

112624



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado



EFECTO DEL LEVAMISOL SOBRE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA Y QUIMIOTAXIS EN CELULAS POLIMORFONUCLEARES DE RECIEN NACIDOS PEQUEÑOS PARA EDAD GESTACIONAL

Tesis de Posgrado

para obtener el título de:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

P r e s e n t a :

Dr. Jorge Rubén Dávila Velázquez



IMSS

México, D. F.

1995

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

DR MARTINEZ CAIRO mi maestro que me guio durante mi maestria , que me apoyo para obtener las cosas a base de esfuerzo y finalizarlas. Además de sus consejos .

DRA. RAMIREZ LACAYO mi maestra que me enseño las bases principales que son el apoyo para mis principios científicos.

ATODO EL PERSONAL DE INMUNOQUIMICA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO, sin excluir a nadie principalmente a dos personas desinteresadas y que nunca me dejaron solo Dr José Ignacio Santos y QFB Pilar García .

a mis padres que gracias a su ejemplo puedo seguir adelante.

Al personal del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 que me dieron el apoyo para realizar mi tesis

A ti NIDIA que con sacrificio pudiste darme el apoyo a pesar de privarte de algunas necesidades.

Al personal de investigación que me apoyaron en la realización de mis trabajos.

FALLA DE ORIGEN

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
RECEN NACIDO PEQUEÑO PARA EDAD GESTACIONAL	3
CONCEPTO	3
ASPECTOS INMUNOLOGICOS	4
FUNCION FAGOCITICA EN EL RECEN NACIDO PEQUEÑO PARA EDAD GESTACIONAL	6
INMUNOTERAPIA EXPERIMENTAL	7
LEVAMISOL	7
GENERALIDADES	7
EFFECTO EN LA RESPUESTA INMUNE	9
EFFECTO EN LA FAGOCITOSIS	11
MECANISMO DE ACCION DE LEVAMISOL	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVO	15
HIPOTESIS	15

MATERIAL Y METODO	16
MATERIAL HUMANO	16
CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS	16
MATERIAL BIOLÓGICOS	17
OBTENCIÓN DE CELULAS POLIMORFONUCLEARES	17
METODO DE ACTIVIDAD MICROBICIDA	18
METODO DE QUIMIOTAXIS	19
ANÁLISIS DE RESULTADOS	21
ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN	22
RESULTADOS	23
CARACTERISTICAS DE LOS RECIÉN NACIDOS	23
EFFECTO DE LEVAMISOL EN LA QUIMIOTAXIS DE LOS PMN	23
ACTIVIDAD MICROBICIDA CONTRA <i>S. aureus</i>	26
DISCUSIÓN	30
BIBLIOGRÁFICA	36

FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

Se ha observado que la susceptibilidad de adquirir infecciones es mayor en el recién nacido pequeño para su edad gestacional que en el recién nacido eutrófico. Por ejemplo, se ha estimado que la septicemia neonatal puede afectar a 1 de cada 500 recién nacidos vivos con una mortalidad del 4% a recién nacidos eutróficos y del 20% a recién nacidos pequeños para su edad gestacional (1-2). Se ha estudiado la respuesta inmune en niños recién nacidos con retardo en el crecimiento y se ha observado que existe un deterioro en los mecanismos de resistencia a las infecciones (3).

Ferguson estudió la capacidad linfoproliferativa y el porcentaje de linfocitos T formadores de rosetas y la capacidad linfoproliferativa de linfocitos de recién nacidos desnutridos y la comparó con la de linfocitos de recién nacidos eutróficos, y observó que la linfoproliferación y capacidad de formación de rosetas de los linfocitos T de recién nacidos pequeños para su edad gestacional, fueron menores que las de los recién nacidos eutróficos (4).

La función de fagocitosis de los neutrófilos y de los macrófagos también ha sido evaluada en los recién nacidos con retardo en el crecimiento intrauterino y se ha observado que tienen deterioro en la fagocitosis.

Algunos investigadores han descrito que los niveles séricos de inmunoglobulinas son menores en los recién nacidos pequeños para su edad gestacional cuando se comparan con las inmunoglobulinas de recién nacidos eutróficos (5-8).

Se ha observado que la administración de factores subcelulares como citocinas, gammaglobulina o tuftsin, disminuyen la incidencia de infecciones en recién nacidos (9-13).

Desde hace más de 15 años se demostró que el levamisol activa las funciones de los linfocitos T y de las células fagocíticas (14).

En el presente trabajo nos propusimos investigar el efecto del levamisol en las funciones de quimiotaxis y actividad bactericida de células polimorfonucleares de recién nacidos pequeños para su edad gestacional.

ANTECEDENTES

EL RECIEN NACIDO PEQUERO PARA EDAD GESTACIONAL

CONCEPTO.

Para definir al recién nacido pequeño para su edad gestacional (RNPEG) se han utilizado criterios fundamentados en el peso y talla al nacimiento y su relación con la edad gestacional.

Lubchenco realizó el registro de peso talla y edad gestacional de 40,000 recién nacidos entre la semana 25 y 42 de edad gestacional determinando los valores percentilares, con estas mediciones se consideró al recién nacido pequeño para su edad gestacional, cuando el peso al nacimiento se encuentra por abajo de la percentila 10. Algunos autores han referido indistintamente al recién nacido pequeño para su edad gestacional como recién nacido con retardo en el crecimiento intrauterino o recién nacido desnutrido *in utero* (15-16).

La frecuencia del nacimiento de niños con retardo en el crecimiento es de 3 % en los países desarrollados, y de 30 % en países en desarrollo (17-19).

Los factores que pueden condicionar el nacimiento de niños con retardo en el crecimiento intrauterino son muy variables, dependiendo de factores propios del feto, materno o factores placentarios entre los que se encuentran desnutrición materna, diabetes mellitus gestacional, preeclampsia, drogadicción.

alcoholismo, tabaquismo, infecciones intrauterinas, disfunción placentaria, postmadurez (20-22).

Se ha identificado como factor importante en el retardo en el crecimiento a la Toxemia Gravídica ya que en algunos estudios de frecuencia se ha observado que esta enfermedad produce el 76 % de los recién nacidos pequeños para su edad gestacional. La causa de ello parece ser una disminución en la perfusión sanguínea placentaria y en la superficie trofoblástica, conduciendo a una disminución de nutrientes al feto produciendo retraso en el crecimiento con disminución del tamaño y función de órganos como hígado, corazón, timo, bazo y páncreas (23).

ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.

En forma similar que en niños de otras edades que presentan desnutrición proteico calórica el recién nacido pequeño para su edad gestacional se le ha observado una mayor susceptibilidad a las infecciones por gérmenes gram negativos (24-25).

