuencia daño o aumento en la RI normal.
2. Inducción de una RI cualitativamente anormal, por ejemplo: alergia y autoinmunidad. La inmunotoxicología involucra a estos tipos de daño ó efecto.²¹

1.2.1. *Inmunoestimulantes o Inmunopotenciadores*

Con el término de *Inmunoestimulante* se describen a una serie de sustancias que tienen un efecto activador inespecífico sobre la RI. Conviene subrayar el efecto inespecífico, para distinguirlo del producido por los adyuvantes, que son compuestos utilizados para producir un efecto antigénico específico.⁵¹

Los Inmunoestimulantes afectan el SI de tal forma que como resultado se observa una mejoría en la calidad y cantidad de la RI.⁶² En términos generales, los inmunoestimulantes promueven la generación de linfocitos (B y T) , monocitos y macrófagos a partir de precursores en la médula ósea; así mismo estimulan las ramas efectoras de la RI, es decir, la inmunidad humoral y celular. En el aspecto clínico el uso de estos compuestos se asocia al tratamiento del cáncer e infecciones persistentes entre las que se incluye el SIDA.⁴

La mejor forma establecida de inmunopotenciación es la **inmunización**, prevención de enfermedades infecciosas controlando (o eliminando) el foco de infección, rompiendo la cadena de transmisión e incrementando la resistencia del individuo.¹⁴

Hay dos formas de lograr la inmunidad: Inmunización activa o pasiva; puede ser adquirida naturalmente o inducida artificialmente (fig.15)¹⁴.

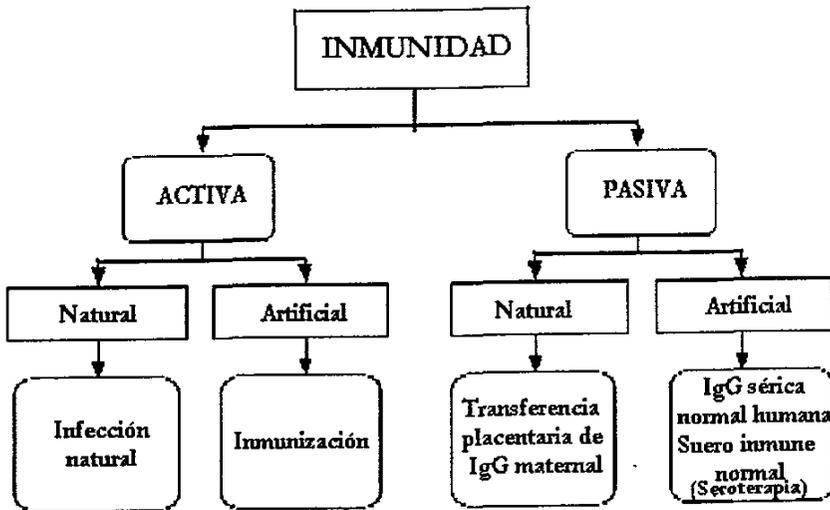


Figura. 15. Clasificación de Inmunidad *La inmunidad activa natural* es adquirida al exponerse el hospedero a un estímulo antigénico que despierta una RI, ejemplo de inmunización activa: Infección Natural. *La inmunización activa artificial* involucra la administración deliberada de un inmunógeno en forma de una vacuna. Pacientes en riesgo expuestos a ciertas infecciones se les puede dar algún grado de *inmunidad ó protección pasiva* usando Inmunoglobulina normal Humana o Inmunoglobulina específica humana. La Inmunidad Pasiva es de vida corta debido a que los anticuerpos IgG son catabolizados lentamente (vida media de 3 semanas).

La Inmunoglobulina normal humana, en forma de inmunoglobulina intravenosa o intramuscular es esencial en el tratamiento de pacientes con deficiencia primaria de anticuerpos pero también es usado como una agente profiláctico de corto tiempo contra sarampión en niños inmunosuprimidos y para proveer protección contra Hepatitis A. Las Inmunoglobulinas específicas humanas son escasas y se dan solamente cuando se llenan ciertos criterios.¹⁴

Recientemente se cuenta con una gran variedad de tipos y orígenes de inmunoestimulantes.

- A. Origen microbiano: Glicanos con enlaces β -1-3 glicosídicos
Muramildipéptidos (MDP , BCG)
Endotoxinas (Lipopolisacáridos -LPS-)
Extractos tímicos (Timulín, Timusina α -1)
- B. Origen sintético: Derivados de MDP (Murabítide)
Lípidos A análogos (Monofosforil-lípido-A)
Ubenimex (Bestatin)
Péptidos tímicos (Timosin α , Tufsin)
Fármacos timomiméticos (Ditiocarb)
Inductores de Interferon (Apligen)
Purinas y Pirimidinas (Inosine)
- C. Endógeno: Hormonas tímicas
TNF
Citocinas.^{24,32,33}

La forma más específica de la restauración de la función inmune es reemplazando una enzima ausente o el gen que la codifica, a esto se le ha nombrado **Terapia Genómica**.

La complejidad del SI permite que un número grande de puntos hipotéticos de ataque y mecanismos sean utilizados para estimular una RI particular .Tabla. 1.²⁴

Sitio de acción	Posible mecanismo de acción	Sustancias conocidas
Presentación del Ag	Absorción y procesamiento del Ag. Expresión de Antígenos del MHC	Constituyentes de la pared celular microbial. Interferones.
Reconocimiento del Ag.	Mejoramiento en la transmisión de la señal intracelular	
Activación de Linfocitos	Expresión de receptores para IL-2. Síntesis de IL-2 y otras linfocinas como IFN y THF.	Gamma-interferon? IL-1
Expansión clonal	Acción de interleucina-2; amplificación de las funciones T-cooperadoras.	IL-2
Reclutamiento de células T precursoras	Funciones dependientes del Timo. Hormonas tímicas? Células dendríticas del timo?.	Timosin fracción 5 Timosin alfa
Inducción de linfocitos T citotóxicos	Dependiente del timo Dependiente de IL-1 y IL-2	Isoprinosine? Timosin THF y otras hormonas tímicas. IL-2.
Mejoramiento de los mecanismos no específicos	Activación de macrófagos (fagocitosis, receptores Fc y C3b, CMH, funciones secretorias) Reclutamiento de monocitos y macrófagos.	Ag microbiales Interferones interferon- gamma, levamisole?, bestatin?). M-CSF GM-CFS.
Células NK	Reclutamiento y activación de células NK.	IFN- γ). IL-2
Granulocitos	Activación y reclutamiento.	Factor inhibitorio (NAF?) GM-CSF

Tabla. 1. Facetas de la RI. Posibles sitios de acción por los cuales se puede llegar a la inmuoestimulación.

1.2.1.1. BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*)

En muchas ocasiones los microorganismos (m.o) se han empleado como agentes inmunizantes , frecuentemente se les ha usado muertos por calentamiento o se pueden usar cepas vivas atenuadas, las que como consecuencia de mutaciones han perdido totalmente o en gran parte su virulencia y su capacidad de inducir una RI.^{14,46}

Las vacunas atenuadas, cuando son inoculadas pueden producir formas subclínicas de la enfermedad e inducir en esta forma una RI. Estos Ac inducidos por el m.o. atenuado pueden defender posteriormente al individuo contra otros m.o. virulentos del mismo tipo.⁶¹ Debido a su capacidad de crecimiento transitorio, tales vacunas proporcionan una exposición prolongada de los epítomos individuales de los m.o. atenuados al SI., resultando un aumento en la inmunogenicidad y en la producción de células de memoria; por esto muchas veces solamente es necesaria una sola inmunización, eliminando la necesidad de dar un refuerzo.⁴²

Tal es el caso de la vacuna BCG, proveniente del bacilo tuberculoso bovino (*Mycobacterium bovis*) conocido como Bacillus Calmette-Guerin;^{42,46} en esta vacuna el bacilo fue atenuado en su virulencia por periodos prolongados bajo condiciones de cultivo especiales (concentraciones altas de bilis de buey).^{11,61}

La tuberculosis es causada primordialmente por la bacteria intracelular facultativa *Mycobacterium tuberculosis* y en un menor grado por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*. Un reciente estudio indica que el BCG reduce el promedio de riesgo de contraer tuberculosis en un 50%.¹⁸

Se sabe que esta vacuna :

- favorece la producción de Ac y aumente el número de células de bazo productoras de Ac.
- aumenta la hipersensibilidad retardada a los Ag particulados y solubles
- es capaz de activar el sistema del complemento por la vía alterna¹⁵
- favorece el rechazo inmunológico de tumores, esto depende del efecto potenciador que las micobacterias ejercen sobre la RI en general

- aumenta la resistencia a infecciones (inmunostimulación inespecífica), esto consiste en provocar la hiperplasia y la hiperactividad del sistema reticuloendotelial.⁵⁵

El *Inmunocyst*TM (BCG) es el primer inmunomodulador con licencia en los Estados Unidos y Canadá para ser usado en el tratamiento de carcinoma de vías urinarias. Por lo tanto este producto puede ser usado como modelo para licenciar otros moduladores inmunes.¹²

1.2.2. Inmunosupresores

Las enfermedades autoinmunes constituyen un grupo de padecimientos en los cuales el SI reacciona contra células y tejidos propios ocasionando daño o pérdida de función. En estas circunstancias resulta conveniente suprimir la RI y aunque idealmente esta supresión se desearía fuera específica contra los Ag propios atacados, esto resulta difícil de conseguirse, por lo que el tratamiento inmunosupresor usualmente es inespecífico. Un segundo escenario en donde la inmunosupresión resulta útil, es durante la etapa previa y posterior a un transplante de órganos o tejidos.²⁴

A continuación se hace una clasificación de los agentes inmunosupresores con base en su acción:

- Con acción preferentemente sobre linfocitos T
 - Ciclosporina A
 - FK-506
 - Azatioprina
- Con acción preferentemente sobre linfocitos B
 - Ciclofosfamida
- Con acción antiinflamatoria
 - Prednisona
 - Metotrexato

Dado el conocimiento bastante detallado del proceso de activación de los linfocitos T, es posible diseñar algunas estrategias que resulten en supresión más específica, idealmente antígeno-específica. A continuación se mencionan algunas posibilidades:

1. Interferencia o bloqueo de la función de presentación de péptidos antigénicos por parte de las moléculas de clase II del MHC
2. Interferencia con la interacción CD4-antígeno clase II del MHC.
3. Reforzamiento de la tolerancia a auto-antígenos.
4. Activación de linfocitos T que llevan a efectos supresores.⁵¹

1.3.FESCDIPINA

La FESCDIPINA es un análogo de Nifedipina, producto de la síntesis de Hantsch y se encuentra en proceso de patente.³⁰

Se ha encontrado que este tipo de compuestos está clasificado dentro de los calcioantagonistas y son usados efectivamente en el tratamiento de varios desordenes cardiovasculares, ya que posee propiedades antiarrítmicas y antihipertensivas,^{10,34,52} cuyo mecanismo de acción es a través del bloqueo de la entrada de calcio (Ca^{++}) a la musculatura vascular con la consecuente relajación de dicho músculo; vasodilatación, disminución de la resistencia periférica y caída de la tensión arterial. Disminuyen las cifras tensionales sin producir a) hipotensión ,b) cambios en el gasto cardíaco, c) retención de agua y sodio , mantiene inalterado el flujo sanguíneo renal, el perfil lipídico y el ácido úrico plasmático.⁴⁸

Estos fármacos son aplicados en problemas de angina de pecho en todas sus variantes, hipertensión, protección de miocardio durante infarto, prevención del desarrollo

de espasmocoronario de tipo Prinzmetal; recientemente estos agentes han sido introducidos en el tratamiento de cardiomiopatías hipertróficas y en insuficiencia coronaria.^{48,52}

El Ca^{++} es un mensajero transmembranal en la señal de activación de linfocitos. Se ha encontrado que los bloqueadores de los canales de Ca^{++} inhiben la proliferación de células T y la aparición de Ag de activación después de la estimulación con mitógenos. Estos agentes inhiben la afluencia normal del Ca^{++} requerido para la activación de linfocitos y de este modo inhiben la respuesta proliferativa de linfocitos.⁹

Numerosos estudios indican que el ion Ca^{++} es esencial en la función óptima de neutrófilos (PMN's).^{31,41} Los antagonistas de Ca^{++} reducen la capacidad bactericida de los PMN's, esto es, que afectan la función antimicrobial de los PMN's, así como la degranulación y quimiotaxis ya que estas dependen del Ca^{++} para llevarse a cabo,^{28,66} se ha encontrado que también pueden revertir los cuadros de asma e inhibición anafiláctica.²¹

1.4 QUITOSAN

El *Quitosan* es un derivado de la Quitina que son compuestos cristalinos cuya estructura esta formada de polisacáridos que ha sido bien estudiada por medio de difracción de Rayos-X, espectrofotometría de Infrarrojo, espectroscopia vibracional.⁵⁸ Se ha encontrado distribuido ampliamente en la naturaleza, por ejemplo en el exoesqueleto de crustáceos, en la cutícula de algunos insectos y en la pared celular de bacterias y hongos.³⁵

Estas estructuras esqueléticas por así llamarlas, están compuestas de una matriz orgánica formada por:

- un centro de macromoléculas estructurales (polisacáridos o proteínas)
- una cubierta de una o varias envolturas de proteínas ácidas, glicoproteínas y mucopolisacáridos. Se observa que las proteínas son los principales componentes (50-80% de la matriz peso en seco). Las quitino-proteínas se encuentran presentes en cada capa calcificada de las estructuras esqueléticas y pueden ir desde 0.01 al 40 % de la matriz peso en seco.⁶⁰

La composición de la matriz orgánica es la siguiente:

1. Una fracción polipeptídica ácida con fuerte afinidad a los iones Ca^{++} , en su mayor parte soluble en reactivos decalcificantes. Este arreglo implica una cadena peptídica en forma de espiral. Esta región es llamada "Matriz Mineralizada" (MM).
2. Un complejo quitino-proteico con alto peso molecular y sin afinidad a los iones Ca^{++} , organizada en forma de láminas y capas llamada "Acarreador de Proteínas" (CP).

La unión de estas dos regiones activan la mineralización del sustrato, llevándolo a un depósito epitaxial de CaCO_3 . De este modo aparece una estructura en forma de "sandwich" con la quitinoproteína incrustada entre dos láminas de MM (Fig. 16).⁶⁰

Las quitinoproteínas sirven muchas veces como un soporte elemental y se parecen en este respecto a la celulosa y colágena en plantas y vertebrados, respectivamente. Esto se demostró cuando se utilizaron inhibidores de la síntesis de quitina y estos interrumpieron la formación de polisacáridos resultando malformaciones en la cutícula de insectos, careciendo de sus propiedades normales exoesqueléticas e incapaz de resistir incrementos internos de presión durante su muda.¹⁷

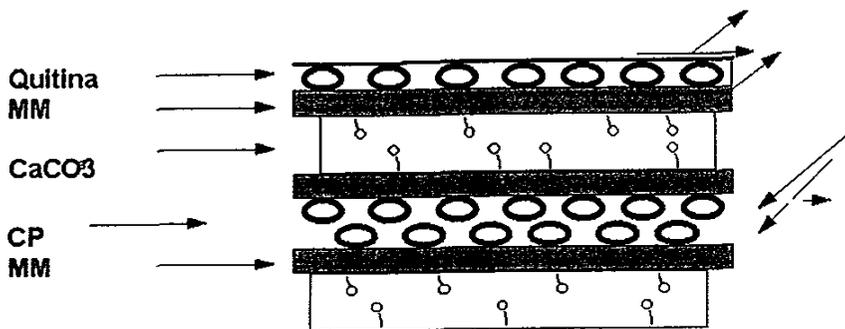


Figura. 16. Estructura de las capas quitinoproteicas

El Quitosan es uno de los principales productos quitinosos, es importante por su utilidad en los sistemas de purificación, clarificación y concentración de sólidos de agua potable y residual.³ También ha sido usado en operaciones vasculares, cultivo de tejidos y regeneración de tejidos, tiene función como agente hemostático y algunos preparados funcionan como anticoagulantes.^{27,45,53}

Recientemente se ha reportado que el Quitosan es efectivo en la protección del hospedero contra infecciones con *Cándida albicans* y *Staphylococcus aureus* y contra el crecimiento de tumores de ascíticos como Sarcoma 180 y el Erlich.⁵⁴

Se ha encontrado también que los derivados de la quitina tienen actividad como adyuvante en la activación de macrófagos, en la producción de Ac circulantes e inducción de células T citotóxicas, activación de células NK e inducción de citocinas como IL-1. Estos compuestos proporcionan una inmunostimulación no específica, especialmente en hospederos inmunocomprometidos como por ejemplo: pacientes con cáncer.³⁵

2.0. HIPÓTESIS

Si el Quitosan y la Fescdipina ejercen un efecto sobre el sistema inmune, estos deberán mostrar una actividad similar o contraria a la de la vacuna Calmette-Guerin (BCG) que es catalogada como un inmunooestimulante, basándonos para ello en los valores hematológicos e inmunológicos característicos de ésta.

3.0 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer la metodología teórica y experimental inicial que será ocupada para evaluar el efecto que sobre el sistema inmune puedan desarrollar diferentes productos, con la finalidad de saber si afectan o no al sistema inmune empleando técnicas sencillas de laboratorio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el efecto en la inmunidad humoral del BCG, Quitosan, Nifedipina y Fescdipina.
- Comparar el efecto en la actividad fagocítica del BCG, Quitosan, Nifedipina y Fescdipina.
- Comparar el efecto que a nivel hematológico tienen el BCG, Quitosan, Nifedipina y Fescdipina.
- Con base en los resultados obtenidos determinar si los productos estudiados afectan al sistema inmune y en que medida.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. SUSTANCIAS DE EXPERIMENTACIÓN

QUITOSAN : Purificada y proporcionada por la Q.F.B Patricia Miranda Castro del Laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Posgrado de la FES-C Campo 1.