Madden investigó la frecuencia de septicemia en recién nacidos sometidos a trauma quirúrgico, observando que el 44% de los RNPEG presentaron sepsis, mientras que los recién nacidos eutróficos en un 6.5 % (26).

En el RNPEG se observaron alteraciones en los órganos linfoides y de las células que participan en la respuesta inmune. Martínez-Cairo y cols. estudiaron la actividad del factor tímico en recién nacidos pequeños para su edad gestacional y de recién nacidos eutróficos observando una menor actividad del factor tímico

en recién nacidos pequeños para su edad gestacional, que afecta la función endócrina para inducir maduración y diferenciación de las células linfoides timodependientes. Estas conclusiones están apoyadas en trabajos previos, ya que los mismos investigadores demostraron que el porcentaje de linfocitos T y B en los recién nacidos desnutridos *in utero* era menor que en recién nacidos eutróficos (27-28).

Resultados semejantes fueron descritos por Ferguson y cols, quienes estudiaron 17 recién nacidos con retardo en el crecimiento intrauterino y los comparó con 25 recién nacidos eutróficos, valoró la respuesta cutánea y respuesta linfoproliferativa de los linfocitos T de cada uno de ellos y observó que la respuesta linfoproliferativa de los recién nacidos con retardo en el crecimiento era menor que la de los recién nacidos eutróficos(4).

Saha estudió 20 niños eutróficos, 15 prematuros y 15 RNPEG a los cuales les investigó los niveles séricos de IgM, IgG e IgA, además del factor C3 del complemento, observando que los niveles más bajos los tenían los recién nacidos pequeños para su edad gestacional. Concluyendo que la respuesta del RNPEG es menor que la del RN de término y de Pre término(5). Ahmad en otro estudio observó que existe disminución de la concentración sérica de IgG de recién nacidos PEG y RN prematuros comparados con recién nacidos de término sanos sin existir diferencia entre los RNPEG y RN prematuros con aumento en los RN de término en relación a los dos grupos(6).

FUNCION FAGOCITICA EN EL RECIEN NACIDO PEQUEÑO PARA SU EDAD GESTACIONAL.

Las funciones de los polimorfonucleares de recién nacidos pequeños para su edad gestacional fueron evaluados por Chandra y Prokopowits(29), Chandra estudió 26 recién nacidos con desnutrición intrauterina y los comparó con 26 recién nacidos eutróficos a todos ellos les investigo las funciones de los PMN y observó que la actividad opsonica del suero, quimiotaxis, fagocitos, metabolismo oxidativo y destrucción intracelular es menor en el recién nacido pequeño para su edad gestacional(3-29).

Recientemente Catherine Harris utilizando un modelo murino de desnutrición intrauterina, evaluó la quimiotaxis y adherencia de los PMN, comparando ratas recién nacidas con desnutrición y sin desnutrición, encontrando que los PMN de ratas RN desnutridas tienen disminuidas las funciones de adherencia y quimiotaxis(30).

INMUNOTERAPIA EXPERIMENTAL.

Para disminuir la incidencia de infecciones e incrementar la respuesta de los fagocitos, se han utilizado productos naturales como la transfusión de granulocitos(31), gamaglobulina (10-12), interferon gama(32) y sintéticos como el levamisol.

LEVAMISOL

GENERALIDADES.

El levamisol es un enantiómero del tetramisol, fue sintetizado como la forma racémica del tretamisol, se introdujo en la práctica veterinaria como antihelmintico en 1965, y en humanos en 1966(33).

Durante la evaluación inicial de su efecto contra nemátodos se observaron algunos efectos adicionales que sugirieron que la droga podría alterar los mecanismos de defensa del hospedero. El levamisol no influye en la respuesta primaria a virus, bacterias, protozoarios o células tumorales en huéspedes normales, es en el huésped inmunocomprometido en donde se observa su efecto.

Este mecanismo se ha explorado en el laboratorio con modelos animales y humanos. El levamisol fue desarrollado inicialmente por Janssen Research Laboratories en Beerse Bélgica como parte del programa para encontrar nuevas drogas antihelmínticas. Inicialmente se produjo un metabolito derivado del amino tiazol(D15, 6 dihidroxio (2-tienil) m- imidazol(2,1) a partir del cual se

sintetizó el tetramisol, este último compuesto tiene dos isómeros, el levamisol y el dexamisol, observándose que el levamisol es muchas veces más potente que el dexamisol(34).

El hidrociorhidrato del levamisol es un compuesto estable cristalino con un peso molecular de 240.75, rápidamente soluble en agua, estable en solución ácida, se hidroliza en solución alcalina y se descompone al incrementarse la temperatura y el pH(34).

Estudios experimentales demuestran que el levamisol(10^{-4} , 10^{-5} M) estimula los ganglios parasimpáticos, produciendo efectos espasmogénicos sobre los tejidos intestinales de mamíferos; además produce inhibición neuromuscular en preparaciones de rata y pollo.

El levamisol tiene propiedades semejantes a las de la nicotina, induce relajación del músculo liso reduciendo temporalmente la permeabilidad del calcio en membranas despolarizadas, tiene un efecto inotrópico positivo sobre el músculo papilar del gato prolongando el periodo refractario, aumenta la norepinefrina e induce contracciones de los vasos cutáneos de la rata .

Es interesante la propiedad bioquímica del levamisol para inhibir en forma no competitiva a las fosfatasa alcalinas. Esta inhibición se consigue con bajas concentraciones de levamisol(10^{-6} M); y aunque esta inhibición se lleva a cabo en muchos tejidos, esta función no se realiza en placenta ni en intestino(35).

El levamisol es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal y de los tejidos. Después de una dosis oral de 150 mg en un adulto, a los 60 a 120 minutos llega a un pico de 0.7 µg/mL (Aproximadamente 3×10^{-6}). La droga tiene una vida media plasmática de 4 horas en el hombre, es metabolizado en el hígado y completamente eliminado del organismo a las 48 horas (35-36).

Se pueden alcanzar concentraciones plasmáticas de levamisol más altas cuando se aplica por vía intramuscular o intravenosa que en la administración oral (37).

El levamisol es específicamente tóxico a nemátodos, causando parálisis y eliminación de ellos, dependiendo la infección y estado del hospedero. Los niveles terapéuticos varían entre 2 a 40 mg / kg de peso corporal, aunque la dosis en la práctica es de 150 mg al día en el adulto y 3 mg/Kg de peso en el niño (35,38,39).

EFFECTO EN LA RESPUESTA INMUNE

Los efectos del levamisol sobre los mecanismos de resistencia a las infecciones fueron descritos inicialmente al observar que cachorros de sabueso infestados con larvas de *Toxocara canis* presentaron atrofia tímica y una mortalidad del 25%. El tratamiento con levamisol disminuyó de la mortalidad al 5% y no se encontró atrofia tímica (34).