FESCDIPINA: Sintetizada y proporcionada por el M. C. Enrique Ángeles Altamirano del Laboratorio de Diseño de Medicamentos (Química Medicinal) de la Unidad de Posgrado de la FES-C Campo 1

NIFEDIPINA: Sintetizada por el M.C. Enrique Ángeles Altamirano Laboratorio de Diseño de Medicamentos (Química Medicinal) de la Unidad de Posgrado de la FES-C Campo 1

VACUNA DE BCG: Liofilizado de los Laboratorios Connaught

4.2. MATERIAL BIOLÓGICO

4.2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones Balb/c : reproducidos y criados en el bioterio perteneciente a la Unidad de Posgrado de la FES-C Campo 1.
Los ratones trabajados fueron hembras de un peso entre 25-30g.

4.3. REACTIVOS

Los reactivos empleados fueron de marca Baker, Merck y Sigma de grado analítico

AGUA LIBRE DE PIROGENOS: EAU STERILE

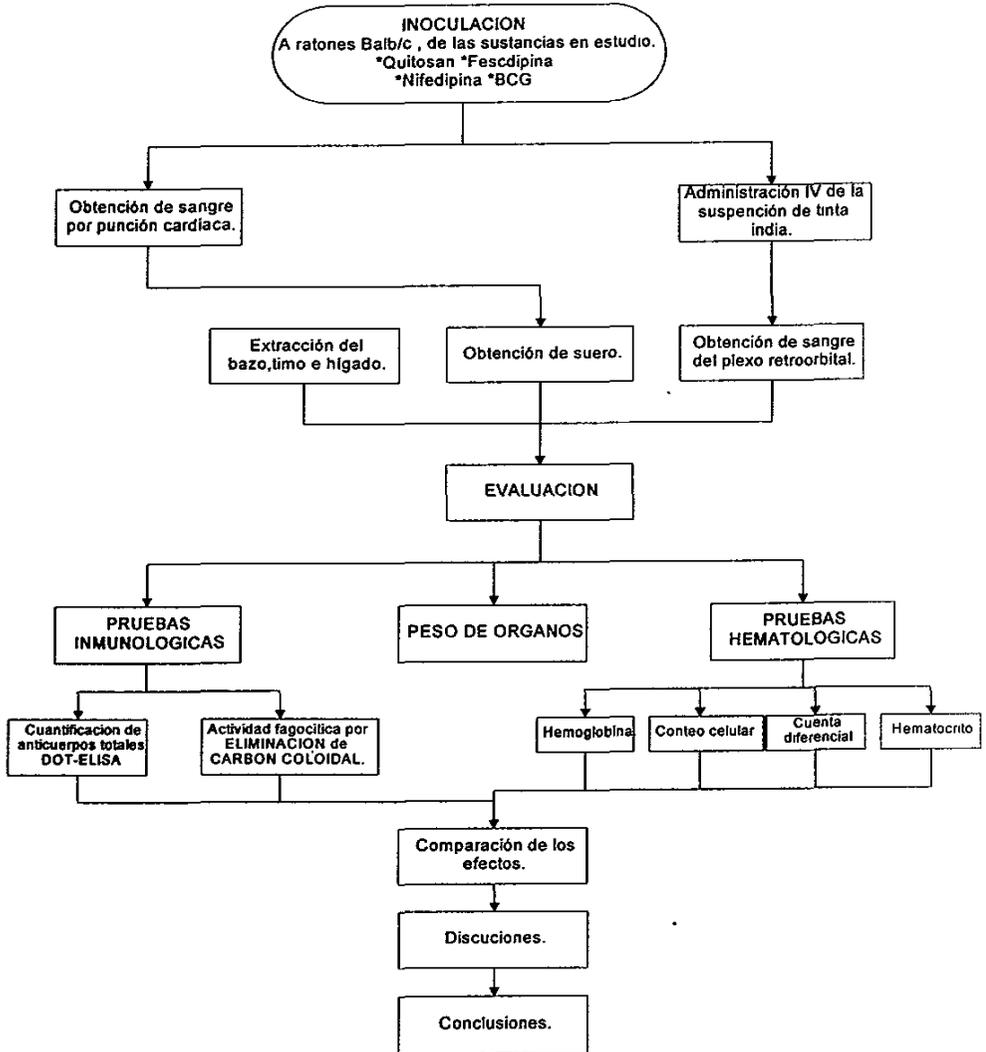
Laboratorios Abbot

4.4. SOLUCIONES PREPARADAS(ver apéndice 1)

- a) REACTIVO DE HAYEN
- b) REACTIVO DE TURCK
- c) EDTA 5%
- d) REACTIVO DE WRIGHT : Instituto Mexicano del Seguro Social
Subdirección General de Abastecimientos
Jefatura de Desarrollo
División de Reactivos
- e) BUFFER DE FOSFATOS pH 7.2
- f) SUSPENSIÓN DE TINTA INDIA: Black Indian INK
Winsor and Newton
- g) SOLUCIÓN DE GELATINA AL 1% EN SSF
- h) SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA AL 0.9%
- i) CARBONATO DE SODIO AL 0.1%
- j) SOLUCIÓN DE LECHE DESCREMADA AL 5%
- k) SALINA-TRIS (TBS) pH 7.2
- l) PROTEÍNA "A" PEROXIDADA DILUÍDA A 1:500 DE LA MARCA SIGMA
- m) SOLUCIÓN REVELADORA

4.5 DIAGRAMA DE FLUJO

Metodología para la evaluación del efecto en el sistema inmune



4.6. PRUEBAS HEMATOLOGICAS

La hematología clínica es una parte de la medicina asociada con las técnicas diagnósticas de laboratorio e interpretación morfológicas relacionadas con la sangre y la correlación de estos datos hematológicos con el estado clínico completo de un individuo.

El examen de la sangre periférica se realiza debido al gran valor que posee el hallazgo de anemias o leucocitosis. Se puede determinar una extensa gama de anomalías en la sangre, mediante estudios cuantitativos o cualitativos.⁷⁵

Tabla no.2. Manejo de ratones para las Pruebas hematológicas y cuantificación de Anticuerpos Totales

GRUPOS	No.RATONES	PESO (g)	EDAD (días)	DOSIS	VIA DE ADM.
A: Control ALP	15	20-25	35-40	0.2 ml	Subcutánea
B: Vacuna de BCG	10	20-25	35-40	0.1 ml.	Subcutánea
C: QUITOSAN	10 10	20-25 20-25	35-40 35-40	100µg/Kg de peso 100 mg/Kg de peso	Subcutánea
D: FESCDIPINA	10 10	20-25 20-25	35-40 35-40	100µg/Kg de peso 100 mg/Kg de peso	Subcutánea
E: NIFEDIPINA	10 10	20-25 20-25	35-40 35-40	100µg/Kg de peso 100 mg/Kg de peso	Subcutánea

ALP= Agua libre de Pirógenos.

- Se administró por vía subcutánea la sustancia a estudiar a cada uno de los ratones en base al cuadro antes mostrado.
- Después de 24 hrs de la administración se extrajo 1.0 ml de sangre intracardiaca
- 0.5 ml de sangre se depositaron en tubos eppendorf conteniendo 0.02 ml de EDTA al 5% Se mezcló con suavidad para que el anticoagulante quedara bien distribuido en la muestra

4.6.1. HEMOGLOBINA

Fundamento

La hemoglobina, componente principal de los glóbulos rojos, es una proteína conjugada que sirve de vehículo para el transporte de O_2 y de CO_2 . Totalmente saturada contiene alrededor de 1.34 ml de O_2 por gramo.

La hemoglobinometría es la medida de la concentración de hemoglobina en la sangre. La anemia (disminución de la concentración de hemoglobina por debajo de lo normal del recuento de eritrocitos o del hematocrito) constituye una alteración muy común y una frecuente complicación de otras enfermedades.¹⁹

Existen muchos métodos para determinar la concentración de hemoglobina. Todos son métodos indirectos porque es muy difícil cristalizar un peso exacto de hemoglobina. Los métodos más comúnmente usados se basan en uno de los cuatro procedimientos siguientes:

1. Medida de la capacidad de combinación de la sangre con el O_2 en el aparato de Van Slyke (Método gasométrico).
2. Medida del contenido de hierro en la sangre (Método Químico).
3. Medida colorimétrica de la densidad de la sangre total en solución de sulfato de cobre de densidad conocida y la determinación posterior de la hemoglobina a partir de unas gráficas previamente elaboradas (Método físico o gravimétrico).
4. Medida colorimétrica de un derivado coloreado de la hemoglobina (por ejemplo: la oxihemoglobina, la hematina ácida, la hematina alcalina y la cianometahemoglobina) y

comparación de la muestra desconocida con una estándar, mediante un método visual, fotoeléctrico o electrónico.

En la sangre normal la hemoglobina y el recuento de hematies puede deducirse apartir del hematocrito (micrométodo) según las siguientes fórmulas:

a) 1 unidad de hematocrito= 0.34 g de hemoglobina/100ml

b) 1 unidad de hematocrito= 107 000 hematies/ml³ de sangre.^{39,59}

4.6.2.1. Procedimiento^{39,59}

- 1) Se hizo la recopilación de los valores de hematocrito.
- 2) Mediante la fórmula : 1 unidad de hematocrito = 0.34 g de hemoglobina/100ml de sangre se calculó el valor de la hemoglobina para cada uno de los ratones Balb/c tratados.
- 3) Una vez obtenidos estos valores se obtuvo la media y la desviación estándar par cada una de las sustancias estudiadas así como para los controles.
- 4) Se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio.

4.6.2. HEMATOCRITO (Micrométodo)

Fundamento

La proporción del volumen sanguíneo que ocupan los eritrocitos (Hematocrito) puede determinarse mediante una centrifugación capaz de amontonar a los hematies en el menor volumen posible. Este parámetro se expresa generalmente en tanto por ciento.⁷³ El hematocrito venoso coincide estrechamente con el obtenido por punción; ambos son mayores que el hematocrito corporal total.¹⁹

Con el fin de determinar el hematocrito es necesario usar un anticoagulante que no cambie el volumen de los eritrocitos, como la heparina, una mezcla de oxalatos de potasio y amoniaco o EDTA. Este índice puede ser medido en una escala *macro*, centrifugando a

relativamente pocas revoluciones, o en una escala *micro*, mediante tubos capilares y alta velocidad de centrifugación.⁷⁵

El hematocrito es usado para determinar índices eritrocitarios, calcular el volumen de sangre y la masa eritrocítica total y establecer si el paciente se encuentra en estado anémico.³⁸

4.6.2.1. Procedimiento ^{36,59}

En un tubo capilar de aproximadamente 7 cm. de longitud es llenado por atracción capilar con la muestra de sangre con anticoagulante en unas $\frac{3}{4}$ partes. El extremo vacío es sellado al fuego por medio de un mechero.

Los tubos que contienen la muestra de sangre se colocaron en los canales radiales de la centrifuga ultra rápida para microhematocrito situando el extremo obturado en la parte opuesta al centro y se opero a 10 000 r.p.m. durante 5 min.

El fondo del tubo capilar contiene los hematies agrupados y encima de ellos existe una capa amarillenta constituida por leucocitos y plaquetas. Mediante una regla milimétrica, sin agitar el tubo se midió la distancia (en mm) que ocupan los hematies desde el fondo del tubo hasta por debajo de la capa de leucocitos y plaquetas.

De donde :

$$\text{hematocrito} = \frac{\text{Volumen ocupado por los hematies (mm)} \times 100}{\text{Volumen total de la muestra (mm)}}$$

- Una vez obtenidos estos valores se obtuvo la media y la desviación estándar par cada una de las sustancias estudiadas así como para los controles.

- Se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio.

4.6.3. CONTEO CELULAR

Fundamento

El recuento de eritrocitos y leucocitos en la sangre periférica ha sido fundamental en la hematología. La unidad de volumen para los recuentos celulares es expresado en mm³ debido a las dimensiones lineales de la cámara hemacitométrica.⁷⁵

El principio general del método del hematocitómetro para el recuento de leucocitos comprende el empleo de una solución ácida (Líquido de Turck) que lisa a los hematies pero no altera a los leucocitos o células nucleadas (con o sin tinción nuclear). La solución ácida se utiliza para diluir la sangre en una pipeta especial para leucocitos; en el caso del recuento de eritrocitos se emplea el líquido llamado Hayen que es un anticoagulante isotónico.⁸

4.6.3.1. Procedimiento^{36,19}

a. Conteo de eritrocitos:

- 1) Se llenó la pipeta de Thoma para diluir eritrocitos hasta la marca de 0.5 con sangre conteniendo anticoagulante.
- 2) La pipeta inclinada aproximadamente 45° se giró mientras se llenaba con el líquido de Hayen hasta la marca de 101.
- 3) Tapando con el dedo el extremo inferior de la pipeta, se retiró con cuidado el tubo de aspersión.
- 4) Tomándola entre los dedos índice y pulgar se sometió la pipeta a agitación durante 3 min.
- 5) Se tiraron las primeras 5 gotas y se llenó la cámara hematocimétrica por capilaridad, sin que se derramara por los canales y a su vez quedara bien cubierta la superficie.

- 6) Se dejó reposar 3 min. y se observó al microscopio.
- 7) Se hizo la cuenta de eritrocitos en 5 cuadros de los 25 cuadros pequeños del centro (los 4 extremos y el del centro) de la cámara hematocimétrica.
- 8) Para conocer el valor eritrocitario, a la suma de eritrocitos contados se le agregaron 0000 ceros y el resultado se da en eritrocitos por mm^3 .
- 9) La cuenta se hizo por triplicado, se calculó la media y la desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio de cada una de las sustancias estudiadas.

b. Conteo de leucocitos:

- 1) Se llenó la pipeta de Thoma para diluir leucocitos hasta la marca de 0.5 con sangre conteniendo anticoagulante
- 2) La pipeta inclinada aproximadamente 45° se giró mientras se llenaba con el líquido de Turck hasta la marca de 11
- 3) Tapando con el dedo el extremo inferior de la pipeta, se retiró con cuidado el tubo de aspersión
- 4) Tomándola entre los dedos índice y pulgar se sometió la pipeta a agitación durante 3 min.
- 5) Se tiraron las primeras 5 gotas y se llenó la cámara hematocimétrica por capilaridad, sin que se derramara por los canales y a su vez quedara bien cubierta la superficie
- 6) Se dejó reposar 3 min. y se observó al microscopio
- 7) Se hizo la cuenta de leucocitos en las 4 cuadrículas grandes de los extremos de la cámara hematocimétrica
- 8) Para conocer el valor leucocitario, a la suma de leucocitos contados se multiplicó por 50 y el resultado se da en leucocitos por mm^3
- 9) La cuenta se hizo por triplicado, se calculó la media y la desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio de cada una de las sustancias estudiadas.

4.6.4. CUENTA DIFERENCIAL

Fundamento

El examen de la sangre desecada se refiere a un estudio citológico de glóbulos, extendidos sobre el porta objetos, fijados y teñidos.

La cuenta diferencial proporciona una gran información de los elementos que forman a la sangre.

4.6.4.1. Procedimiento ^{38,19}

- 1) En el extremo de un portaobjetos, limpio y desengrasado se depositó una pequeña gota de sangre recién extraída y con anticoagulante.
- 2) Con otro portaobjetos de bordes esmerilados se hizo un ángulo de 45°, se colocó sobre la gota de sangre y se dejó difundir por capilaridad a lo largo de la arista del porta objetos, con un movimiento suave se realizó la extensión de sangre lo más delgada posible.
- 3) Se dejó secar la extensión al aire libre para evitar la ruptura de las células.
- 4) En una cámara de tinción conteniendo el Colorante de Wright se colocó la extensión seca durante 3 min.
- 5) Sin escurrir ni secar la extensión se coloca en otra cámara de tinción conteniendo agua destilada durante 5 min.

6) Una vez transcurridos los 5 min. se saca de la cámara y se deja secar.

7) Se observa al microscopio y se hace el conteo diferencial por triplicado.

Se calculó la media y la desviación estándar y se hizo la gráfica correspondiente en forma de histograma con los valores promedio de cada una de las sustancias estudiadas.

4.7. CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS TOTALES (DOT-ELISA)

Fundamento

Los ensayos inmunoenzimáticos (AIE) han sido desarrollados principalmente para la detección de Ag o Ac presentes en los fluidos corporales como una alternativa del radioinmunoanálisis.⁶³

Actualmente existen dos tipos de AIE :

- a) Heterogéneo: aquí el Ag o Ac conjugado con la enzima es separado del complejo enzima-Ag-Ac , antes de medir su actividad enzimática.
- b) Homogéneo: la actividad enzimática del Ag marcado es medida de la presencia del complejo Ag-Ac.