En un modelo murino con ratones inmunizados contra *Brucella* y que se retaron seis semanas después con una cepa virulenta de *Brucella abortus* y sacrificados once días después, se observó que se

infectaron a pesar de la vacuna. En los ratones tratados con levamisol, al segundo día de la aplicación de la vacuna, no se observó infección. Un tercer grupo de ratones tratados exclusivamente con levamisol también se infectaron, concluyendo que el levamisol aumenta la eficacia de la vacuna(40). Así mismo Fischer y cols en 1974 realizaron un estudio de eficacia terapéutica del levamisol en sepsis neonatal experimental. La sobrevivida de ratas recién nacidas infectadas con *Staphylococcus aureus* y tratadas con levamisol fue de 80% contrastando con una sobrevivida de 15 % del grupo control (41).

Los efectos del levamisol sobre el sistema inmunes han sido extensamente estudiados *in vitro* en células aisladas de animales de experimentación, sujetos normales y pacientes.

Los primeros reportes en la literatura, ofrecieron datos contradictorios por varias razones, entre ellas que el levamisol se estudió con dosis terapéuticas y supraterapéuticas sobre las funciones inmunes humoral y celular de hospederos normales e inmunocomprometidos(35).

Analizando la literatura se llega a la conclusión que el levamisol tiene un amplio pero definido efecto sobre los linfocitos T y fagocitos maduros e inmaduros, no así en linfocitos B y linfocitos T normales.

Algunas de las funciones de los linfocitos T se estimulan con levamisol (42,43). Scheinberg estudió la respuesta linfoproliferativa de linfocitos T de pacientes con lupus

eritematoso sistémico y artritis reumatoide y observo un aumento en la capacidad de proliferación de los linfocitos T tratados con levamisol (44). Así mismo, se ha observado que el levamisol incrementa la cantidad de los factores activador de macrófago e inhibidor de la migración producidos por linfocitos T (45).

Utilizando líneas celulares murinas, se ha observado que el levamisol incrementa la linfoproliferación de los linfocitos T estimulados con Concaivalina A e interleucina 2 concluyendo que el estímulo en la respuesta linfoproliferativa es secundario al incremento en la afinidad del linfocito T por la interleucina 2(46). En otro modelo con macrófagos peritoneales murinos, el levamisol incremento la producción de interleucina 1 producida por macrófagos activados con lipopolisacáridos (47).

EFECTO EN LA FAGOCITOSIS .

Las funciones de los linfocitos que son restauradas por el levamisol son : la migración al azar, quimiotaxis, adherencia, fagocitosis, reducción de NBT, actividad de peroxidasa y destrucción intracelular(48-50).

Cuando se estudia el efecto del levamisol sobre las funciones de los fagocíticas, los resultados más consistentes se han observado al evaluar su efecto sobre la quimiotaxis. Anderson utilizó células polimorfonucleares de sujetos normales y observó que con la preincubación con levamisol se incrementa la quimiotaxis hacia caseína hidrolizada y suero activado con endotoxina y que además esta respuesta es dependiente de los

niveles citoplasmáticos de AMPc (46).

En estudios clínicos se ha observado que al administrar el levamisol a niños con disminución de la actividad quimiotáctica de las células polimorfonucleares e historia de infección crónica recurrente, se incrementa la quimiotaxis y disminuyen las infecciones (49). Recientemente Modi y cols estudiaron pacientes urémicos en los que se observó disminución de la actividad quimiotáctica, la que corrigió al incubar a estas células con levamisol. La quimiotaxis de los granulocitos de pacientes urémicos tratados con levamisol, fue similar al grupo control (50). Schmidt y Douglas realizaron un estudio semejante, utilizando células polimorfonucleares de adultos sanos y observaron que al incubarlas con levamisol su quimiotaxis se incrementó (51).

Renoux, en un modelo murino, observó que macrófagos peritoneales de ratones tratados con levamisol aumentaron la capacidad de destruir *Listeria monocytogenes* (52). Oliveira Lima, valoró el efecto de levamisol sobre la actividad fagocítica de macrófagos previamente incubados con levamisol, y observó que los macrófagos incrementan la fagocitosis de partículas de latex cubiertas con anticuerpo y complemento (53). Así mismo, Wynne reportó incremento en la endocitosis de partículas de latex por neutrófilos de pacientes con artritis reumatoide tratados con levamisol (54). Gomez Estrada y cols han obtenido resultados semejantes en modelos humanos y murinos (55-56).

En las investigaciones realizadas en modelos animales y

humanos el levamisol no afecta significativamente la concentración circulante de inmunoglobulinas. Sin embargo, se ha observado una reducción de los complejos inmunes circulantes en pacientes con artritis reumatoide, tratados con levamisol. Estos resultados son similares cuando se estudio la depuración de complejos inmunes en pacientes con hepatitis (57,58).

MECANISMO DE ACCION DEL LEVAMISOL.

El mecanismo de acción de la droga no esta completamente entendido pero se ha observado que es dependiente de las concentraciones intracelulares de AMPc y GMFc. En un estudio con macrófagos murinos incubados durante 30 minutos con levamisol, se facilitó la fagocitosis, este fenómeno se explico por la activación de la fosfodiesterasa y secundariamente por disminución en los niveles de AMPc (49). Otro estudio que apoya este mecanismo es el de Anderson en el cual cuantifica la quimiotaxis y la correlaciona con los niveles de GMFc y AMPc, observando que al aumentar el GMFc disminuye el AMPc y la quimiotaxis aumenta(48).

Alternativamente el levamisol puede servir como agente antioxidante, ya que puede prevenir la formación de radicales libres de O_2 y peroxido, interfieren con la actividad del neutrófilo o puede aumentar la polimerización de los microtubulos en las membranas celulares, resultando una alteración en la función del leucocito(59).Otro efecto del levamisol, al igual que la hormona tímica, es el inducir precursores celulares para llegar a producir linfocitos T maduros(34,60-62). Dada la influencia del

Levamisol sobre la maduración del linfocito se ha descrito al levamisol como agente Timomimético, sin embargo el levamisol también incrementa los niveles de GMPC y la proliferación celular que son funciones colinérgicas. Por lo que aún no es claro si el levamisol influye directamente en los nucleótidos por estímulo en el receptor colinérgico o al estimular un receptor para la hormona tímica .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La manifestación clínica de la desnutrición fetal es el recién nacido pequeño para edad gestacional (RNPEG), que a semejanza de otros modelos de desnutrición tiene disminución en los mecanismos de defensa contra las infecciones, como disminución en la fagocitosis y quimiotaxis. Estas observaciones fundamentaron la pregunta de que si el levamisol tiene algún efecto sobre la actividad microbicida y quimiotáctica en células polimorfonucleares de RNPEG. Para ello utilizamos un modelo *in vitro* en el cual células polimorfonucleares (PMNs) procedentes de cordón umbilical de recién nacidos desnutridos y de recién nacidos eutróficos fueron incubadas con levamisol.

OBJETIVO

Demostrar en un modelo *in vitro* el efecto del levamisol sobre la actividad quimiotáctica y microbicida de PMNs de recién nacidos pequeños para edad gestacional.

HIPOTESIS

La actividad quimiotáctica y microbicida de los PMNs de RNPEG se incrementa con el levamisol.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL HUMANO.

El estudio se realizo con 20 recién nacidos de término de ambos sexos. Se formaron dos grupos uno constituido por recién nacidos pequeños para edad gestacional y otro por recién nacidos con peso adecuado para edad gestacional.

CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS :

A. Recién nacidos pequeños para edad gestacional: Se incluyeron en este grupo recién nacidos hijos de madre con toxemia moderada, edad gestacional entre 37 y 40 semanas por fecha de última menstruación y valoración A de Capurro (63). Se excluyeron a recién nacidos de término con enfermedad respiratoria, infección intrauterina, malformación congénita o hipoxia. No se incluyeron a recién nacidos hijos de madre con diabetes, cardiopatía o infección.

B. Recién nacidos adecuados para edad gestacional.

Se incluyeron a recién nacidos hijos de madre sin antecedentes de infección, enfermedad sistémica que repercuta en el niño y edad gestacional entre las 37 y 40 semanas. Se excluyeron a los recién nacidos con desequilibrio metabólico como hipoglicemia o hipocalcemia manifestada clínicamente, dificultad respiratoria, infección o malformación congénita.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se obtuvieron 10 ml. de sangre procedente de vena umbilical placentaria de cada recién nacido al momento del nacimiento, previo consentimiento verbal y por escrito de la madre.

OBTENCION DE CELULAS POLIMORFONUCLEARES

Las células PMN fueron purificadas centrifugándose a 1500 rpm durante 40 minutos en un gradiente de densidad con Ficoll Hypaque ($d = 1.077$) y por sedimentación con dextran al 10 %, según la técnica descrita por Boyum. Los eritrocitos de las muestras fueron lisados con solución salina al 0.2 y 1.6 %, pH 7.2 en forma alterna y el sedimento obtenido se resuspendió en solución balanceada de Hank.

Viabilidad celular : La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de azul de Tripano, reportándose la viabilidad en porcentaje de células vivas (mínimo permisible 95 % de viabilidad).

Incubación con Levamisol : El levamisol fue obsequiado por los Laboratorios Jannssen de México, su pureza y características fueron revisadas por el laboratorio de manufactura mediante espectrofotometría (65). Al momento del ensayo, el levamisol fue diluido en solución salina al 0.9 % con de pH 7 y libre de pirogenos, y dividido en alícuotas de 4 diferentes concentraciones para obtener 0.5, 0.7, 70 μg /ml y 3.5 mg /ml. Los PMN fueron incubados con levamisol por 30 minutos (68).

METODO DE ACTIVIDAD MICROBICIDA :

Se realizó el método de Que previamente modificado por Forman (67-69), se utilizaron microplacas de 96 pozos (72), en cada pozo se colocaron 50 μ l de células a una concentración de 7×10^6 por mL previamente incubadas con diferentes concentraciones de levamisol, se les adicionó 20 μ l de *Mycobacterium avium* ajustado a una concentración de 1×10^8 de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro que previamente fue opsonizado con suero AB heterólogo, la placa fue incubada a 37° C durante 18 horas y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC= cada una de las bacterias capaces de producir una colonia de bacterias en alícuotas sembradas en agar soya Trypticase).

Los resultados fueron expresados en índices de actividad microbicida en función de la fórmula descrita por Sneiderg (73) :

$$\text{INDICE BACTERICIDA} = 1 - \left[\frac{\text{UFC con células}}{\text{UFC sin células}} \right] \times 100$$

METODO DE QUIMIOTAXIS :

Se empleo una microcámara de 48 pozos (figura 1) se colocó en la parte superior de ella 40 μ l de suero normal humano (SNH) activado previamente con Zymosano A. Se usó una membrana de nitrocelulosa con poros de 3 μ m de diametro, previamente humedecida en solución de Gay. En la parte superior de la cámara se colocaron en los pozos 70 μ l de células ajustadas a 2×10^6 de células por mililitro en solución balanceada de fosfatos (SBF) posteriormente se incubó la cámara a 37^o C durante 60 minutos. La membrana de nitrocelulosa se retiró de la cámara para fijarse con solución etanol agua al 1:1 y tefirla firmemente con hematoxilina y eosina(74).

La migración se cuantifico de acuerdo al método sugerido por Zigmond : Al observar en el microscopio de luz se localiza el sitio donde se encuentre el mayor número de células, posteriormente se recorre el botón micrométrico hasta encontrar el sitio donde existan por lo menos 3 células. La distancia recorrida es la cifra recorrida por el micrómetro(75).

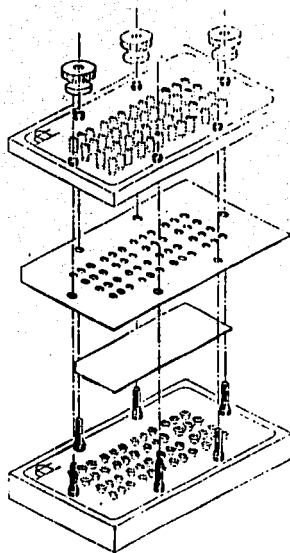


FIGURA 1. CAMARA DE BOYDEN

ANALISIS DE LOS RESULTADOS:

Tipo de diseño : Cuasiexperimental(74).

Es un modelo de investigación biomédica con células obtenidas de humanos, en el cual se realiza una maniobra por el investigador, se controlan las variables pero no interviene un sorteo aleatorio para la designación del grupo experimental.

Validez interna : Estas muestras son homogéneas ya que pertenecen a una población de recién nacidos de término, son diferentes únicamente por el peso de los recién nacidos al momento del nacimiento. Son comparables ya que ambas muestras poseen características semejantes como es especie y edad gestacional.

Variables y unidades de medición.

Variables independientes : Recién nacidos con peso adecuado para edad gestacional y recién nacidos pequeños para edad gestacional.

Variables dependientes :

1. Actividad microbicida: se define como una proporción que expresa la cantidad de UFC que fueron destruidas por el PMN.
2. Quimiotaxis : Variable continua que expresa en micrómetros, la distancia migrada por los PMN de los recién nacidos.

Técnicas de análisis estadístico :

Hipotesis de trabajo (Ho):

"El efecto del levamisol sobre la quimiotaxis y actividad microbicida de los polimorfonucleares de recién nacidos pequeños para su edad gestacional es semejante al efecto en polimorfonucleares de recién nacidos adecuados para su edad gestacional".