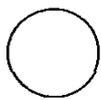
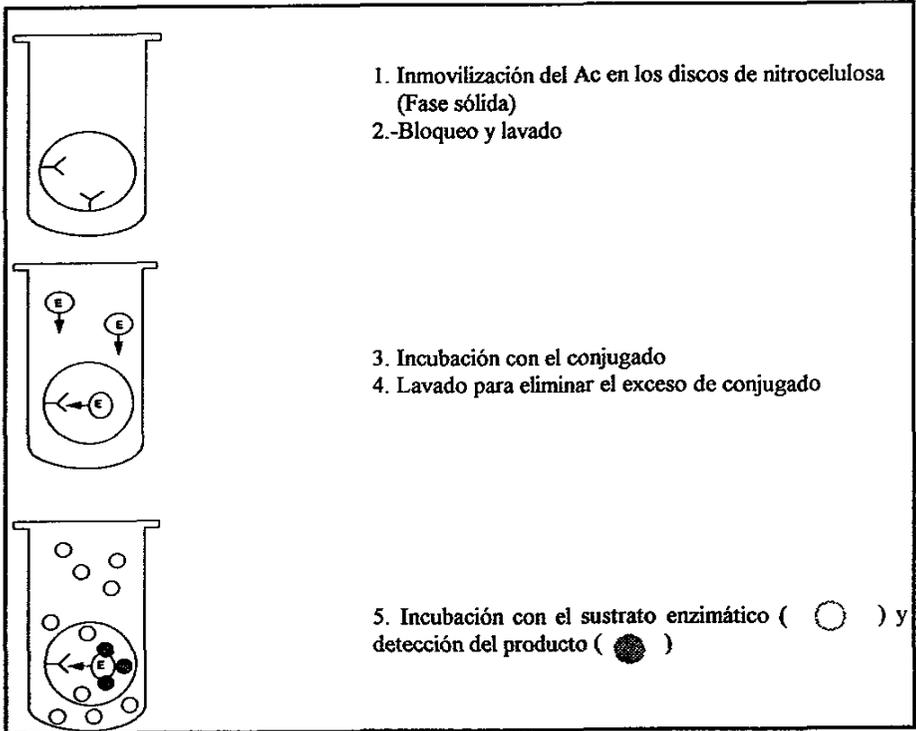
El análisis inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) corresponde a un AIE heterogéneo, o sea que el Ag o Ac es fijado primero a un soporte inerte, luego se hace reaccionar con el Ag o Ac correspondiente, que estará marcado con una enzima, posteriormente se lava para eliminar el conjugado que no reaccionó y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato. Generalmente se determina el grado de transformación del sustrato incoloro a un producto coloreado, el cual se puede observar a simple vista o medirse espectrofotométricamente.⁴⁹

Existe gran variedad en los soportes o fases sólidas para llevar a cabo la técnica ELISA como puede ser: partículas de celulosa, poliacrilamida, silicón, goma, poliestireno, polipropileno, polivinil y otros plásticos.⁴⁹ Una alternativa es el papel de nitrocelulosa, que tiene características de adsorción superiores a otros soportes como el vidrio y el poliestireno. Originalmente la nitrocelulosa se utilizó en técnicas de Inmunotransferencia (Immunoblotting), posteriormente se ha utilizado en ELISA para detectar y analizar a una gran variedad de proteínas, incluyendo Ig aplicadas en pequeñas cantidades. Recientemente es utilizado en una variedad de formas y tamaños para la detección de algunos patógenos humanos y sus Ag.²

La ELISA ha sido utilizada en epidemiología y en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, no obstante son usadas rutinariamente en la producción de Ac´s monoclonales, purificación de Ac, detección y cuantificación de hormonas, drogas, Ac específicos y totales, etc.^{47,72,76}

El Dot-ELISA es un ensayo inmunométrico utilizado en la serodiagnos de infecciones e identificación de Ac monoclonales; en la cual pueden ser usados volúmenes pequeños de Ag como puede ser de hasta 1.0 ml adsorbidos en discos de membrana de nitrocelulosa⁵⁶ no requiere de equipo sofisticado, ni gran entrenamiento técnico del personal que realiza la prueba, puede ser desarrollada en 4-5 hrs. y los reactivos son bastante estables. Se tiene reportada en promedio una sensibilidad del 98.8 % y una especificidad del 98.3%.^{6,76}

4.7.1. Procedimiento (Fig. 17)⁶



Fase sólida



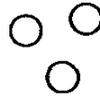
Anticuerpo



Enzimas



Antígeno

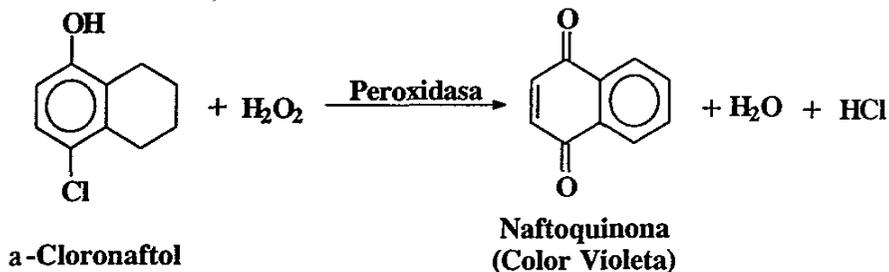


Sustrato



Sustrato Hidrolizado

Figura. 17. Pasos a seguir para la realización del inmunodot ELISA en discos de nitrocelulosa. El Grado de Reacción enzimática = Cantidad de Ac's presentes en las muestra



Obtención del Suero empleado para la cuantificación de Ac:

- 1) 1ml de sangre obtenida intracardiácamente se depositaron en un tubo eppendorf , se dejó a temperatura ambiente hasta la obtención del coágulo.
- 2) Por medio de un palillo de madera se separó el coágulo y se centrifugó a 3000 r.p.m.
- 3) durante 5 min.
- 4) Posteriormente por medio de una pipeta Pasteur se obtuvo el suero

1.- Inmovilización del Ac al papel de Nitrocelulosa (NC):

Se realizaron las siguientes diluciones con SSF de los sueros obtenidos: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280

Se colocaron 10 ml de cada una de las diluciones del suero , así como también del suero concentrado en los discos de papel de NC.

Se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 min. aproximadamente

2.- Bloqueo de los sitios libres del papel de NC con leche descremada al 5%:

Se preparó una solución de leche descremada al 5% en TBS a pH de 7.2 (Ver apéndice)

Los discos de papel de NC ya impregnados y secos se sumergieron en la solución bloqueadora de leche descremada al 5% durante 2 hrs. con agitación constante.

Pasadas las 2 hrs. se hicieron 3 lavados a los discos de papel de NC con una solución de TBS a pH 7.2

3.- Incubación con el conjugado:

Se preparó una solución 1:500 de Proteína A-peroxidada (ver apéndice) en SSF. Se tomaron y sumergieron los disco de papel de NC en la solución de Proteína A durante 1 hora.

Posteriormente se realizaron 5 lavados a los discos de papel de NC con una solución de TBS-Tween al 0.005% .

4.- Incubación con el sustrato:

Cada disco fue incubado con 1.0 ml de la solución reveladora de a-cloronaftol (Ver apéndice) durante 30 min. a temperatura ambiente.

Se descartó la solución reveladora y se realizó un lavado con TBS

Se dejaron secar a temperatura ambiente y se eligió el titulo de Ac totales en donde el color del revelado estuviera bien definido.

4.8. FAGOCITOSIS (Método de Carbón Coloidal)

Estudios previos (Halpern, Biozzi and Mené, 1950) han demostrado que cuando se administran dosis de tinta India comercial por debajo de 16 mg Carbón/100g por vía IV la eliminación de partículas de carbón por la sangre siguen una ley matemática simple, donde la concentración en la sangre es una función exponencial del tiempo. Casi todo el carbón inyectado después es encontrado en el hígado y bazo.

La velocidad de fagocitosis de las partículas de carbón siempre empieza con una velocidad máxima constante que es independiente de la concentración. Sin embargo, la velocidad de fagocitosis después disminuye logarítmicamente por el efecto de saturación de las células. Esta disminución depende del carbón inyectado y no del carbón fagocitado. El efecto de saturación del contenido de partículas de carbón absorbidas por las células es parcialmente compensado por el efecto de estimulación de las partículas en la sangre.

Comenzando la fagocitosis a una velocidad máxima dada, las células del sistema retículo endotelial (SRE) disminuyen su actividad más rápidamente cuando se han inyectado pequeñas dosis de carbón que cuando se administran dosis mayores. La forma exponencial de la curva de eliminación por la sangre es un reflejo de la saturación de las

células por las partículas absorbidas. Si las partículas fagocitadas no han saturado las células, la curva de eliminación de partículas por la sangre tiende a formar una línea recta.⁸

La velocidad de eliminación de carbón coloidal por la sangre (inyectado IV) con frecuencia es utilizada para medir la actividad fagocítica de las células reticuloendoteliales en experimentos con animales. Variaciones experimentales en la eliminación de partículas de carbón ocurre en diferentes circunstancias, por ejemplo: se ha reportado una velocidad de eliminación aumentada en verano y disminuida en invierno; elevación en la temperatura ambiente causa aumento en la velocidad de eliminación; infecciones de diferentes tipos tienen influencia en la velocidad de eliminación.²³

La velocidad de eliminación de coloides simples *in vivo* no está limitada por factores humorales y por lo tanto es una medida directa de la función fagocítica de los macrófagos en contacto con la sangre. El carbón coloidal es acumulado selectivamente en las células de Kupffer del hígado en un 90% aproximadamente y en los macrófagos de la pulpa roja del bazo en un 10%^{22,40}

4.8.1. Procedimiento:(fig.18)²³

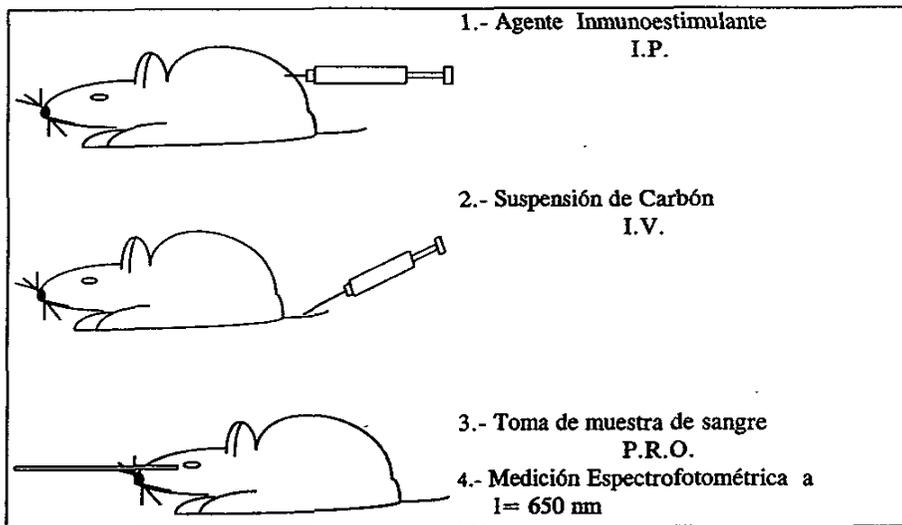


Figura no. 18. Actividad Fagocítica (método del Carbón Coloidal)

Se administraron 10mg/Kg. de peso de la sustancia estudiada por vía IP a 15 ratones Balb/c de 25-30 g. de peso por cada sustancia a probar.

2.- Suspensión de Carbón tabla no. 3:

Tabla No. 3 .Administración de la suspensión de carbón por vía IV.

No. de Ratones	Sustancia bajo estudio	Administración de la Suspensión de Carbón
5	H2O libre de pirógenos	Después de 24 hr
5	FESCDIPINA	Después de 6 hr
5	FESCDIPINA	Después de 12 hr
5	FESCDIPINA	Después de 24 hr
5	BCG	Después de 6 hr
5	BCG	Después de 12 hr
5	BCG	Después de 24 hr
5	Quitosan	Después de 6 hr
5	Quitosan	Después de 12 hr
5	Quitosan	Después de 24 hr
5	Nifedipina	Después de 6 hr
5	Nifedipina	Después de 12 hr
5	Nifedipina	Después de 24 hr

3.- Toma de muestra de Sangre:

Por medio de tubos capilares de vidrio heparinizados y calibrados a 25 µl se tomaron muestras de sangre de 25 µl en intervalos de tiempo de 3, 6, 9, 12, y 15 min. del PRO.⁴⁸ se colocaron en 2ml. de Na₂CO₃ al 0.1% (ver apéndice) y se homogeneizó con suavidad.

4.- Medición espectrofotométrica:

Se tomaron las muestras ya lisadas y se leyó en el espectrofotómetro la absorbancia de cada una a una $\lambda = 650\text{nm}$.

Se graficó el log. de la Absorbancia vs. el tiempo y se sacó la regresión lineal.

El rango de estimulación se obtuvo dividiendo el coeficiente de regresión de las muestras (K_{muestra}) entre el coeficiente de regresión del control (K_{control}).

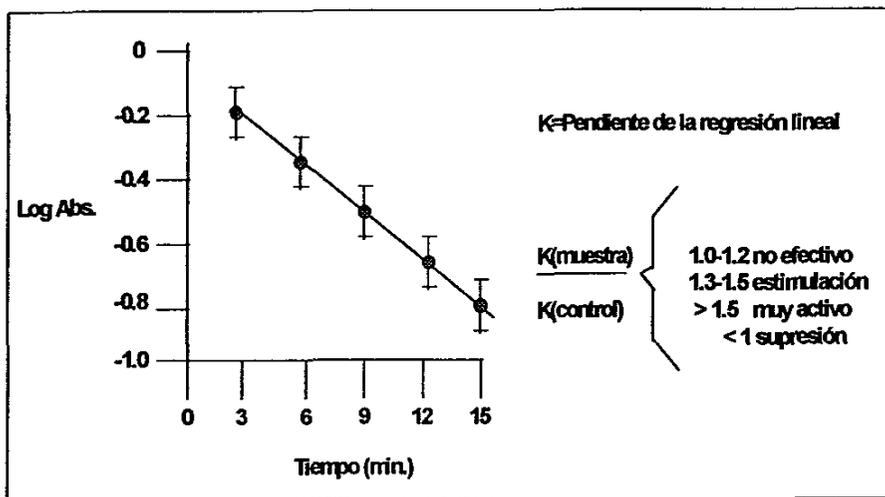


Figura 19. Rangos de estimulación

4.9. PESO DE ÓRGANOS LINFÓIDES

Como ya se sabe el hígado, bazo y timo son algunos de los órganos linfoides que forman parte del SI.⁵⁰

En el feto la maduración de linfocitos B corre a cargo del hígado mientras que en el adulto esta función la realiza la médula ósea. El hígado es el órgano hematopoyético y linfopoyético más importante durante la vida fetal de los mamíferos.⁴³

El timo del ratón contiene casi exclusivamente células de la serie T pero en otros animales pueden existir cantidades variables de células B y T.²⁴

La capacidad que presentan los linfocitos de recircular desde la sangre a los tejidos y viceversa a través del sistema linfático, junto con su larga vida media y su especificidad antigénica les confieren características idóneas como células efectoras centrales en la RI. La

mezcla total de la población linfocitaria tiene lugar especialmente en el bazo y ganglios linfáticos.⁴³

4.9.1. Procedimiento:

Después de que a los ratones se les tomó la muestra de sangre son sacrificados, posteriormente se les hace una incisión longitudinal de aproximadamente 5cm. y se localiza el hígado, bazo y timo.

Una vez localizados dichos órganos, estos son extraídos y depositados en un recipiente identificado para cada uno de los ratones y conteniendo fenol absoluto.

Se tomó el órgano a pesar con pinzas de disección y se colocó en una caja petri la cual fue llevada a la báscula en donde se obtuvo el peso de cada órgano por separado; después se regresan los órganos a un recipiente identificado para cada uno de los ratones pero ahora conteniendo fenol al 10%.

4.10. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados en las pruebas 4.6 y 4.9 fueron analizadas para determinar su significancia estadística utilizando una prueba t student para muestras pequeñas con un nivel de significancia = 0.025 y un % de confianza = 95, determinando con esto los intervalos de confianza para cada variable

5.0.RESULTADOS

5.1. Pruebas Hematológicas

Los resultados de las pruebas hematológicas realizadas a los ratones Balb/c utilizados como control se muestran en la tabla no. 4

Tabla No.4.Valores Hematológicos de ratones Balb/c control inoculados con H2O libre de pirógenos por VIP.

	Hb g/%	Hto %	B x10 ³ /mm ³	R x10 ⁶ /mm ³	L %	N %	E %
1	12.15	35.76	3.10	5.96	91	7	2
2	13.87	40.80	2.50	7.39	92	6	2
3	8.91	26.22	2.65	2.29	90	9	1
4	11.72	34.48	3.40	7.60	93	6	1
5	12.28	36.12	3.95	7.26	95	4	1
6	13.15	38.70	3.50	7.65	93	5	2
7	15.78	46.42	2.90	5.00	89	9	2
8	14.74	43.37	3.50	8.28	91	8	1
9	12.28	36.12	2.65	6.84	92	6	2
10	11.74	34.53	2.80	6.12	92	6	2
11	10.64	31.30	3.90	5.72	91	7	2
12	10.92	32.14	3.25	5.58	90	7	3
13	12.87	37.87	4.10	5.59	92	6	2
14	10.62	31.25	3.95	4.49	89	10	1
15	13.99	41.17	4.70	5.71	95	4	1

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento
Hto= Hematocrito en porcentaje
B = Leucocitos
R = Eritrocitos
L = Linfocitos
N = Neutrófilos
E = Eosinófilos

En las tablas 5,6,7,8,9 y 10 se presentan los datos hematológicos de los ratones Balb/c inoculados con BCG, Quitosan y Fescdipina respectivamente.

Tabla No. 5 Valores Hematológicos de ratones Balb/c inoculados con 0.1 ml de BCG por VIP

	Hb g/%	Hto %	B x10 ³ /mm ³	R x10 ⁶ /mm ³	L %	N %	E %
1	9.99	29.41	4.50	7.50	95	3	2
2	12.87	37.87	6.80	7.09	90	8	2
3	13.70	40.30	3.40	7.80	93	4	3
4	11.57	34.04	2.10	7.46	83	14	3
5	14.04	41.30	3.10	6.51	92	6	2
6	12.36	36.36	4.25	4.79	90	9	1
7	11.85	34.88	4.20	6.92	89	9	2
8	12.45	39.58	4.35	7.25	94	2	4
9	12.03	35.40	4.10	7.12	92	5	3
10	13.28	39.06	5.67	6.78	90	7	3

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento
Hto= Hematocrito en porcentaje
B = Leucocitos
R = Eritrocitos
L = Linfocitos
N = Neutrófilos
E = Eosinófilos

Tabla No. 6 Valores Hematológicos de ratones Balb/c inoculados con 100mg/Kg de Quitosan por VIP.

	Hb g/%	Hto %	B $\times 10^3/\text{mm}^3$	R $\times 10^6/\text{mm}^3$	L %	N %	E %
1	15.02	44.18	3.45	6.49	85	5	10
2	14.77	43.47	4.25	5.50	85	6	9
3	12.24	36.00	3.10	4.95	83	5	12
4	13.87	40.81	4.00	6.15	83	8	9
5	13.00	38.25	2.95	5.27	89	7	4
6	14.38	42.30	3.25	4.84	92	5	3
7	14.34	42.20	4.20	7.80	93	6	1
8	13.72	40.38	2.35	6.50	92	5	3
9	14.11	41.50	3.25	7.80	85	10	5
10	13.91	40.92	2.70	5.20	89	7	4

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento
Hto = Hematocrito en por ciento
B = Leucocitos
R = Eritrocitos
L = Linfocitos
N = Neutrófilos
E = Eosinófilos

Tabla No.7 Valores Hematológicos de ratones Balb/c inoculados con 100mg/Kg de Quitosan por VIP.

	Hb g/%	Hto %	B $\times 10^3/\text{mm}^3$	R $\times 10^6/\text{mm}^3$	L %	N %	E %
1	12.66	37.25	4.20	5.82	94	1	5
2	12.48	36.73	4.65	7.49	94	2	4
3	12.92	38.00	4.60	6.30	92	4	4
4	13.33	39.21	4.40	6.33	93	4	3
5	14.65	43.09	4.62	7.00	94	2	4
6	13.21	38.87	4.64	5.93	92	4	4
7	12.62	37.13	4.47	6.26	92	3	5
8	13.45	39.58	4.32	6.11	93	2	5
9	13.02	38.31	4.31	6.10	93	3	4
10	12.71	37.40	4.27	5.99	92	2	6

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento
Hto = Hematocrito en por ciento
B = Leucocitos
R = Eritrocitos
L = Linfocitos
N = Neutrófilos
E = Eosinófilos

Tabla No.8 Valores Hematológicos de ratones Balb/c inoculados con 100mg/Kg de Fescipina por VIP.

	Hb g/%	Hto %	B x10 ³ /mm ³	R x10 ⁶ /mm ³	L %	N %	E %
1	13.12	38.59	1.65	8.02	89	7	4
2	12.94	38.06	2.85	8.29	87	9	4
3	13.26	39.02	2.60	7.94	94	4	2
4	14.16	41.66	3.50	6.96	84	10	6
5	13.96	41.07	2.15	6.23	92	5	3
6	13.30	39.13	2.50	6.20	94	3	3
7	14.65	43.10	2.35	6.96	88	8	4
8	13.70	40.32	1.50	5.60	93	2	5
9	14.38	42.30	1.90	6.14	92	6	2
10	13.17	38.75	2.50	6.34	92	4	4

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento
Hto = Hematocrito en por ciento
B = Leucocitos
R = Eritrocitos
L = Linfocitos
N = Neutrófilos
E = Eosinófilos

Tabla No.9. Valores Hematológicos de ratones Balb/c inoculados con 100 mg/Kg de Fescipina por VIP.

	Hb g/%	Hto %	B x10 ³ /mm ³	R x10 ⁶ /mm ³	L %	N %	E %
1	14.83	43.63	1.25	6.01	93	5	2
2	13.60	40.00	1.75	5.00	92	4	4
3	14.56	42.85	1.15	7.01	87	8	5
4	13.33	39.21	3.50	4.81	95	2	3
5	15.09	44.39	3.20	6.49	90	6	4
6	11.33	33.33	1.60	6.88	92	5	3
7	11.11	32.69	1.60	6.91	90	5	5
8	13.60	40.00	2.60	6.52	89	6	5
9	12.36	36.36	1.25	5.88	91	6	3
10	13.60	40.00	1.25	6.60	91	5	4

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento
Hto = Hematocrito en por ciento
B = Leucocitos
R = Eritrocitos
L = Linfocitos
N = Neutrófilos
E = Eosinófilos

Tabla No. 10. Valores Hematológicos de ratones Balb/c inoculados con 100 mg de Nifedipina por VIP.

	Hb g/%	Hto %	B x10 ³ /mm ³	R x10 ⁶ /mm ³	L %	N %	E %
1	11.49	33.80	1.15	6.30	96	3	1
2	12.44	36.60	1.55	5.95	94	5	1
3	12.44	36.60	4.40	6.01	90	7	3
4	12.24	36.00	1.55	5.97	96	3	1
5	11.90	35.00	1.45	5.39	94	4	2
6	12.10	35.6	1.00	6.97	97	2	1
7	12.41	36.5	1.25	5.86	94	5	1
8	12.17	35.8	1.45	5.83	92	6	2
9	12.03	35.4	3.95	6.10	95	3	2
10	12.58	37.00	4.15	6.25	90	6	4

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento

Hto = Hematocrito en por ciento

B = Leucocitos

R = Eritrocitos

L = Linfocitos

N = Neutrófilos

E = Eosinófilos

Se obtuvieron los valores promedio de los datos hematológicos tanto de los valores control como de los valores de los productos estudiados así como también se realizó la prueba estadística t student con un porcentaje de confianza = 95%, estos datos se muestran en las figuras 20,21,22,23,24,25 y 26 los valores de estos histogramas se encuentran resumidos en la tabla no.11.

Tabla No. 11. Valores Hematológicos promedio de ratones Balb/c

	Hb g/%	Hto %	B x10 ³ /mm ³	R x10 ⁶ /mm ³	L %	N %	E %
CONTROL(-)	12.37	36.41	3.39	6.098	91.66	6.66	1.66
ALP	0.9837	2.8944	0.3541	0.8404	1.0197	0.9764	0.3425
BCG	12.51	36.81	4.24	6.92	90.80	6.70	2.50
	0.8682	2.5496	0.9313	0.5981	2.4012	2.5222	0.6073
QUITOSAN 100mg/Kg	13.93	41.00	3.35	6.05	87.60	6.40	6.00
	0.5866	1.7274	0.4538	0.7843	2.7617	1.1767	2.6312
QUITOSAN 100mg/Kg	13.10	38.45	4.44	6.33	92.90	2.70	4.40
	0.4512	1.3244	0.1218	0.3718	0.6257	0.7570	0.6026
FESCDIPINA 100mg/Kg	13.61	40.20	2.31	6.86	90.50	5.80	3.70
	0.4168	1.2500	0.4544	0.6646	2.3882	1.8997	0.8945
FESCDIPINA 100Mg/Kg	13.34	39.55	1.91	6.21	91.00	5.20	3.80
	0.9807	2.8852	0.6198	0.5576	1.5801	1.1071	0.7380
NIFEDIPINA	12.18	35.8	2.10	6.06	93.80	4.63	1.80
	0.2303	0.6771	0.9567	0.2905	1.7441	1.2490	0.7380

Hb = Hemoglobina en gramos por ciento

Hto = Hematocrito en por ciento

B = Leucocitos

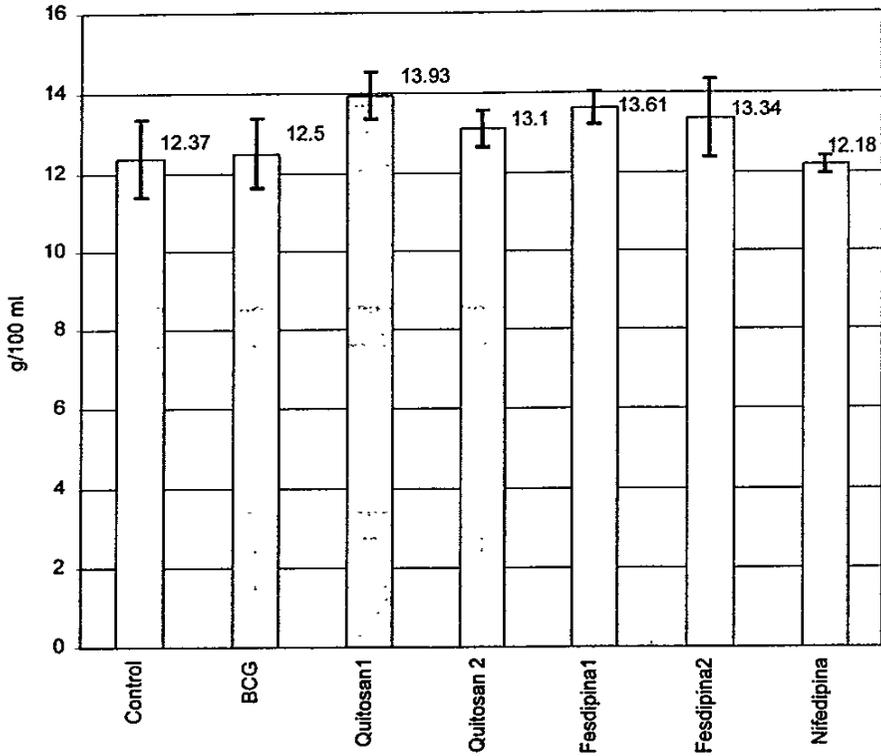
R = Eritrocitos

L = Linfocitos

N = Neutrófilos

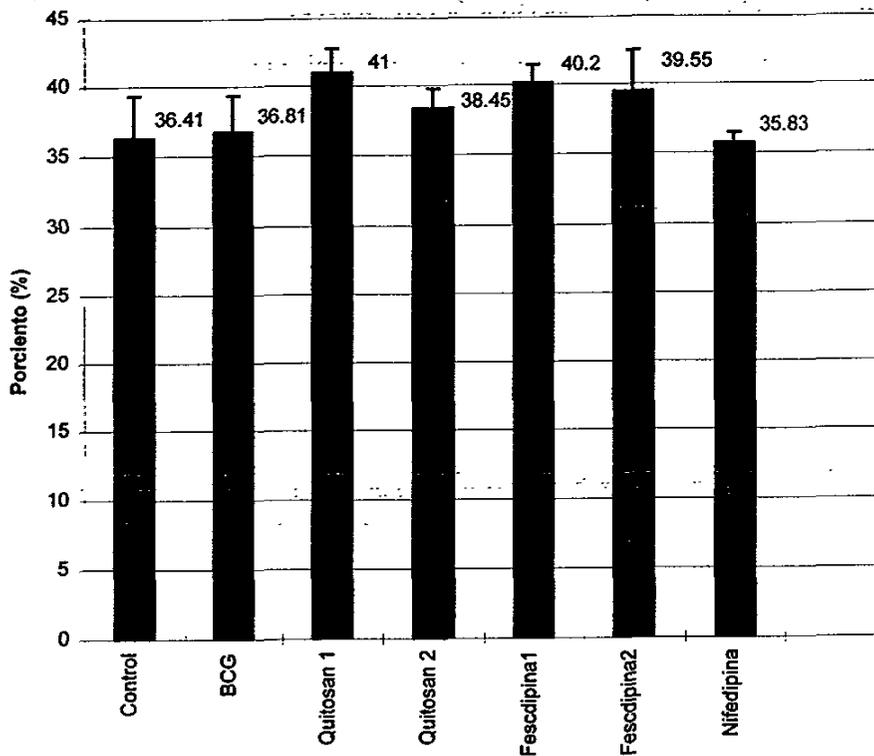
E = Eosinófilos

Figura 20. Valores promedio de hemoglobina obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



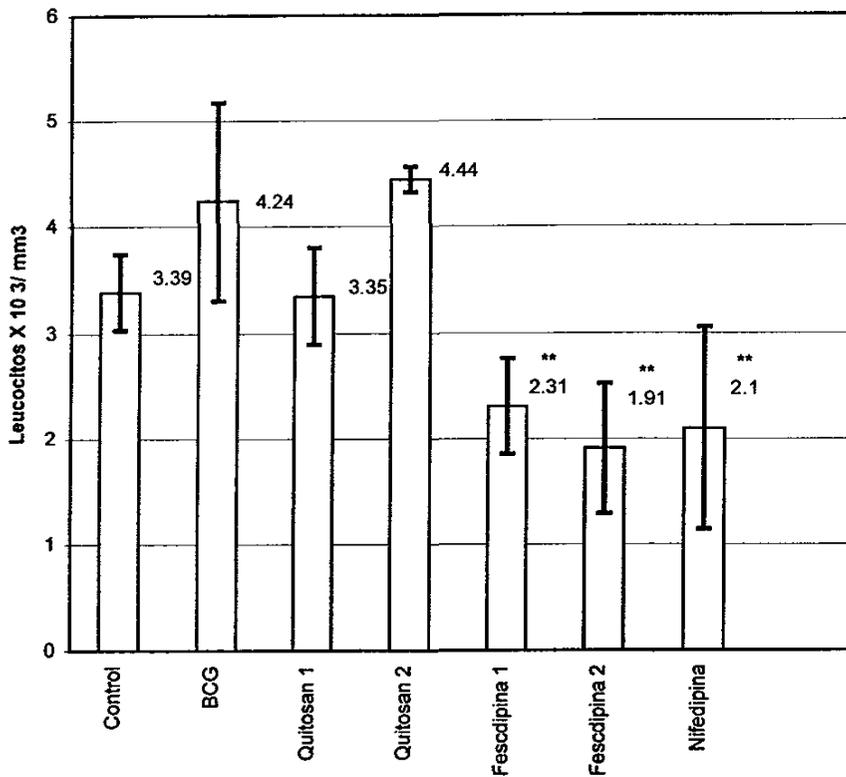
Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

Figura 21. Valores promedio de hematocrito obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

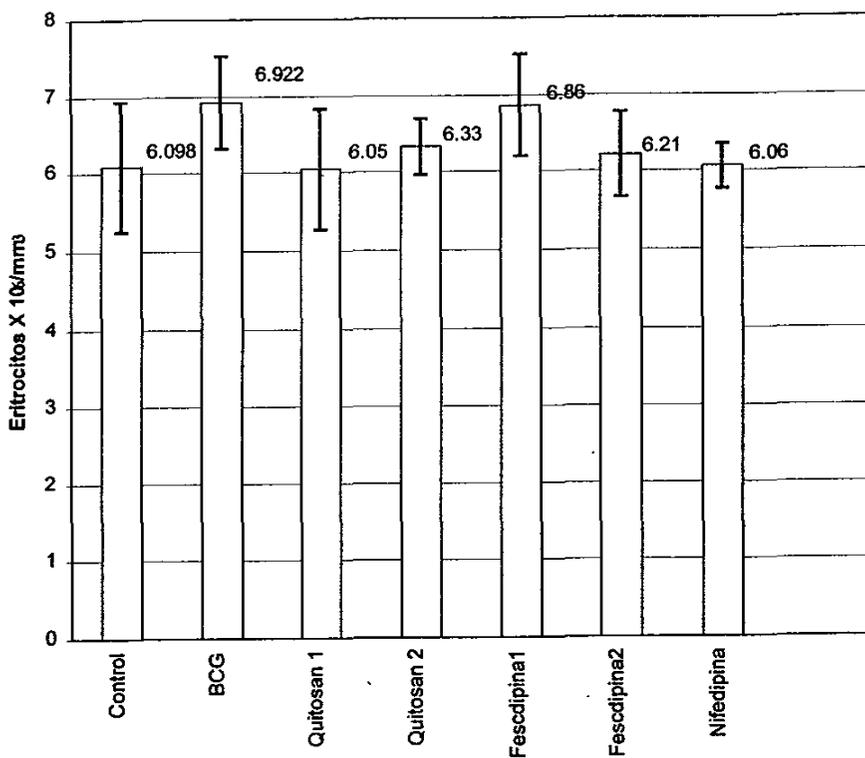
Figura 22. Valores promedio de leucocitos obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

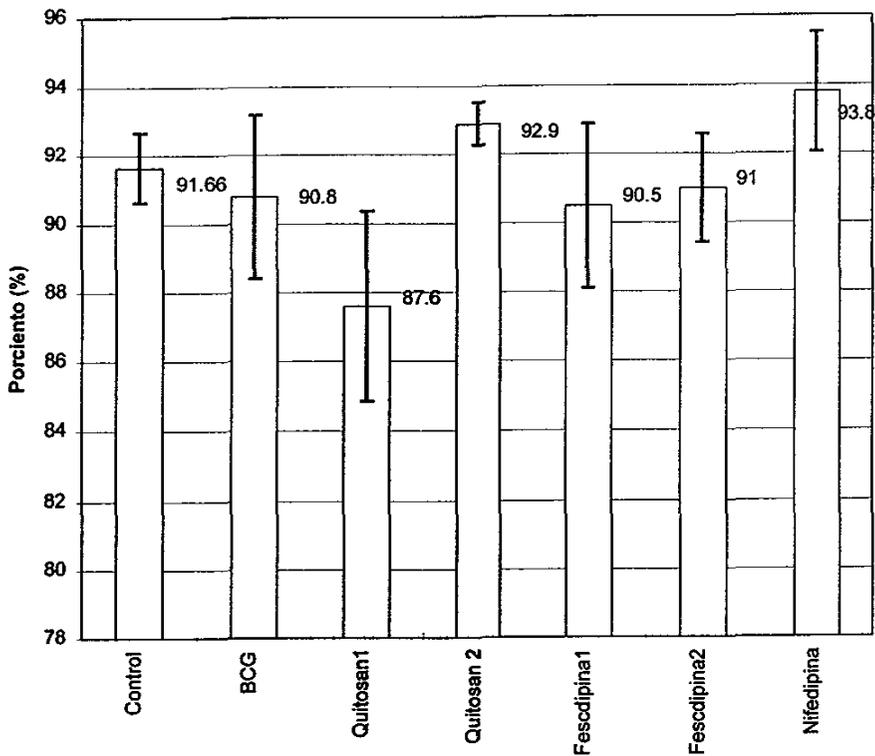
* Valor con diferencia estadísticamente significativo con respecto a los controles

Figura 23. Valores promedio de eritrocitos obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos estudiados por vía SC.