Para aceptar o rechazar la hipótesis de trabajo se utilizaron pruebas no paramétricas . Se realizaron comparaciones de contraste entre grupos e intergrupos y se utilizó pruebas no paramétricas para grupos dependientes y no dependientes ya que el número de recién nacidos fue menor de 15 sujetos y la cuantificación de las variables fueron mediante variables discretas. Además se realizaron comparaciones entre las diferentes dosis de levamisol por lo cual se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman, el criterio de validez se realizó con un intervalo confianza del 95%, el análisis intergrupar se realizó mediante la prueba no paramétrica de comparación de dos grupos dependientes " T de Wilcoxon " y la comparación entre ambos grupos de recién nacidos con U de Mann Whitney (75-77).

ASPECTOS ETICOS DE LA INVESTIGACION :

Se solicitó el consentimiento por escrito de los padres y autorización de los comités de ética y de investigación del Hospital Infantil de México " Federico Gomez " y Hospital de Gineco-Obstetricia No. 5 del Centro Médico " La Raza " .

RESULTADOS

CARACTERISTICAS DE LOS RECIEN NACIDOS:

En el grupo de recién nacidos eutróficos hubo 4 de sexo femenino y 6 del sexo masculino, el peso en promedio fue de 3117 ± 307 gr con edad gestacional promedio de 38.23 ± 1.1 semanas (Figuras 2 y 3).

En el grupo de recién nacidos pequeños para edad gestacional no hubo predominio en el sexo con una relación hombre-mujer 1:1, el peso promedio fue de 2240 ± 316 con una edad gestacional de 38 ± 10.8 semanas (Tabla 1).

EFFECTO DEL LEVAMISOL EN LA QUIMIOTAXIS DE PMN .

En estado basal, los polimorfonucleares de recién nacidos eutróficos, exhibieron una quimiotaxis de $34.8 \pm 3 \mu\text{m}$. La migración de los PMNs incubados con levamisol a concentraciones de 0.5., 0.7, 70 $\mu\text{g/ml}$ y 3.5 mg/ml fue de 38 ± 1.5 , 28 ± 1.0 , 29.4 ± 0.7 , $40 \pm 2.3 \mu\text{m}$ respectivamente, a las diferentes concentraciones no se observó diferencias ($p > 0.1$).

La quimiotaxis basal los PMN de los recién nacidos pequeños para su edad gestacional, fue de $22 \pm 1.4 \mu\text{m}$, cuando se incubaron con levamisol se observó una quimiotaxis de 28 ± 1.4 , 29 ± 0.9 , 27 ± 1.4 y $28 \pm 1.3 \mu\text{m}$ con las concentraciones de levamisol ya mencionadas, observandose diferencias ($p < 0.05$) entre células incubadas con levamisol respecto a células sin levamisol (figura 4).

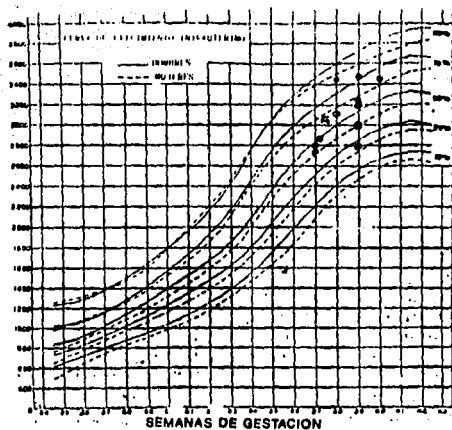


FIGURA 2. RECEN NACIDOS ADECUADOS PARA SU EDAD GESTACIONAL

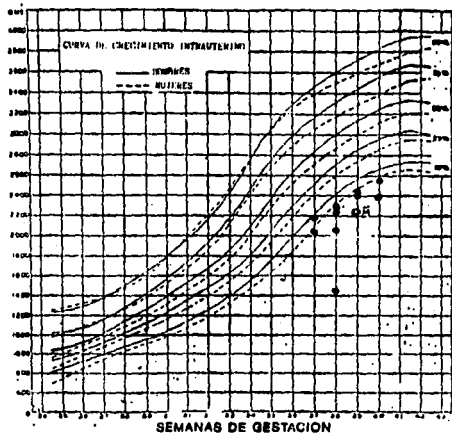


FIGURA 3. RECEN NACIDOS PEQUEROS PARA SU EDAD GESTACIONAL.

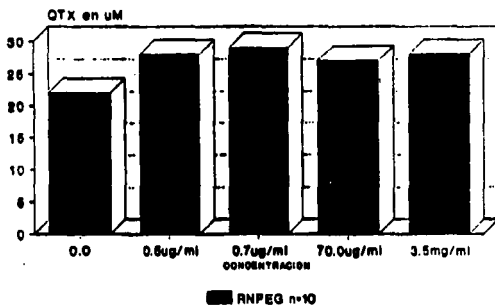
TABLA 1. CARACTERISTICAS DE LOS RECIEN NACIDOS

A. RECIEN NACIDOS ADECUADOS PARA EDAD GESTACIONAL.

PACIENTE	SEXO	PESO (gr.)	EDAD GESTACIONAL (semanas)
1	mas	3400	37
2	fem	2800	37
3	mas	2815	37
4	fem	3475	38
5	fem	3500	40
6	fem	2800	37
7	mas	3000	39
8	mas	3300	39
9	mas	2800	39
10	mas	3200	39

B. RECIEN NACIDOS PEQUEÑOS PARA EDAD GESTACIONAL

PACIENTE	SEXO	PESO (gr.)	EDAD GESTACIONAL (semanas)
1	fem	2175	38
2	fem	2100	37
3	fem	2400	39
4	mas	2800	40
5	fem	2350	39
6	fem	2440	39
7	mas	1440	38
8	mas	2200	37
9	mas	2300	38
10	mas	2400	40



RNPEG-Recién nacidos pequeños para su edad gestacional.

FIGURA 4. EFECTO DEL LEVAMISOL EN LA QUIMIOTAXIS DE RNPEG

En el grupo de recién nacidos eutróficos, al comparar la respuesta quimiotáctica entre el estado basal y las células tratadas con levamisol, no hubo diferencia estadísticamente significativa (Friedman, $p = 0.1$).

Cuando se comparó la distancia migrada de las células de recién nacidos pequeños para edad gestacional en estado basal y de las células incubadas con levamisol, se observó una mayor migración de las células tratadas esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

La quimiotaxis de los polimorfonucleares de recién nacidos pequeños para su edad gestacional fue menor que la de los recién nacidos eutróficos; esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.025$).

Al realizarse la comparación estadística de las células que fueron preincubadas con levamisol se observó que no hubo diferencia entre los dos grupos (figura 5).