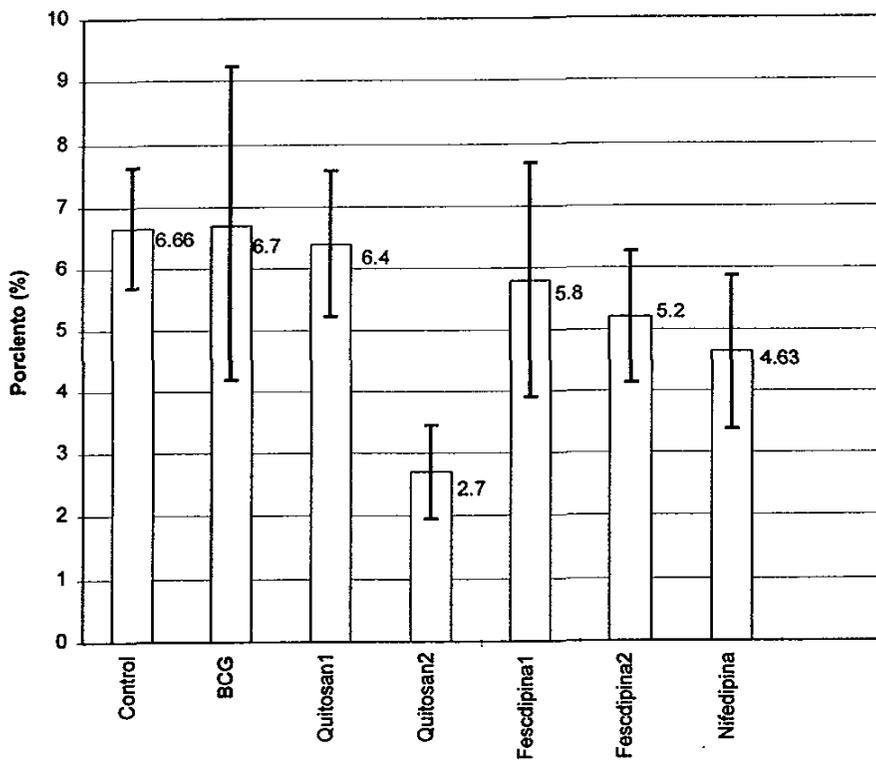
Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

Figura 24. Valores promedio de linfocitos obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



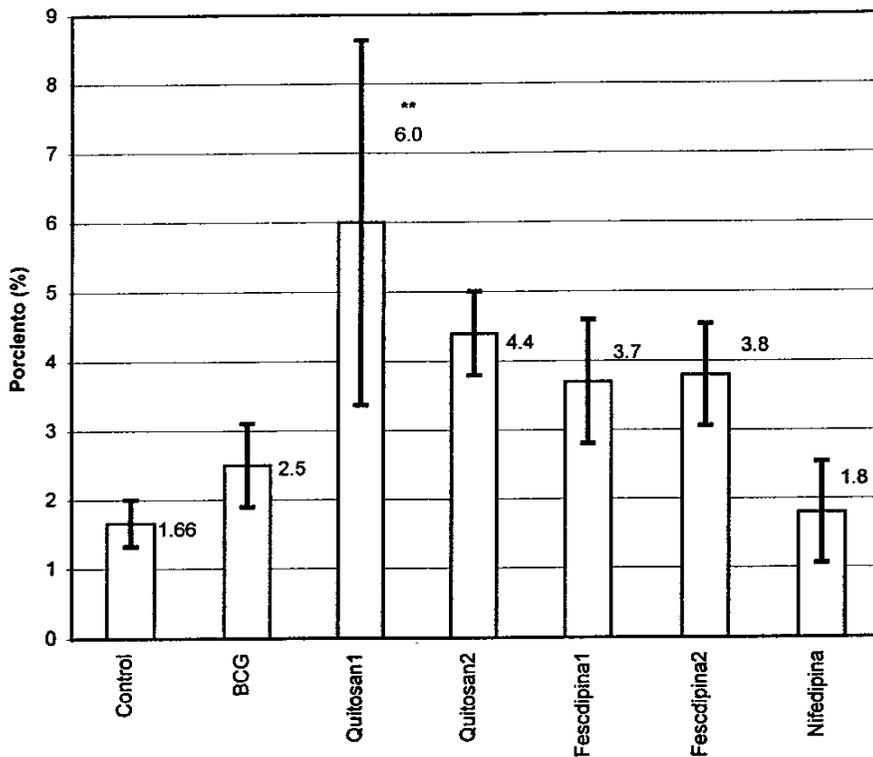
Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

Figura 25. Valores promedio de neutrófilos obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

Figura 26. Valores promedio de eosinófilos obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

* Valor con diferencia estadísticamente significativo con respecto a los controles

5.2. Actividad fagocítica

Para determinar la actividad fagocítica se realizaron curvas de Log Absorbancia contra Tiempo, las cuales se muestran en las figuras 27, 28 y 29, y los datos de dichas curvas son expuestas en las tablas de la 12 a la 24.

Tabla No.12 Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c control inoculados con ALP por vía IP a una $\lambda=650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0364	-1.4390 ± 0.1417
6	0.0348	-1.4600 ± 0.1475
9	0.0334	-1.4779 ± 0.1573
12	0.1313	-1.5048 ± 0.1567
15	0.0292	-1.5349 ± 0.1703

La gráfica correspondiente se muestra en la fig 27, 28 y 29 cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.9891$ y $m = -7.8866 \times 10^{-3}$

Tabla No. 13 Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con FESCDIPINA 6 hrs. antes por VIP a una $\lambda= 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm.	Logaritmo Absorbancia
3	0.0360	-1.4436 ± 0.2008
6	0.0337	-1.4721 ± 0.1246
9	0.0401	-1.3961 ± 0.1197
12	0.0695	-1.1579 ± 0.2085
15	0.0457	-1.3400 ± 0.1865

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 27, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.4378$ y $m = 0. 0173$

Tabla No. 14 Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con FESCDIPINA 12 hrs. antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm.	Logaritmo Absorbancia
3	0.0370	-1.4311 ± 0.0962
6	0.0338	-1.4710 ± 0.934
9	0.0337	-1.4711 ± 0.0168
12	0.0346	-1.4597 ± 0.0648
15	0.0363	-1.4389 ± 0.0730

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 28, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.0367$ y $m = -1.4333 \times 10^{-4}$

Tabla No. 15 Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con FESCDIPINA 24 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0328	-1.4832 ± 0.1416
6	0.0307	-1.5124 ± 0.1012
9	0.0332	-1.4787 ± 0.1201
12	0.0299	-1.5232 ± 0.0996
15	0.0299	-1.5243 ± 0.1319

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 29, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.4496$ y $m = 3.1 \times 10^{-3}$

Tabla No.16.Valores promedio de la Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con BCG 6 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0370	-1.4314 ± 0.1259
6	0.0334	-1.4760 ± 0.1261
9	0.0305	-1.5155 ± 0.1279
12	0.0261	-1.5822 ± 0.1464
15	0.0238	-1.6216 ± 0.1882

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 27, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.9925$ y $m = -0.01622$

Tabla No.17 Valores promedio de Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con BCG 12 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650 \text{ nm}$.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0435	-1.3609 \pm 0.1003
6	0.0403	-1.3940 \pm 0.1093
9	0.0370	-1.4317 \pm 0.1216
12	0.0337	-1.4711 \pm 0.1465
15	0.0311	-1.5059 \pm 0.1618

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 28, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.9992$ y $m = 0.01223$

Tabla No. 18 Valores promedio de Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con BCG 24 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650 \text{ nm}$.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0342	-1.4658 \pm 0.0747
6	0.0326	-1.4866 \pm 0.0765
9	0.0305	-1.5144 \pm 0.0811
12	0.0297	-1.5258 \pm 0.0800
15	0.0273	-1.5630 \pm 0.0915

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 29, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.9983$ y $m = -8.2066 \times 10^{-3}$

Tabla No.19 Valores promedio de Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con QUITOSAN 6 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650 \text{ nm}$.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0274	-1.5620 \pm 0.0583
6	0.0238	-1.6231 \pm 0.0614
9	0.0217	-1.6627 \pm 0.0749
12	0.0192	-1.7158 \pm 0.1188
15	0.0167	-1.7758 \pm 0.1152

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 27, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.9957$ y $m = -0.01734$

Tabla No. 20 Valores promedio de Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con QUITOSAN 12 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0537	-1.2700 \pm 0.0795
6	0.0463	-1.3344 \pm 0.0783
9	0.0411	-1.3861 \pm 0.0581
12	0.0384	-1.4152 \pm 0.0666
15	0.0344	-1.4624 \pm 0.0664

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 28, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.9835$ y $m = -0.01552$

Tabla No.21 Valores promedio de Absorbancia de muestraras de sangre de ratones Balb/c inoculados con QUITOSAN 24 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0336	-1.4727 \pm 0.1232
6	0.0312	-1.5051 \pm 0.1282
9	0.0278	-1.5557 \pm 0.1280
12	0.0263	-1.5792 \pm 0.1364
15	0.0260	-1.5842 \pm 0.1377

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 29, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.9882$ y $m = -0.0117$

Tabla No.22 Valores promedio de Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con NIFEDIPINA 6 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0305	-1.5155 \pm 0.2022
6	0.0252	-1.5981 \pm 0.1366
9	0.0262	-1.5805 \pm 0.0439
12	0.0289	-1.5379 \pm 0.0603
15	0.0251	-1.5993 \pm 0.0300

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 27, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.4502$ y $m = -0.0035$

Tabla No. 23 Valores promedio de Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con NIFEDIPINA 12 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0234	-1.6297 \pm 0.1169
6	0.0264	-1.5776 \pm 0.0979
9	0.0232	-1.6337 \pm 0.1742
12	0.0262	-1.5801 \pm 0.1855
15	0.0284	-1.5455 \pm 0.1649

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 28, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.6971$ y $m = 5.53 \times 10^{-3}$

Tabla No. 24 Valores promedio de Absorbancia de muestras de sangre de ratones Balb/c inoculados con NIFEDIPINA 24 hrs antes por VIP a una $\lambda = 650$ nm.

Tiempo (min.)	Absorbancia nm	Logaritmo Absorbancia
3	0.0364	-1.4381 \pm 0.1596
6	0.0316	-1.5001 \pm 0.1447
9	0.0331	-1.4793 \pm 0.0805
12	0.0368	-1.4332 \pm 0.1511
15	0.0447	-1.3495 \pm 0.1422

La gráfica correspondiente se muestra en la fig. 29, cuyos valores de regresión (obtenidos utilizando calculadora personal) son: $r^2 = 0.6669$ y $m = 8.13 \times 10^{-3}$

Mediante los valores de la pendiente de las curvas ya mencionados se obtuvo el Índice de Actividad fagocítica que se muestra en la tabla no.25., y en la cual se observa que el control, la Fescdipina y el BCG después de 24 hrs no tienen actividad estimulante, aún cuando el BCGes un buen estimulante del SI, una de las razones de que el BCG haya tenido este comportamiento puede ser que su acción es rápida, ya que se observó que la temperatura corporal de los ratones aumentado en pocos minutos.