ACTIVIDAD MICROBICIDA CONTRA *Planhylococcus aureus* :

La actividad microbicida de los PMNs de los recién nacidos eutróficos fue de $46 \pm 1.5\%$ y la de los PMNs de los recién nacidos pequeños para edad gestacional fue de 39 ± 2.0 . Esta diferencias entre la respuesta microbicida no fue significativa ($p > 0.1$).

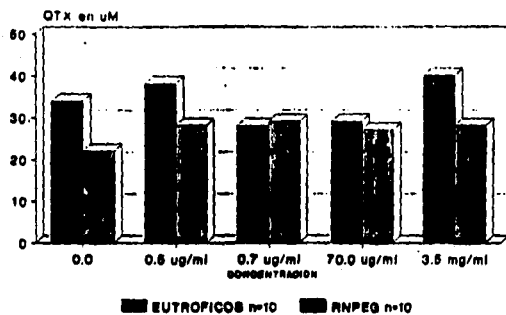


FIGURA 5 EFECTO DEL LEVAMISOL EN LA QUIMIOTAXIS

Cuando los PMNs se incubaron con levamisol a concentraciones de 0.5, 0.7, 70 $\mu\text{g/ml}$; 3.5 mg/ml , la actividad microbicide fue de 41 ± 3.1 , 39 ± 2.0 , 52 ± 3.3 y 20.4 ± 2.8 % en los PMNs de recién nacidos eutrofos, y de 36 ± 2.6 , 29 ± 2.3 , 46 ± 1.6 y 49 ± 2.4 % respectivamente en los PMNs de recién nacidos pequeños para su edad gestacional; aunque hubo diferencias, no fueron estadísticamente significativas (figura 6).

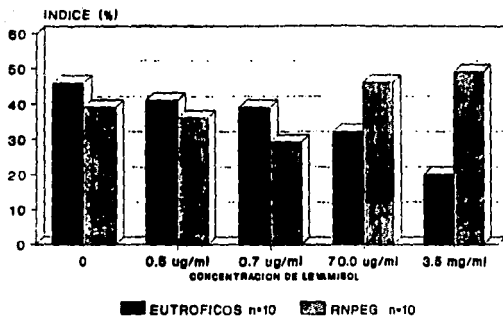


FIGURA 6. EFECTO DEL LEVAMISOL EN LA ACTIVIDAD MICROBICIDA

DISCUSION

El estado nutricional a través de la modulación que ejerce sobre las respuestas inmunitarias específicas e inespecíficas, parece ser un determinante primario de la susceptibilidad a las infecciones. La mayor parte de la morbilidad asociada con la desnutrición progresiva se debe a una infección que la complica. Existen datos clínicos y epidemiológicos que sugieren que la desnutrición progresiva aumenta la gravedad e incidencia de la infección, estudios realizados en Asia y Africa demostraron que el 30 al 65 % de los niños desnutridos que se hospitalizan, evolucionan con infección activa crónica y tienen una mortalidad hasta del 80% (78).

En los estudios en niños y adultos desnutridos, en donde se evalúan los mecanismos de respuesta a las infecciones se observa que existe disminución o ausencia de la hipersensibilidad cutánea retardada para responder a los antígenos microbianos habituales, disminución en el número de linfocitos timo dependientes, disminución de la capacidad bactericida de los neutrófilos, títulos bajos de anticuerpos secretorios IgA y disminución de la actividad y componentes del sistema del complemento (79).

El recién nacido pequeño para su edad gestacional representa la desnutrición fetal y es un trastorno secundario a múltiples factores maternos, fetales y placentarios. En nuestra población la toxemia representa por frecuencia la primera causa de desnutrición intrauterina y la tercera causa de morbi-morbilidad

neonatal (20,80). En los niños pequeños para su edad gestacional se ha observado que existe deficiencia en la inmunidad celular que puede persistir por mese y aún años, lo cual contribuye con una alta morbilidad.

Como en otros modelos de desnutrición, en el pequeño para su edad gestacional se observa una disminución en número y función de los linfocitos T y B, células NK, además de disminución en las cifras séricas de complemento e inmunoglobulinas (3,4,27).

Nosotros evaluamos la respuesta microbicida y quimiotáctica de PMNs de RNPEG y RNAEG. Se ha observado poca consistencia en los resultados de estudios reportados con anterioridad ya que algunos autores mencionan que no hay diferencias entre la respuesta microbicida de los neutrófilos de ambos grupos.

Forman estudió la actividad opsónica del suero, fagocitosis y destrucción intracelular de bacterias por neutrófilos procedentes de sangre de cordón de 19 niños de peso bajo al nacimiento y observó que la actividad opsónica frente a *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus* fué menor en los niños de peso bajo al nacimiento mientras que la fagocitosis y destrucción intracelular no se observaron diferencias significativas en ambos grupos (69). Sin embargo, en estudios semejantes se ha observado que la actividad microbicida del suero y de los polimorfonucleares de recién nacidos pequeños para edad gestacional es menor que en niños recién nacidos eutróficos (3,29). En nuestro estudio observamos que no existieron diferencias entre la actividad

microbicida en los PMNs de los RNPEG y los RNAEG.

La posible explicación en las diferencias es la capacidad de opsonización del suero utilizado en los estudios, ya que se ha demostrado que al utilizar suero autólogo de RNPEG disminuye la fagocitosis.

En otro estudio se observó que las células fagocíticas del recién nacido pequeño para edad gestacional tienen disminuida la actividad de la enzima glucosa-6--fosfato deshidrogenasa, la cual inicia la vía de las pentosas, de donde se obtienen radicales de oxígeno elementales para la destrucción intracelular de las sustancias extrañas como bacterias (81). Posiblemente los mecanismos bactericidas independientes de oxígeno compensan la deficiencia en el recién nacido pequeño para edad gestacional, para que su actividad microbicida sea semejante a la del recién nacido eutrófico .

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios *in vitro* en los cuales se evalúa la quimiotaxis de los PMNs de recién nacidos pequeños y adecuados para edad gestacional donde también se ha observado disminución en la migración de los PMNs de RNPEG.

Se han propuesto varios fármacos para mejorar la respuesta de las células fagocíticas incluyendo al levamisol que en ensayos clínicos y experimentales se ha demostrado que aumenta la respuesta fagocítica, mejorando la quimiotaxis, la reducción de NBT y la destrucción intracelular (82).

Estudios clínicos en recién nacidos donde se ha empleado el levamisol son muy alentadores ya que se ha observado que se estimula la respuesta cutánea tardía hacia PPD, cuando es aplicado por vía subcutánea, a la vez que disminuye la incidencia de infecciones piógenas en recién nacidos sometidos a intervenciones quirúrgicas abdominales, sin observarse efectos secundarios (83,84).

La dosis utilizada en los estudios *in vivo* varía en un rango de 2.5 ng a 200 mg/ml. Nosotros utilizamos 4 dosis para observar su efecto, 0.5, 0.7, 70 μ g y 3.5 mg. dado que 0.5 y 0.7 μ g corresponden a los niveles séricos del levamisol posterior a la administración de 2.5 mg/kg de peso (65, 85-88).

Al incubarse con levamisol a PMNs de recién nacidos pequeños para edad gestacional y a los PMNs de recién nacidos adecuados para edad gestacional se observó un aumento en la quimiotaxis de recién nacidos PEG, observándose mayor efecto al incubarse las células con 0.7 μ g/ml y se observaron diferencias significativas ($p < 0.025$) al compararse con las células incubadas con solución amortiguadora (gráfica 1 y 2). También se observó un incremento en la quimiotaxis de PMNs de RNAEG, pero sin significancia estadística (gráfica 2). La dosis empleada es la que se describe como los niveles séricos después de la administración de Levamisol a dosis de 2.5mg por kilogramo de peso .

No se presentó efecto en la capacidad microbicida de PMNs de RNPEG y RNAEG. Los PMNs de RNPEG aumentaron su respuesta

microbicida, pero esta no fue diferente a la de los PMNs incubados con solución amortiguadora. Los PMN de RNAEG presentaron una disminución en la respuesta microbicida pero no se observaron diferencias respecto al estado basal .

En concordancia con nuestros resultados, otros estudios realizados *in vitro* han demostrado que la quimiotaxis se estimula cuando se incuban las células PMNs con levamisol (50,65).

Modai y cols observaron que PMNs procedentes de pacientes urticarios, incubados con levamisol exhiben un incremento en la quimiotaxis y al igual que nuestros resultados, observaron que la quimiotaxis alcanzo un máximo estímulo y posterior a éste, disminuyó. Resultados semejantes reportaron Wright y cols, observando que PMNs procedentes de pacientes con Síndrome de Hiper-IgE aumentaron su quimiotaxis cuando se incubaron con levamisol a una dosis de 0.2 $\mu\text{g/ml}$. y disminuyó la quimiotaxis a concentraciones de 12 $\mu\text{g/ml}$ (65).

El efecto del levamisol sobre la quimiotaxis se ha observado que está relacionado con los niveles intracelulares de GMP, ya que el movimiento celular depende de las concentraciones intracelulares de GMPc y AMPc. La conversión de GTP a GDP realiza la función de proporcionar los iones fosfatos necesarios para la polimerización de tubulina y constituir los microtubulos, que son organelos necesarios para la migración y otras funciones celulares (89-90). El levamisol disminuye las concentraciones de AMPc e incrementa el GMPc aumentando a su vez muchas funciones, entre ellas la

quimiotaxis (48).

El levamisol se ha estudiado anteriormente en otro modelo de desnutrición. Chandra observó que la respuesta linfoproliferativa de los linfocitos T procedentes de niños desnutridos y a los cuales se les administró levamisol no se observó incremento en la linfoproliferación (91).

Nuestros resultados señalan que el levamisol incrementa la fagocitosis y la quimiotaxis, aunque el incremento en la fagocitosis no fué diferente de la respuesta sin levamisol.

Realizando un análisis del efecto del levamisol en varias de las funciones fagocíticas y las características del levamisol como inmunomodulador, el levamisol puede servir en la inmunoterapia del recién nacido pequeño para edad gestacional ya que no tiene efecto sobre las células fagocíticas además de que puede actuar como hormona tímica induciendo la maduración de células T. Así mismo se ha demostrado que en neonatos a los cuales se les ha administrado por vía subcutánea no han presentado efectos secundarios y se conoce que el levamisol no induce rupturas cromosómicas (92).

Concluyendo : El recién nacido pequeño para edad gestacional presenta una capacidad microbicida semejante a la del recién nacido eutrófico, pero tiene disminuida la capacidad de migración de los leucocitos polimorfonucleares, este defecto se estimuló *in vitro* mediante la incubación de los PMNs con levamisol a una concentración de $0.7\mu\text{g/ml}$.

BIBLIOGRAFIA

1. Fanaroff A. Infecciones perinatales adquiridas. En : Fanaroff A, Martin R, Merkatz IR, Behrman . Enfermedades del feto y del recién nacido perinatología y neonatología Ed. Medica Panamericana . Buenos Aires Argentina 1985: 784-814.
2. Fanaroff AA. Asistencia antenatal e intraparto del infante de alto riesgo. En : Klaus MH, Fanaroff AA: Asistencia del recién nacido de alto riesgo . Ed. Panamericana , Buenos Aires Argentina 1980 pp 28
3. Chandra R K. Fetal malnutrition and postnatal immunocompetence. Am J Dis Child 1975; 129:450.
4. Ferguson A. Prolonged impairment a cellular immunity in children with intrauterine growth retardation . J Pediatr 1978; 93 : 53.
5. Saha IK, Srivastava G, Chaudhury DS. A six-months follow-up study of growth, morbidity and functional immunity in low birth weight neonates with special reference to intrauterine growth retardation in small-for-gestational age infants. J Trop Pediatr 1983, 29 : 278-382.
6. Ahmad P, Ahmad KN. Serum IgG levels in full-term preterm and SFD neonates. Indian J Pediatr 1986; 53: 405-408.
7. Sasidharan P. Postnatal IgG levels in very-low-birth infants. Clin Pediatr 1988; 27 : 271-274.
8. Ballow M, Lynn-Lates K, Rowe JL, Goets C, Desbonnet C. Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500 g) Premature infants: Concentrations of plasma immunoglobulins and patterns of infection. Pediatr Res 1986; 20 :

895-904.

9. Cairo MS . Review of G-CSF and GM-CSF Effects on neonatal neutrophil kinetics. AmJ Pediat Hematol/Oncol. 1989; 11 :238.

10. Hill H, Shiozoka A, Gonzalez LA, Christensen RD . Intravenous immunoglobulin use in newborns. J Allergy Clin Immunol 1989; 84: 617-24

11. Stiehm RE . Human Gammaglobulins as therapeutic agents. Adv Pediatr 1988 ; 35: 1-72.

12. Kliegman MR, Clapp WD, Berger M. Targeted immunoglobulin therapy for the prevention of neonatal infections. Rev Inf Dis 1990; 12 : 8443-45o.

13. Tufts (thr-Lys-Pro-Arg) a natural modulator of macrophage activity : further studies .Mol Cell Biochem 1984, 63:137.

14. Symoens J, Rosenthal M. Levamisole in the modulation of the immune the current experimental and clinical state. J Reticuloendotelial Soc 1977; 21: 175-225.

15. Lubchenco L. Classification of high risk infants by birth weight and gestational age. On overview. Lubchenco L. Major Problems in clinical pediatrics 14. Pennsylvania USA 1976 pp 1-8.