Fig. No. 27. VALORES PROMEDIO DE LOGARITMO DE ABSORBANCIA 6 HORAS

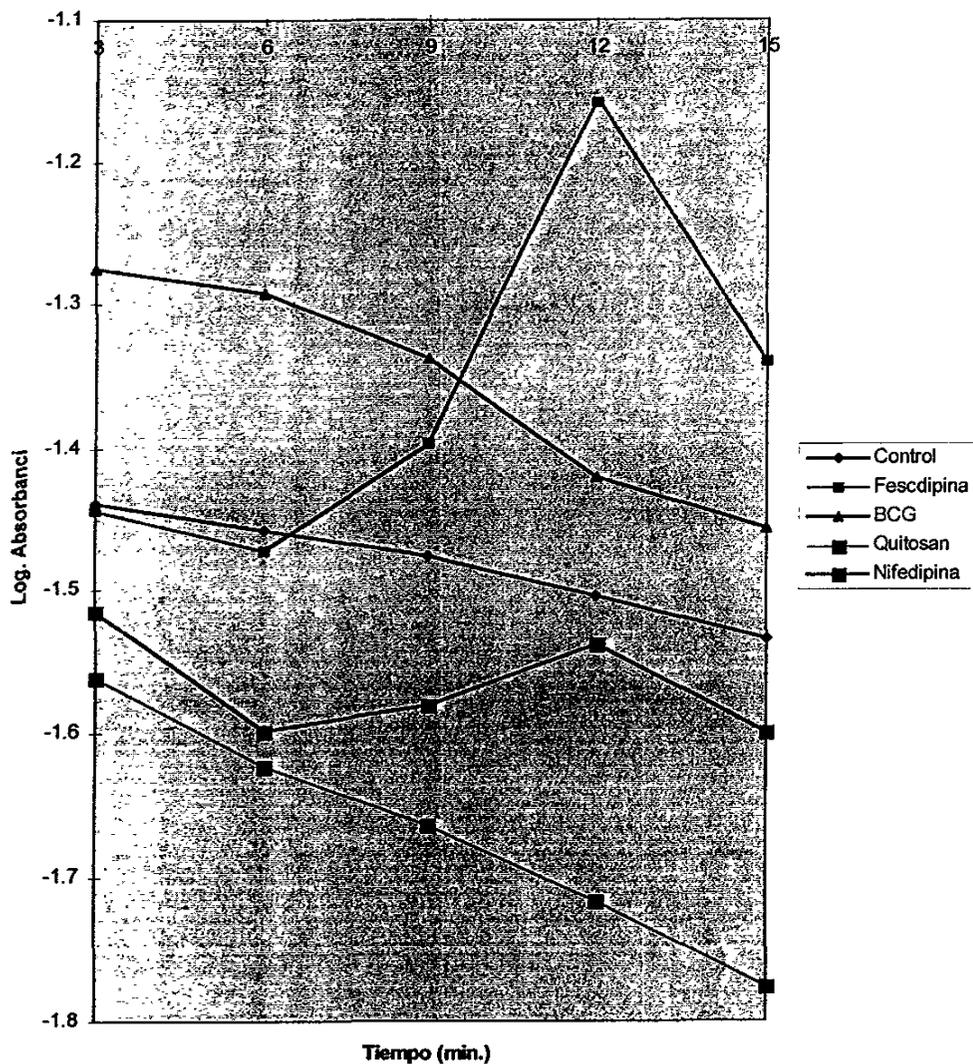


Fig. No. 28. VALORES PROMEDIO DE LOGARITMO DE ABSORBANCIA 12 HORAS

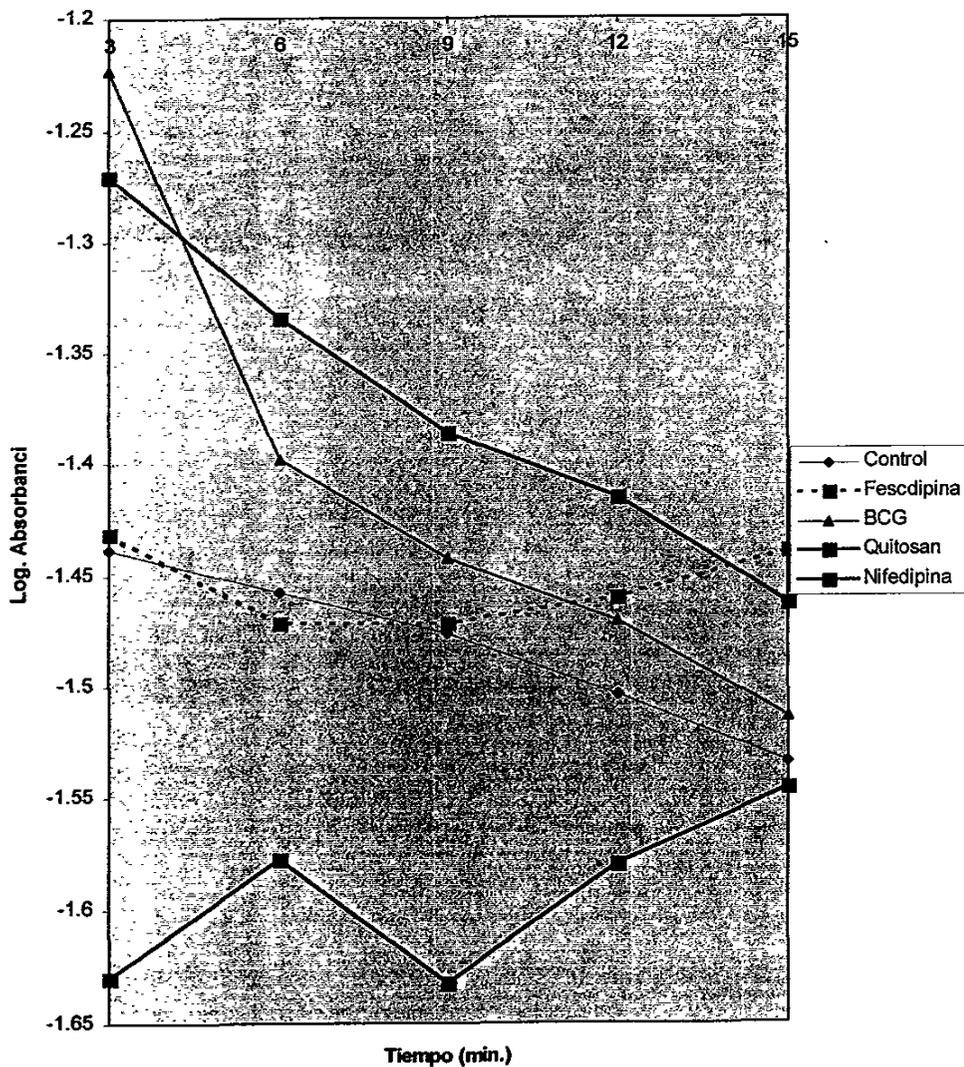


Fig. No. 29. VALORES PROMEDIO DE LOGARITMO DE ABSORBANCIA 24 Horas

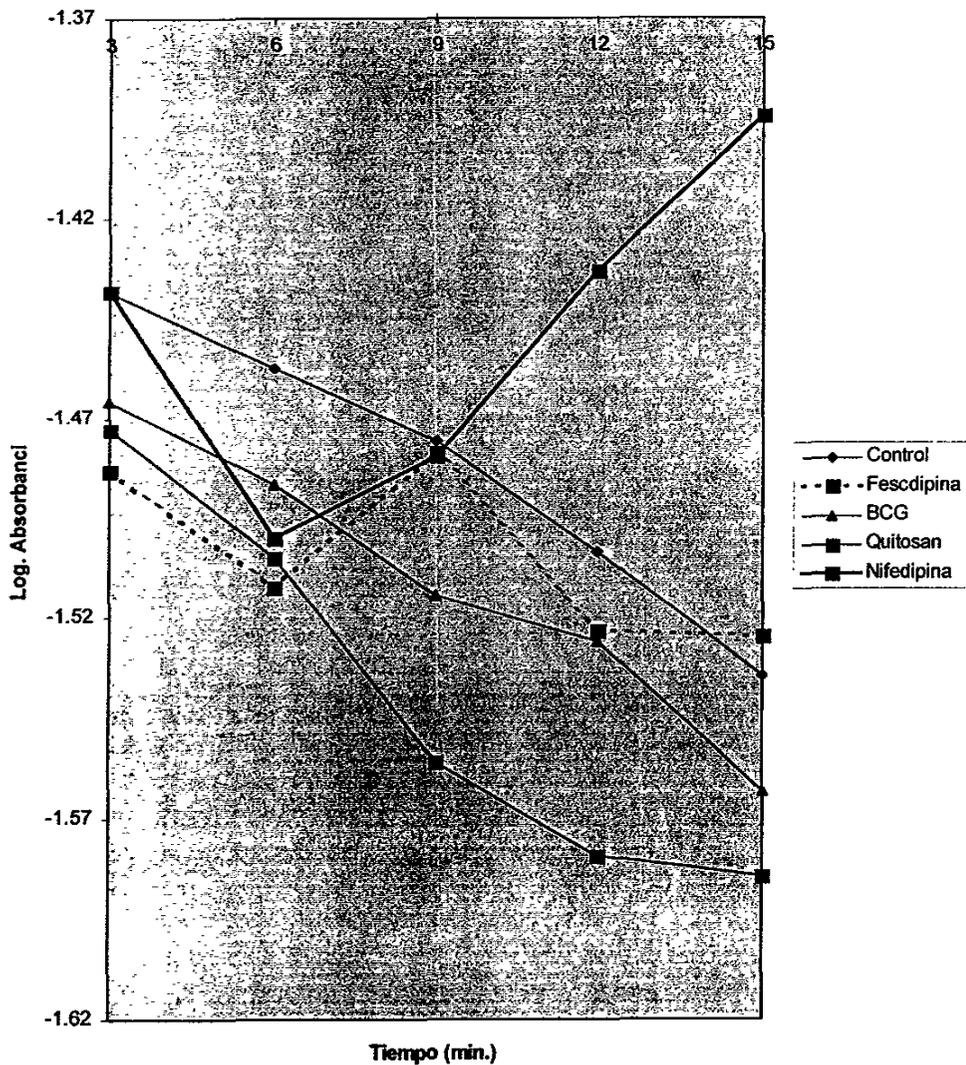


Tabla No. 25 Valores de * K * (Actividad Fagocítica) en la Prueba de Eliminación de Carbón Coloidal

PRODUCTO	TIEMPO (Hrs)	*K*
ALP	24	1
FESCDIPINA	6	-2.1935
FESCDIPINA	12	0.0181
FESCDIPINA	24	0.3990
BCG	6	2.0566
BCG	12	1.5515
BCG	24	1.0405
QUITOSAN	6	2.1990
QUITOSAN	12	1.9678
QUITOSAN	24	1.4957
NIFEDIPINA	6	0.4539
NIFEDIPINA	12	-0.7011
NIFEDIPINA	24	-1.0317

Las gráficas correspondientes son mostradas en las figuras 30, 31 y 32

Figura 30. Valores de "K". Actividad fagocítica a las 6 Hrs.

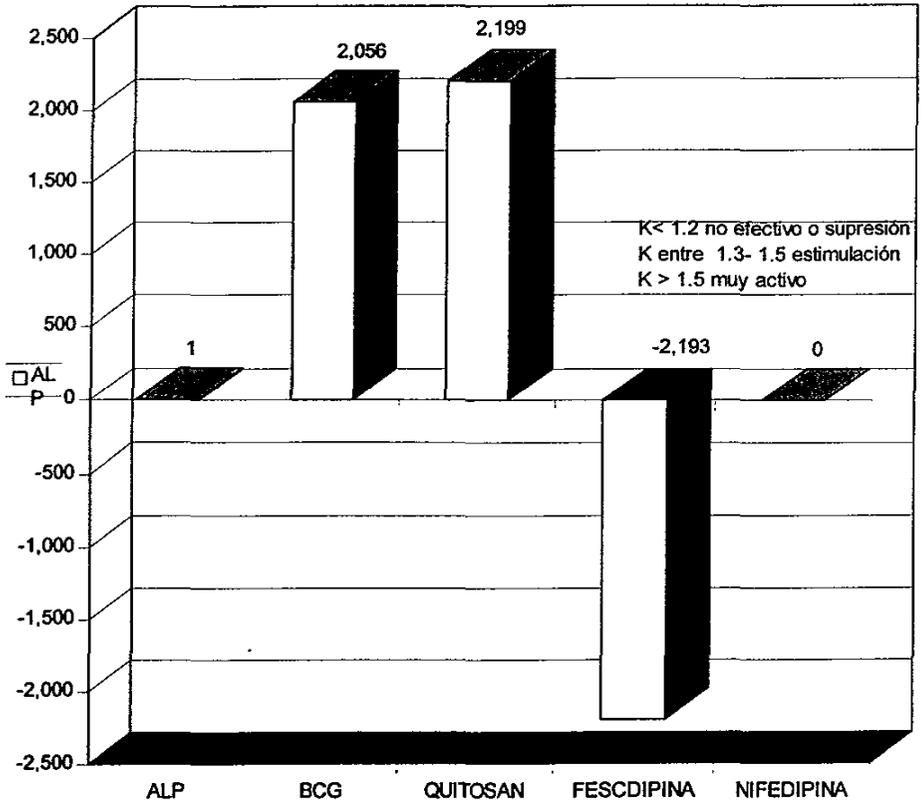
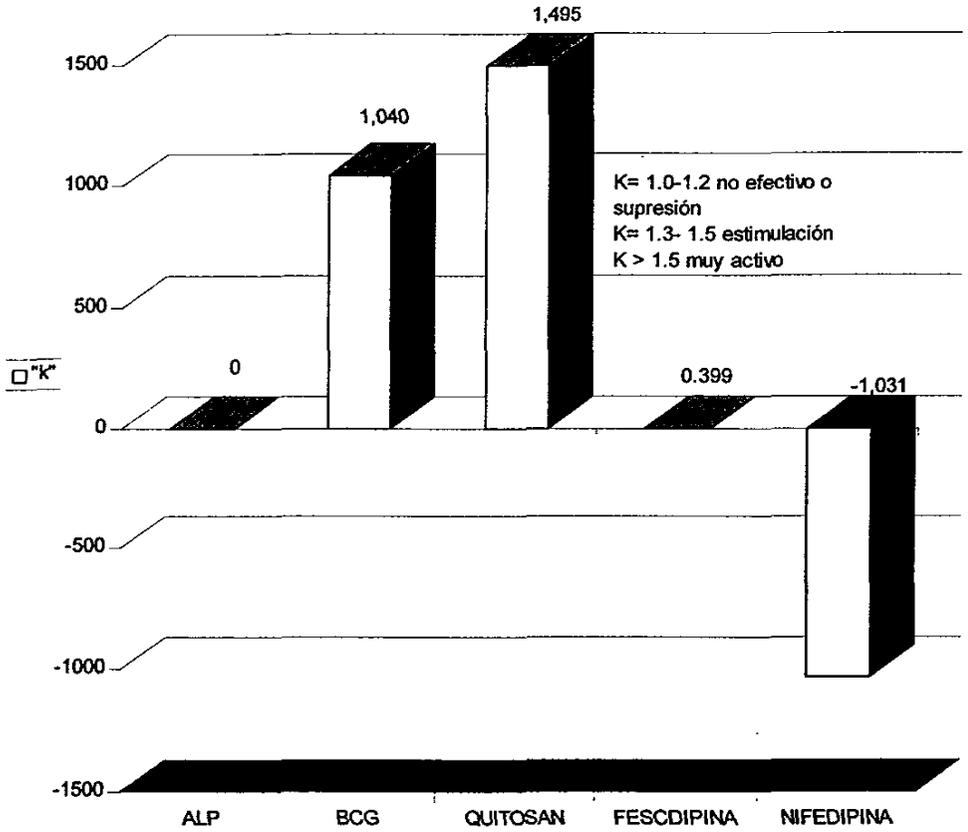


Figura 32. Valores de "K". Actividad fagocítica a las 24 hrs.



5.3. Cuantificación de anticuerpos totales

Se trabajaron varias diluciones del suero de ratón (1:20.a 1:1280) y los titulos de Ac's totales se encuentran resumidos en la tabla no.26. Observandose que el titulo más alto lo alcanzó el Quitosan a una dosis de 100 mg/Kg de peso y el BCG

Tabla No. 26 Titulo de Anticuerpos por el metodo de DOT-ELISA

Dilución Producto	Concentrado	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
		ALP	+	+	-	-	-	-
BCG	+	+	+	+	+	+	+	-
Quitosan 100 µg/Kg	+	+	+	+	+	+	-	-
Quitosan 100 mg/KG	+	+	+	+	+	+	+	-
Fescdipina 100 µg/Kg	+	+	+	-	-	-	-	-
Fescdipina 100 mg/Kg	+	+	+	-	-	-	-	-
Nifedipina 100 mg/kg	+	+	+	-	-	-	-	-

+ Presencia de Anticuerpos
- Ausencia de Anticuerpos de

5.4. *Peso de Organos Linfoides*

Los valores del peso de los diferentes órganos (hígado, bazo y timo) de los controles se exponen en la tablas 27.

Tabla No.27.Valores de peso de los órganos de ratones Balb/c control inoculado con ALP por vía IP

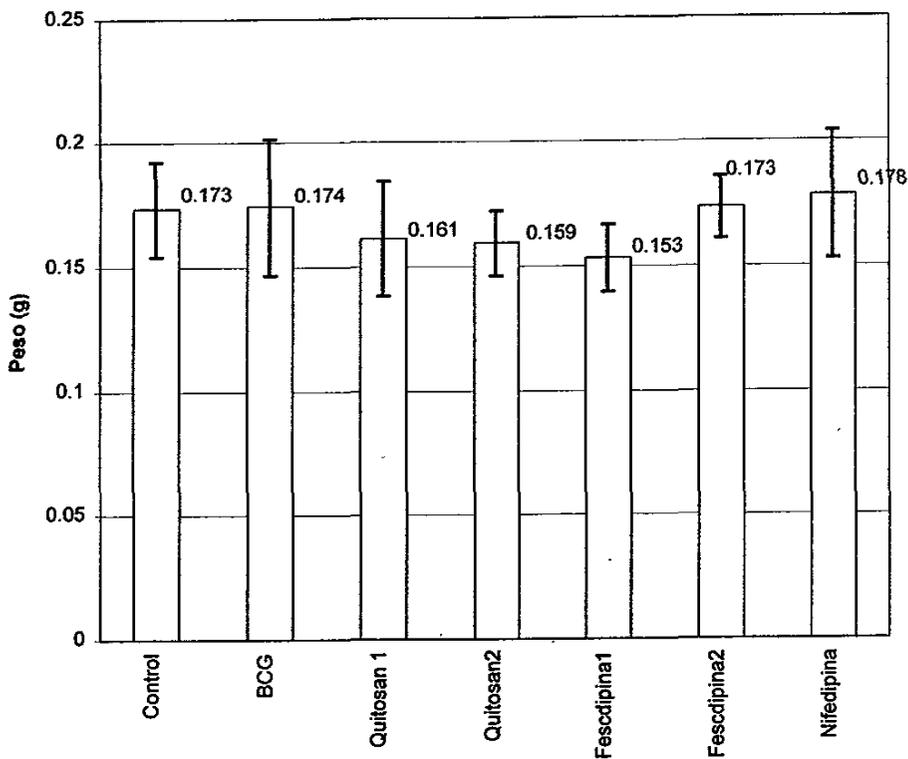
	Bazo g.	Hígado g.	Timo g.
1	0.13	1.84	0.15
2	0.11	1.52	0.10
3	0.14	1.66	0.14
4	0.14	1.71	0.13
5	0.20	1.54	0.13
6	0.16	1.54	0.16
7	0.18	1.79	0.15
8	0.16	1.89	0.20
9	0.16	1.80	0.16
10	0.22	1.72	0.17
11	0.20	1.68	0.15
12	0.17	1.95	0.14
13	0.21	1.82	0.16
14	0.20	1.68	0.13
15	0.22	2.04	0.13
x	0.1730	1.745	0.148
σ	0.0343	0.1516	0.0224

Los datos promedio de los valores de peso de los órganos de cada una de las sustancias estudiadas se muestran en la fig. 33, 34 y 35 así como los valores del intervalo de confianza calculados por el método t student con un porcentaje de confianza = 95% y los valores correspondientes se resumen en la tabla no.28.

Tabla No.28 Valores promedio de peso de los órganos de ratones Balb/c

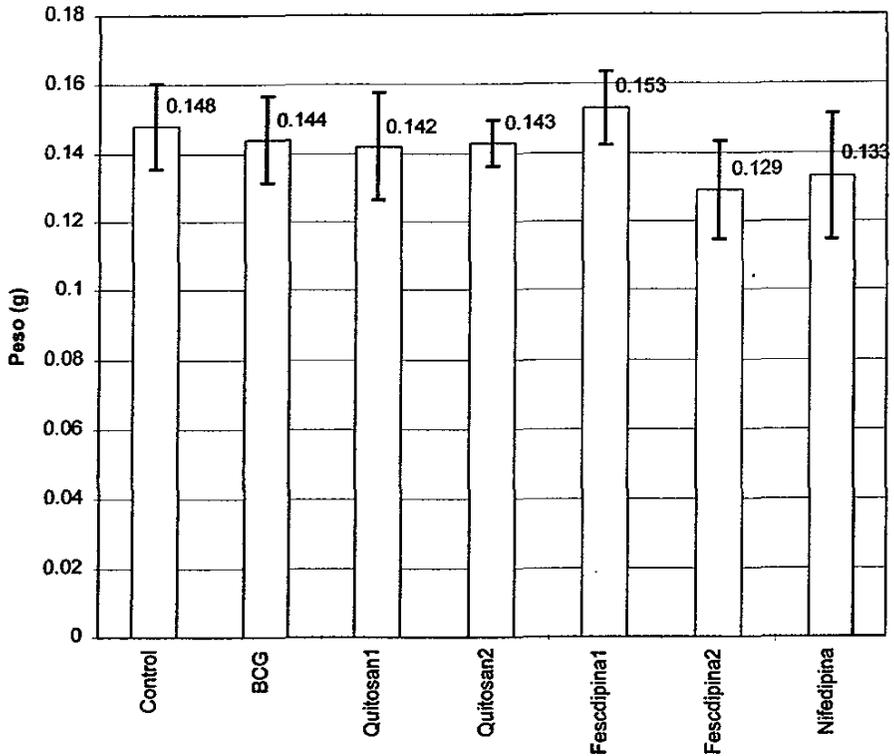
	Bazo g.	Hígado g.	Timo g.
CONTROL	0.173 ± 0.0343	1.745 ± 0.1516	0.148 ± 0.0224
BCG	0.174 ± 0.0386	1.603 ± 0.1306	0.144 ± 0.0179
QUITOSAN 100µg/Kg	0.161 ± 0.0321	1.761 ± 0.3372	0.142 ± 0.0220
QUITOSAN 100mg/Kg	0.159 ± 0.0179	1.660 ± 0.0485	0.143 ± 0.0094
FESCDIPINA 100µg/Kg	0.153 ± 0.0188	1.813 ± 0.0644	0.153 ± 0.0149
FESCDIPINA 100mg/Kg	0.154 ± 0.0254	1.7390 ± 0.1353	0.129 ± 0.0202
NIFEDIPINA 100mg/Kg	0.178 ± 0.0358	1.763 ± 0.0285	0.133 ± 0.0258

Figura 33. Valores promedio de peso de bazo obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



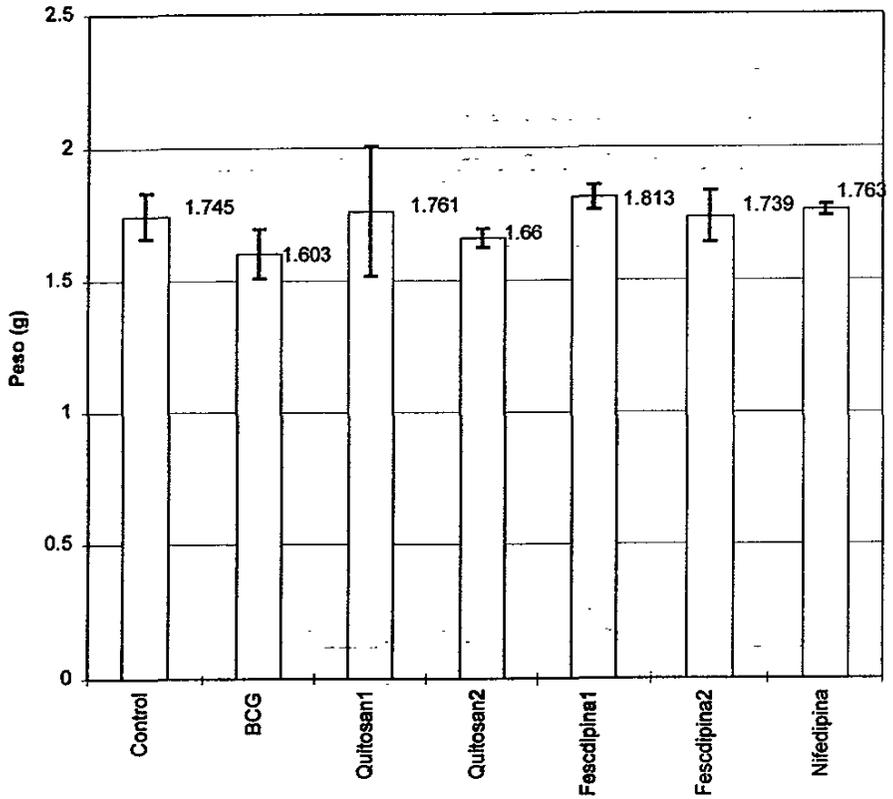
Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

Figura 34. Valores promedio de peso de timo obtenidos de ratones Balb/c inoculados con los productos en estudio por vía SC.



Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

Figura 35. Valores promedio de peso de hígado de ratones Balb/c inoculados con los productos estudiados por vía SC.



Las barras de error indican el intervalo de confianza obtenido mediante la prueba estadística t student con un nivel de significancia=0.025 y un % de confianza=95

6.0.DISCUSION

La Inmunofarmacología es un disciplina joven que está creciendo cada vez más y que se relaciona estrechamente con el área de la inmunología y la farmacología. Para algunos, la inmunofarmacología se define como el estudio del efecto de agentes farmacéuticos sobre el sistema inmune (SI) y sus funciones, y muchos de estos agentes pueden ser de origen endógeno, sintético o microbial. Otros consideran a la inmunofarmacología como la realización de un efecto farmacológico con productos inmunológicos, por ej. con anticuerpos, linfocinas y otros que en su mayoría consisten en proteínas. Para los clínicos, por otra parte la inmunofarmacología es la base para el tratamiento de enfermedades del SI, particularmente las enfermedades autoinmunes, reacciones anafilácticas y atópicas.²⁴

Dentro de la inmunología se encuentra otra disciplina muy importante que debe tomarse en cuenta cuando se esta estudiando o se está trabajando con productos farmacéuticos y es la inmunotoxicología, que puede ser definida como el estudio de los efectos tóxicos en el SI, los toxicólogos han enfocado solamente su atención al riesgo potencial en el uso de productos farmacéuticos y químicos ambientales en la RI. La pendencia del SIDA ha elevado esta preocupación, sin embargo desde hace décadas se han hecho investigaciones inmunotoxicológicas por ej. en 1896 Abbott¹ demostró que la intoxicación con alcohol disminuye la resistencia natural de conejos a infecciones con Streptococcus, y Swift reportó en 1922⁷⁰ la acción depresiva del salicato de sodio en la inmunidad humoral; se ha encontrado también que los pesticidas, solventes, hidrocarburos halogenados y aromáticos, y metales, así como también la radiación ultravioleta pueden producir toxicidad inmunológica.²¹ La preocupación de los efectos en el SI aún persisten y crecen rápidamente y por esto ahora la inmunotoxicología es completamente reconocida por la comunidad científica como una subdisciplina relevante de la toxicología. El uso de inmunomoduladores o químicos inmunotóxicos debe hacerse con mucho cuidado ya que algunas consecuencias al utilizarse involucran la:

- * disminución de la resistencia a infecciones
- * aumento en la incidencia de cáncer
- * desórdenes autoinmunes
- * reacciones de hipersensibilidad
- * estados de inmunodeficiencia e inmunosupresión severa.

Es muy importante tener en cuenta el significado de lo que es inmunofarmacología e inmunotoxicología cuando se está evaluando el efecto que pueden tener diferentes productos en el SI, solo así se podrá clasificar su efecto como tóxico o terapéutico.²⁰

La realización de un análisis completo en la sangre y un conteo de linfocitos, granulocitos, eosinófilos y plaquetas son componentes básicos de la inmunofarmacología e inmunotoxicología. Estas pruebas son útiles para conocer el estado general de salud de una población.

La cuenta absoluta de linfocitos es crítica: cuentas bajas (linfocitopenia) y cuentas altas de estas células (linfocitosis) son señal de defectos en el sistema de células T y B o efectos sobre la médula ósea. La linfocitopenia puede presentarse como resultado de una infección viral, mal nutrición, estrés y autoinmunidad.²⁰

Un examen de frotis de sangre periférica nos ayuda a reconocer morfología anormal de células blancas y rojas, y esta información es útil para interpretar la cuenta de células vivas, tal como la linfocitosis atípica o muchas infecciones virales agudas.²⁰

La cuenta absoluta de eosinófilos puede ser muy útil para encontrar desórdenes alérgicos, enfermedades colágeno-vasculares y manifestaciones parasitarias,²¹ esto se debe a los factores quimiotácticos resultantes de las reacciones inmunológicas. Los eosinófilos pueden fijarse a la superficie de algunos parásitos y matarlos; también pueden fijarse a larvas en presencia de anticuerpos y degranularse, liberando algunas proteínas básicas que son letales para el parásito.⁷

Los antagonistas del Calcio tienden a disminuir las funciones y la proliferación de las células PMN tal es el ejemplo de: Nifedipina, Diltiazem, Verapamil, Prenilamina y muchos otros, también algunos fármacos de acción sobre el sistema nervioso alteran la proliferación y funciones de los PMN como la Prilocaina Tetracaina, Oxido nitroso, Tiopental.²¹

Analizando los resultados obtenidos en el presente trabajo en las pruebas hematológicas se observa que existe un aumento significativo en el número de eosinófilos (ver fig.55) después de la administración del Quitosan; el BCG y la Fescdipina presentan este aumento pero en menor proporción, a este respecto y adelantándonos un poco a los resultados del índice de fagocitosis, en ellos se observa que el Quitosan tiene el mayor índice de actividad fagocítica y se ha observado que los eosinófilos son capaces de moverse y fagocitar, aunque menos activamente⁶⁹ y ésta puede ser la causa del aumento en los eosinófilos aunque también podemos suponer que este aumento se deba a que los productos desarrollen alguna especie de reacción alérgica pues también estas células se encuentran involucradas en este tipo de reacciones, no creemos que pueda deberse algún tipo de infección ya que entonces también se hubiera visto afectada la cuenta de leucocitos y esto no fue así, además de que los animales utilizados se observaron sanos.

También se observó que tanto la Nifedipina como la Fescdipina provocan Leucopenia (ver fig. 22) y estos casos con frecuencia están relacionados con la posible intoxicación por la exposición con diferentes compuestos químicos. industriales o ambientales.⁷⁴ Sin embargo, la mayoría de los casos son producto de las reacciones secundarias de determinados fármacos, por ejemplo las sustancias alquilantes como Myrelan, Demicolchin; antimetabolitos como 6-mercaptopurina y antagonistas de ácido fólico; algunos anticonvulsivantes como Mesantoina; antimicrobianos como el Cloramfenicol y sulfamidas; agentes antiarrítmicos como Fenilbutazona por mencionar algunos.⁵⁹

Cuando una partícula extraña entra al interior del organismo humano, éste inmediatamente responde para eliminarlo es en este momento cuando los linfocitos se encargan de destruir a la partícula extraña, esto lo hace ya sea secretando anticuerpos o bien directamente los destruye.⁶⁸

El brazo efector de la RI humoral son los Anticuerpos, la presencia de estos en el suero representa históricamente la primera manifestación de la inmunidad que fue medida *in vitro*. Los anticuerpos son capaces de neutralizar toxinas, aglutinar bacterias y eritrocitos.⁶⁵

Según estudios realizados por Chedid en 1980¹⁵ e Ichiro A. en 1987³⁵ tanto el BCG como el Quitosan ayudan a los linfocitos B en la producción de cantidades mayores de Anticuerpos y estos resultados los hemos corroborado mediante la prueba de Inmunodot-ELISA en donde estos dos productos estimularon la producción de Anticuerpos totales ya que dieron títulos altos comparados con el control negativo ALP; con respecto a la Nifedipina y a la Fescdipina se obtuvo un título de anticuerpos pero en menor proporción y esto no es indicativo de algún tipo de estimulación.

Como ya se sabe las células fagocíticas se encargan entre otras cosas de eliminar las células alteradas e intervienen en funciones metabólicas importantes del ser vivo. Gracias a la fagocitosis, se eliminan del organismo un gran número de agentes patógenos.

La fagocitosis puede estar disminuida en el curso de algunas carencias inmunitarias (granulomatosis séptica familiar, síndrome de Chediak Higashi). También puede presentarse una disminución de la fagocitosis en el curso de algunos tratamientos inmunosupresores (corticosteroides, ciclofosfamida, radiaciones ionizantes), las que sin embargo no sólo afectan los mecanismos celulares de la fagocitosis sino también la producción de células fagocíticas. La fagocitosis se puede estimular mediante la activación de células fagocíticas, a nivel de los focos de agresión, en particular después de la inyección de diversos productos inmunoestimulantes (BCG, endotoxinas bacterianas, polinucleótidos sintéticos, extractos bacterianos).⁵

En este trabajo la manera de evaluar la fagocitosis fue apartir del método de eliminación en sangre de partículas de carbón, en el cual se estudian algunas funciones de los fagocitos, en particular su función

de captación de partículas extrañas, sobre todo el sistema fagocítico involucrado en el sistema retículo endotelial.

Algunas otras pruebas que se realizan para estudiar a las células fagocíticas son las siguientes:

a) *In vivo*

El único método que permite observar *in vivo* los macrófagos o los PMN, consiste en crear artificialmente un foco inflamatorio en condiciones tales que su valoración pueda vigilarse con microscopio. Existe otro método que es especialmente útil cuando se requiere estudiar el poder bactericida conferido después de la inmunización hacia bacterias que, en el animal normal se multiplican en los macrófagos.⁵

b) *In vitro*

Los PMN sólo se pueden obtener a partir de sangre o de exudados inflamatorios. Los macrófagos se pueden obtener de la misma manera, pero también a partir del órgano o de fragmentos de órganos o de cavidades naturales. Existen numerosas técnicas para obtener macrófagos en cultivo, se deben mantener en un medio rico, compuesto por un medio sintético como el de Parker o el de Eagle.⁵

Mediante el cálculo del índice de la actividad fagocítica encontramos que cuando se obtienen valores menores de 1.2 la actividad estimulante es nula, tal es el caso de la Nifedipina y la Fescdipina y esto se debe a que la mayoría de los antagonistas de calcio disminuyen las funciones de las células PMN.³¹ Cuando los valores se encuentran entre 1.3 - 1.5 se dice que hay ligera estimulación y en este rango encontramos al BCG a las 12 y 24 hrs. de haberse administrado y al Quitosan a las 24 hrs; si los índices son mayores de 1.5 se estaría hablando de una fuerte estimulación y aquí encontramos al BCG a las 6 hrs de administrado y al Quitosan a las 6 y 12 hrs de administrado, probablemente esto se deba a que el efecto que sobre el SI tienen dichos compuestos sea de acción inmediata y en el caso del BCG de poca duración, también se comprueba que estos actúan estimulando la activación de los macrófagos ya que estas son las principales células que intervienen en el proceso de fagocitosis.

Una rutina práctica utilizada en toxicología es el peso de órganos que es potencialmente afectada. Los órganos linfáticos que son convencionalmente usados para ser pesados son el bazo, que es el depósito o almacén para muchos linfocitos recirculantes; el timo, que juega el papel decisivo en el desarrollo del SI y que es afectado por muchos agentes inmunotóxicos y los ganglios linfáticos, que son importantes para la inducción de procesos inmunes.³⁰

Los cambios en los valores de peso del bazo, hígado y timo están en función de la concentración y por lo tanto en cantidad de células producidas en dichos órganos, al comparar los datos de nuestros

productos con los de los controles no se encuentra alteración significativa cuando los resultados fueron sometidos a la prueba estadística *t student* los productos no intervienen en la producción de células, más bien se enfocarían a la proliferación, activación de células y a la intervención de las funciones celulares aunque esto sería un poco difícil de probar.

Como se ha visto es importante el estudio de la acción inmune que tienen muchos productos farmacéuticos pero las pruebas realizadas en este trabajo solo son la base del estudio, es necesario que se lleve a cabo el seguimiento para corroborar y asegurar que el efecto que tienen sobre el SI es benéfico o no, algunas de las pruebas posteriores que se proponen puedan ser empleadas se mencionan a continuación:

I. Pruebas no funcionales

- a. Patología
- b. Niveles de Ig basal
- c. Médula ósea
- d. Enumeración de leucocitos en fluidos broncoalveolar, cavidad peritoneal y piel
- e. Análisis por citometría de flujo de subpoblaciones celulares y estados de mitosis

II. Pruebas funcionales

- a. Actividad de macrófagos
- b. Actividad de células NK
- c. Respuesta de Ac a un Ag específico
- d. Respuesta de Ac a eritrocitos de carnero

III. Pruebas de inflamación (hipersensibilidad retardada e hipersensibilidad por contacto) y autoanticuerpos (generación de artritis-Ac. contra coyunturas)

IV. Pruebas de autoinmunidad.^{20,21}

Con los resultados obtenidos en estas pruebas podemos clasificar a los productos no solo como candidatos a inmunoestimulantes sino como inmunoestimulantes, inmunosupresores o en su defecto como productos que no son nocivos para el SI.

Está claro que mucho queda por hacer antes de que las diversas facetas de la inmunomodulación queden entendidas. El uso de agentes que intensifican o suprimen la RI específica es cada vez más importante en nuestros intentos para entender y conocer más ampliamente al SI.

La posible utilidad de la potenciación incluye no solo el aumento de la respuesta a vacunas por poner un ejemplo, sino también la restitución de las respuestas inmunes deterioradas o alteradas a grados normales.

Los enfoques experimentales hacia la inmunoterapia se ha desarrollado a lo largo de varios lineamientos importantes durante los últimos años. Las aplicaciones de la inmunoterapia en la práctica clínica actual incluyen además del uso en la inmunodeficiencia, algunos tipos de infecciones virales y algunos trastornos autoinmunitarios.

En la actualidad se están investigando intensamente numerosos adyuvantes, inmunoestimulantes y medicamentos con efectos específicos e inespecíficos tal es el caso de:

T-activin, Timodulin, Vroncho-vaxom, Picibanil, Timosina α -1, Azimexón, Imexon, Bropirimina, por mencionar algunos.³³

Probablemente los inmunomoduladores funcionan a diferentes niveles del SI excepto en muy pocos casos en que la célula blanca precisa se desconoce.

Hay la necesidad obvia de desarrollar agentes que puedan modificar la respuesta inmune para mejoría de pacientes con deficiencias inmunes, ya sea inhibiendo o intensificando selectivamente a una subclase específica de células inmunes, por ejemplo incrementar la actividad supresora en enfermedades autoinmunes, disminuir la actividad supresora en varias neoplasias malignas o aumentar la actividad o el número de células asesinas naturales en la Leucemia.⁷⁰

7.0. CONCLUSIONES

- 1.- El efecto que tiene el Quitosan, Nifedipina y Fescdipina a nivel hematológico no es significativo comparado en el control negativo ALP y con el BCG (inmunoestimulante, control positivo).
- 2.- No hubo variación del peso de los órganos al administrar los productos y compararlos con los controles tanto negativo como positivo.
- 3.- La producción de Ac totales se ve favorecida cuando se administró el Quitosan en una dosis de 100 mg/Kg de peso.
- 4.- La producción de Ac's totales es muy pobre cuando se utiliza Fescdipina y Nifedipina a las dosis de 100 mcg y 100 mg / Kg de peso.
- 5.- El Quitosan y el BCG presentan actividad rápida a nivel fagocítico pero de poca duración.
- 6.- El Quitosan y el BCG presentan actividad estimulante con relación a su actividad fagocítica evaluada por el método de eliminación de carbón coloidal.
- 7.- La Nifedipina y la Fescdipina no presentan actividad inmunoestimulante con relación a su actividad fagocítica evaluada por el método de eliminación de carbón coloidal.
- 8.- El Quitosan es un buen candidato como agente inmunoestimulante ya que tanto en la producción de anticuerpos como en actividad fagocítica su comportamiento es similar y en ocasiones mayor al BCG.
- 9.- La Nifedipina y Fescdipina presentaron disminución en la actividad fagocítica lo que podría ser indicativo de actividad inmunosupresora.

8. APENDICE

A) Amortiguador de Fosfatos pH 6.6

Fosfato disódico	3.80 g.
Fosfato de potasio	5.47 g.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

B) Carbonato de Sodio 0.1%

Carbonatop de Sodio	0.1 g.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

C) E.D.T.A. 5%

EDTA	5.0 g.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

D) Líquido de Hayen

Dicloruro de mercurio	0.5 g.
Cloruro de sódio	1.0 g.
Sulfato de sódio	5.0 g.
Agua destilada c.b.p.	200 ml.

E) Líquido de Turck

Acido acético glacial	1.0 ml.
Solución al 1% de Azul de metileno	1.0 ml.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

F) Proteína A Fosfatasa 1:500

Proteína A fosfatasa reconstituída	10 μ l.
Solución Salina Fisiológica 0.9% c.b.p.	5.0 ml.

G) Solución amortiguadora de Trietilonamina (TBS) pH 7.2

Cloruro de Sodio	7.5 g.
Trietilonamina	2.8 ml.
Acido clorhídrico 1N	17.0 ml.
Cloruro de Magnesio	0.1 g.
Cloruro de Calcio	0.02 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

H) Solución amortiguadora TBS-Tween 20 0.05%

TBS pH 7.2 c.b.p.	1000 ml.
Tween 20	0.5 ml.

I) Solución Bloqueadora (Leche descremada al 5% en TBS)

Skim- milk	5.0 g.
TBS pH 7.2	100 ml.

J) Solución de Gelatina 1% en Solución Salina Fisiológica 0.9%

Gelatina	100 mg.
Solución Salina Fisiológica 0.9%	10 ml.

K) Solución Reveladora

α -cloronaftol	30.0 mg.
Metanol	10.0 ml.
TBS pH 7.2	50.0 ml.
Peróxido de hidrógeno	0.05 ml.

L) Solución Salina Fisiológica 0.9%

Cloruro de Sodio	0.9 g.
Agua destilada c.b.p.	100 ml.

M) Suspensión de Carbón

Tinta India	1.6 ml.
Solución de gelatina 1% en solución salina fisiológica c.b.p.	10.0 ml.

9. REFERENCIAS

1. Abbott.A.C.(1896), ACUTE ALCOHOLISM ON THE VITAL RESISTENCE OF RABBITS TO INFECTION, J. Exp. Med. 1:447.
2. Afshar, A. (1986), DOT-ENZYME IMMUNOSSAY FOR VISUAL DETECTION OF ANTIBODIES TO PSEUDORABIES IN SWINE SERUM, J. Clin. Microbiol. 23:563-567.
3. Austin, P.R. and Sennett, S. (1986), DRY CHITOSAN SALTS AND COMPLEXES OF ALIPHATIC CARBOXYLIC ACIDS, Chitin in Nature and Technology, editorès Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 279-286.
4. Azuma, Y. and Jollés, G. (1987), IMMUNOSTIMULANTES: NOW AND TOMORROW, Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/Springer - Verlag. Berlin, 3-39.
5. Bach, J.F. (1989), *Inmunología*, Ed. Ediciones Ciencia y técnica, S.A., Vol. 1, México, 110-113.
6. Barcenas, M.G. y Rodríguez, P.M.C. (1990), Diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos utilizando el método Dot-elisa. Tesis de Licenciatura, UNAM.
7. Bencerraf, B. y Unanue, E.R., (1990), *Inmunología*, 2ªed., Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 95-97.
8. Biozzi, G., Bencerraf, B. and Halpern, B.N. (1953), QUANTITATIVE STUDY OF THE GRANULOPECTIC ACTIVITY OF THE RETICULO-ENDOTHELIA SYSTEM II, Br. J. Exp. Ohatology 34: 441- 457.
9. Birs, D.L., Berger, M. and Fleisher, T.A. (1984), THE INTERFERENCE OF T CELL ACTIVATION BY CALCIUM CHANNEL BLOCKING AGENTS, J. Immunology 133: 2904 - 2909.
10. Braunwald, E. (1982), MECHANISM OF ACTION OF CALCIUM.CHANNEL.BLOCKING AGENTS, N.Engl. J. Med. 307: 1618- 1622.
11. Brewer, M.A., Edwards, K.M., Palmer, P.S. and Hinson, H.P. (1994), BACILLE CALMETTE-GUERIN IMMUNIZATION IN NORMAL HEALTHY ADULTS, J. Infectious Diseases 170: 476 - 479.

12. Brown, G.F. and Revillard, J.P.L. (1992), DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION: STANDARDIZATION OF THE IMMUNOPHARMACOLOGY, Vo. 77, Karger-Basel, Switzerland by Medicine et Hygiène, Geneve.
13. Chandra, R.K. and Matsumara, T. (1979), ONTOGENIC DEVELOPMENT OF THE IMMUNE SYSTEM AND EFFECTS OF FETAL GROWTH RETARDATION, J. Perinat. Med. 7: 279 - 390.
14. Chapel, H. and Haeney, M. (1993), ESSENTIALS OF CLINICAL IMMUNOLOGY, 3^a ed. , editorial Blackwell Scientific Publications Great Britain at University Press Cambridge, 1 - 31.
15. Chedid, L. (1980), IMMUNOSTIMULATION, editorial Springer-Verlag, Alemania, 231.
16. Coffman, R.L., Leberman, D.A. and Rothman, P. (1993), MECHANISM REGULATION OF IMMUNOGLOBULIN ISOTYPE SWITCHING, Adv. Immunol 54:229-269.
17. Cohen, E. (1986), INHIBITION OF CHITIN SYNTHESIS IN INSECT SYSTEMS. Chitin in Nature and Technology, editores Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 139-145.
18. Daugelat, S., Ladel, C.H. and Kaufmann, S.H.E. (1995), INFLUENCE OF MOUSE AND VACCINE VIABILITY ON T-CELL RESPONSES INDUCED BY *Mycobacterium bovis* BACILLUS CALMETTE-GUERIN, Infection and Immunity 63: 2033 - 2939.
19. Davidsohn, I. and Bernard, H.J. (1992), Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio, 8ª edición, tomo I, editorial Salvat, Barcelona, 724-738
20. Dean, J.H., Descotes and J., Kuper, F. (1996), PRINCIPLES AND METHODS FOR ASSESSING DIRECT IMMUNOTOXICITY ASSOCIATED WITH EXPOSURE TO CHEMICALS, Environmental Health Criteria 180, World Health Organization (WHO), Gêneva, 1-303
21. Descotés, J. (1988), IMMUNOTOXICOLOGY OF DRUGS AND CHEMICALS, editorial Elsevier, Oxford, 3-5, 181-182.
22. Dey, P.M. and Harbone, J.B. (1991), METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY, editorial K. Hostettmann Academia Press, Vol 16, San Diego, California, 201-202.

23. Donald, K.J. (1972), ELEVATED RATES AND ALTERED CHARACTERISTICS OF THE CLEARANCE OF CARBON FROM THE BLOOD OF RABBITS WITH VARIATIONS IN ENVIRONMENTAL CONDITIONS, *J. Pathol.* 107: 73-85.
24. Drews, J. (1990), IMMUNOPHARMACOLOGY: PRINCIPLES AND PERSPECTIVES, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Switzerland, 1-300.
25. Dudley, D.J. and Wiedmeir, S. (1991), ONTOGENY OF THE IMMUNE RESPONSE, *Sem. Perinatol.* 15: 184 - 195.
26. Escobar, G.A. (1992), Respuesta inmunológica y protección en vacunas, ciencia y salud, editado por Escobar, A., Valdespino, J.L. y Sepúlveda, J. Secretaría de Salud, México, 29-54.
27. Fradet, G., Brister, S., Mulder, D.S., Lough, J. and Averbach, B.L. (1986), EVALUATION OF CHITOSAN AS A NEW HEMOSTATIC AGENT: IN VITRO AN IN VIVO EXPERIMENTS, *Chitin in Nature and Technology*, editores Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 443 - 445
28. Gallin, J.I., Rosenthal, A.S. (1974), THE REGULATORY ROLE OF DIVALENT CATIONS IN HUMAN GRANULOCYTE CHEMOTAXIS: EVIDENCE FOR AN ASSOCIATION BETWEEN CALCIUM EXCHANGES AND MICROTUBULE ASSEMBLY, *J. Cell. Biol.* 62: 594.- 609.
29. Germain , R.N. and Margulies, D.H. (1993), THE BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION, *Annu. Rev. Immunol*, 11: 403-450.
30. Gilchrist, T.L. (1995), Química heterocíclica, 2ªde., De. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., Wilmington, Delaware, EUA, 125-128.
31. Goldstein, I.M., Hoffstein, S.T. and Weissmann, G. (1975), INFLUENCE OF DIVALENT CATIONS UPON COMPLEMENT-MEDIATED ENZYME RELEASE FROM HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES, *J. Immunol* 115: 665 - 670.
32. Hadden; J.W. and Szentivany, A. (1990), IMMUNOPHARMACOLOGY REVIEWS, Ed. Plenum Press, Vol.1, New York - London, 1-11.
33. Hadden, J.W. (1993), IMMUNOSTIMULANTS, *Immunology today*, 14(6):275-280.
34. Hansjörg, S. and Bloomfield, D.A. (1983), CARDIOACTIVE DRUGS A PHARMACOLOGIC BASIS FOR PRACTICE, editorial Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 136 - 138.

35. Ichiro, A., Joji, I., Nishimura, K., Ishihara, C. and Yamamura, Y. (1987), STIMULATION OF HOST DEFENSE MECHANISMS WITH SYNTHETIC MDP AND CHITIN DERIVATIVES AGAINST VIRAL INFECTION IN MICE, *Immunopharmacology of infectious diseases: Vaccine Adjuvants and modulators of non-specific resistance*, 245-254.
36. Instituto Mexicano del Seguro Social (1978), LABORATORIO CLINICO PROCEDIMIENTOS, Subdirección general Médica, México, 451-458.
37. Janeway, C.A. (1993), HOW THE IMMUNE SYSTEM RECOGNIZES INVADERS, *Scientific American* 269: 40-47.
38. Jaulmes, C. and Jude, A. (1972), *Práctica de laboratorio*, editorial Toray-Masson, S.A., Barcelona, 655-657.
39. John, B. and Miale, M.D. (1985), *Hematología medicina de laboratorio*, editorial Reverte. S.A., Barcelona, 379-383.
40. Kaklamani, E., Karalis, D., Kaklamanis, P., Koumandaki, Y., Katsouyanni, K., Blackwell, C., Sparos, L., Weir, D. and Trichopoulos, D. (1991), THE EFFECT OF *Mycoplasma arthritidis* INFECTION ON THE PHAGOCYtic ACTIVITY OF MACHOPHAGES IN RATS AND MICE, *Microbiology Immunology* 76: 151-158.
41. Kazanjian, P.H. and Pennington, J.E. (1985), INFLUENCE OF DRUGS THAT BLOCK CALCIUM CHANNELS ON THE MICROBIAL FUNCTION OF HUMAN NEUTROPHILS, *J. Infections diseases* 151: 15 - 22.
42. Kuby, J. (1992), IMMUNOLOGY, editorial Freeman, U.S.A., 410-412.
43. Laird, II, H.E., Ph. D. (1993), *Inmunotoxicología*, Simposium "Temas de toxicología", Cd. Universitaria, UNAM, 1-3.
44. Linsley, P.S. and Ledbetter, J.A. (1993), THE ROLE OF THE CD28 RECEPTOR DURING T CELL RESPONSES TO ANTIGEN. *Ann. Rev. Immunol*, 11: 129-164.
45. Malette, W.G., Quigley, H.J. and Adickes, E.D. (1986) CHITOSAN EFFECT IN VASCULAR SURGERY, TISSUE CULTURE AND TISSUE REGENERATION, *Chitin in Nature and Technology*, editores Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 435 - 439.
46. Margini, R.A. (1989), *Inmunología e inmunoquímica fundamentos*, 4ª edición, editorial Médica Panamericana, 310-312.

47. Voller, A., Roberts, J.M., Minter-Goedbloed, E. and Lighthart, G.S. (1978), STUDY ON THE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TEST FOR SCHISTOSOMA MANSONI INFECTIONS, *Ann. Trop. Med. Parasit.* 72: 243 - 253.
48. Moguel, A., Meyer, R. (1991), Estudio de farmacovigilancia de Nifedipina de liberación prolongada en pacientes con hipertensión arterial, *Investigación Médica Internacional* 18:59- 65.
49. Morilla, G.A. and R. B. C. (1986), *Manual de inmunología*, editorial Diana técnico, México, 129-135.
50. Montaraz, J.A. (1987), *Manual de inmunología veterinaria*, UNAM.
51. Montaraz, J.A. (1993), *Inmunidad e inmunomoduladores*, Memorias del 1er. Curso de Temas de Inmunofarmacología: Los Inmunoestimulantes, FES- Cuautitlán, UNAM
52. Mueller, H.S., Atman, E.M., Ferst, J.A. and Muller, J.E. (1981). NIFEDIPINE IN THE TREATMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASE, *Pharmacotherapy* 1: 78-94.
53. Muzzarelli, R.A.A., Tanfani, F., Emanuelli, M., Chiurazzi, E. and Piani, M. (1986), SULFATED N-CARBOXYMETHYL CHITOSANS AS BLOOD ANTICOAGULANTS, *Chitin in Nature and Technology*, editores Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 469-475.
54. Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I. (1986), IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF CHITIN DERIVATES, *Chitin in Nature and Technology*, editores Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 477-483.
55. Organización Mundial de la Salud (O:M:S), (1980), *Coadyuvantes Inmunológicos*, México, D.F., -5-50.
56. Pappas, M.G., Hajkowski, R. and Hockmeyer, W.T. (1983) , DOT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (DOT-ELISA): A MICRO TECHNIQUE FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS, *J. Immunol. Methods* 64: 205- 209.
57. Parker, D.C. (1993), T-CELL DEPENDENT B-CELL ACTIVATION, *Annu. Rev. Immunol.* 11:331-360.
58. Parker, K.D. (1986), PROGRESS TOWARDS SOLVING THE STRUCTURES OF POLYSACCHARIDES, *Chitin in Nature and Technology*, Editores Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 1-3.
59. Platt, W.R. (1972), *Atlas de hematología en color*, editorial Jims, Barcelona, 59-62.

60. Poulícek, M., Voss-Foucart, M.F. and Jeuniaux, C. (1987), CHITINOPROTEIC COMPLEXES AND MINERALIZATION IN MOLLUSK SKELETAL STRUCTURES, Chitin in Nature and Technology, editores Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., editorial Plenum, 7-12.
61. Rojas, M.W. (1988), Inmunología, editorial CIB (corporación para investigaciones biológicas), Medellín, Colombia, 499-500.
62. Romero, R.A. (1993), Historia de la inmunofarmacología y el uso de inmunoestimulantes, Memorias del 1er. Curso de Temas de Inmunofarmacología: Los Inmunoestimulantes, FES- Cuautitlán, UNAM.
63. Ruitenbergh, E.J., Steerenberg, P.A., Brosi, B.J.M. and Buys, J. (1976), RELIABILITY OF THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR THE SERODIAGNOSIS OF *Trichinella spiralis* INFECTIONS IN CONVENTIONALLY RAISED PIGS, J. Immunol. Methods 10: 67-83.
64. Santos, A.L. (1994), Principios básicos de la respuesta inmunológica, Perinatol. Reprod. Human 8: 3-11.
65. Santos, A.L. (1995), Vida y muerte del linfocito B: la biología del linfocito B, Ciencia y desarrollo, 21(125): 23-29.
66. Serhan, C.N., Korchak, H.M. and Weissmann, G. (1980), PGB_x A PROSTAGLANDIN DERIVATIVE, MIMICS THE ACTION OF THE CALCIUM IONOPHORE A23187 ON HUMAN NEUTROPHILS, J. Immunol 125: 2020-2024.
67. Sideney, J., Howard, M. G., Ralph, T.K. and Sette, A. (1996), PRACTICAL, BIOCHEMICAL AND EVOLUTIONARY IMPLICATIONS OF THE DISCOVERY OF HLA CLASS Y SUPERMOTIFS, Immunology Today 17 (6):261-266.
68. Staines, N., Brostoff, J. and James, K. (1993), INTRODUCTION IMMUNOLOGY, 2ª edición, editorial Mosby, Hong Kong, 5-68.
69. Stites, D.P., Stobo, J.D., Foulener, H.H. and Wells, J.V. (1985), INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA, 5ª ed., Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V., México, D.F., 274-290
70. Swift, H.F. (1922), THE ACTION OF SODIUM SALICYLATE UPON THE FORMATION OF IMMUNE BODIES FORMATION, J.Exp. Med. 36: 735.
71. Tabel, H. (1996), Immunol.Immunopath. 54:117-121

72. Towbin, H. and Gordon, J. (1984), IMMUNOBLOTTING AND DOT IMMUNOBINDING CURRENT STATUS AND OUT LOOK, J. Immunol. Methods 72: 313 - 316.
73. Valdés, R.R. (1994), nutrición y respuesta inmune, Peritatol Reprod. Hum. 8: 20 - 22.
74. Walker, H.K., Hall, W.D. and Hurst, J.W. (1985), Métodos clínicos, 2ª ed., Ed. Interamericana, México, 912.
75. Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Rundles, R.W. Hematología, 2ª de. Tomo I , Ed. Salvat, 11-25.
76. Zalis, M. and Jaffe, C.L. (1987), ROUTINE DOT-BLOT ASSAY OF MULTIPLE SERUM SAMPLES USING A SIMPLE APPARATUS, J. Immunol. Methods 101: 261-264.
77. Zavazava, N. and Eggert, F. (1997), MHC AND BEHAVIOR, Immunology Today 18 (1):8-10.