16. Dunn P. The search for perinatal definitions and standards. Act Paediatr Scand(Suppl) 1989; 319: 7-16.

17. Resnik R. Maternal Diseases associated with abnormal fetal growth. J Redroduc Med 1978; 21:315-318

18. Cassidy G. The small for date infant En Avery GB. Neonatology pathophysiology and management of ne-born Lippincott Company Pennsylvania USA 1981: 262-28o.

19. Gomez GM, Cruz SJ, Jimenez BE, Todon SH. Recien nacido bajo de

madre toxémica (fetopatía toxémica) Bol Med Hosp Infant (Mex) 1985; 42 : 279-287.

20. Yoshida -Ando P, Mendoza -Perez A. Estudios sobre recién nacidos de peso subnormal I. Etiología. Gac Med Mex 1982;118: 101-104.

21. Kramer MS. Determinants of low birth weight. Methodological assessment and meta-analysis. Bull WHO; 65 : 663-737.

22. Stein S, Susser M, Rush D. Prenatal nutrition and birth weight experiments in the past decade. J Rep Med 1978 ;21: 28

23. Naeye RL. Abnormalities in infants of mothers with toxemia of pregnancy . Am J Obstet Gynecol 1966; 95 : 296.

24. Baker CJ, Rensch MA, Noya FJ, García -Prats JA. Role of intravenous immunoglobulin in prevention of late-onset infection in low birth weight neonates . Rev. Infect Dis 1990; 12(Suppl): 5463-5469.

25 Gershwin ME, Beach RS, Hurley LS. Malnutrition and infectious disease: Studies from the field . En : Gershwin ME, Beach RS, Hurley LS. Nutrition and Immunity. Hurley, Orlando USA 1985;60 :98

26. Madden NP, Levinsky RJ, Bayston R, Harvey B, Turner MW, Spitz L. Surgery, Sepsis and Non-specific immune function in neonates. J Pediatr Surgery 1989; 24 : 562-566.

27. Martínez-Cairo CS, Carmona BP, Cruz BJ. Actividad del factor tímico sérico en recién nacidos desnutridos . Arch Invest Med (Mex) 1985; 16 : 199-207.

28. Martínez-Cairo CS, Lopez RM, Alanís CF, Cruz BJ, Muñoz HQ. Linfocitos T y B en sangre periférica del recién nacido desnutrido in utero. Bol Med Hosp Infant (Mex) 1977 ; 34 : 393-397.

29. Xanthou M. Immunologic deficiencies in small-gates neonates. *Acta Paediatr Scand* 1985; 319(Suppl): 143-149.
30. Harris MC, Douglas SD, Lee JC, Ziegler MM, Gerdes JS, Folin RA. Diminished polymorphonuclear leucocyte adherence and chemotaxis following protein-calorie malnutrition in newborn rats. *Pediatr Res* 1987; 21: 541-546.
31. Cairo SM. Neutrophil transfusions in treatment of neonatal sepsis. *Am J Pediatr Hematol/Oncol* 1989; 11: 227
32. Johnston RB. Resistance to infection: prospects for therapeutic manipulation. *Pediatr* 1990; 27(Suppl): 544-548.
33. Thienpont D, Brugmans J, Abadi K, Tanamal S. Tetramisole in the treatment of nematode infections in man. *Am J Trop Med* 1969; 18 : 520-525.
34. Willoughby DA, Wood C. The history and development of levamisole. *Forum on Immunotherapy. Royal Society of Medicine* 1977; 1 : 3-11.
35. Adams JG: Pharmacokinetics of levamisole. *J Rheumatol* 5(Suppl4) 1978: 137-142.
36. Asquith P. The clinical use levamisole- a critical review. In : Thompson RA : *Recent advances in clinical Immunology No 2 Recent advances in clinical immunology Churchill Livingstone New York USA* 1980: 341-360.
37. Amery WK. The dosage regimen of levamisole in Cancer : Is it related to efficacy and safety? *Int J immunopharmacol* 1983 : 5 : 1-9.
38. Watson ADJ. Levamisole in infections disease a Review of the Literature. *J Rheumatol* 1978 5 (Suppl4) : 115-121.

39. Martindale W. : Pharmacopoeia A Wade (ed) 27th ed. Pharmacoeutical Press London 104-105.
40. Young E, Mc Millan K. Effects of levamisole in murine brucellosis. *J Infect Dis* 1987; 156 : 539-541.
41. Fischer GW, Di VT, Kelley J, Fogored JK, Bass JW, Wagner FS, Gordon BL. Enhancement of host defense mechanisms against gram positive pyogenic coccal infections with levo-tetramisole (levamisole) in neonatal rats . *Ann Allergy* 1974; 33:193-197.
42. Amery WK, Gough DA : Levamisole and Immunotherapy . Some theoretic and practical considerations and their relevance to human disease. *Oncology* 1981; 38 : 168-181.
43. Dayal R, Prassal R, Mathur P, Sharmen R, Elhence BR, Singh K. Effect of levamisole on T cell in minimal change nephrotic syndrome . *Indian Pediatr* 1988; 25: 1184-87.
44. Scheinberg MA, Santos L, Mendes NF, Musaiti C . Decreased lymphocyte response to PHA, Con-A and Calcium ionophore(A23187) In patients with RA and SLE and reversal with levamisole in rheumatoid arthritis . *Arthritis Rheum* 1978; 21: 326-329.
45. Whitcomb JM, Merluzzi V, Cooperband SR. The effect of Levamisole on Human Lymphocyte mediator production *in vitro* . *Cell Immunol* 1976; 218: 272-277.
46. Redondo JM, Lopez-Guerrero JA, Fresno M. Potentiation of interleukin-2 activity by levamisole and imidazole. *Immunol Lett* (1986/1987); 14 : 111-116.
47. Kimball ES, Clark MC, Sheieder W, Persico Fu. Enhancement of *in vitro* lipopolisaccharide-stimulated interleukin-1 production by levamisole. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 58: 385-396.

48. Anderson R, Glover A, Koornhof J, Rabson A. *In vitro* stimulation of neutrophil motility by levamisole. Maintenance of cGMP levels in chemotactically stimulated levamisole-treated neutrophils. *J Immunol* 1976; 117 : 428-432.
49. Rabson AR, Anderson R, Glover J. Defective neutrophil movement *in vitro* and *in vivo* effects of levamisole (abstract). *Ann Allergy* 1977 38: 308.
50. Modai D, Weissgarten J, Zoff R, Peller S, Averburn Z, Kaufman S, Shaked V, Cohen N, Tieder M. Effect of Levamisole on Chemotaxis of Granulocytes from uremic patients. *Nephron* 1988; 49 : 237-239.
51. Schmidt ME, Douglas SV. Effects of levamisole on human monocyte function and immunoprotein receptors. *Clin Immunol Immunopathol* 1976; 6: 299-306.
52. Renoux M., Arcadi D. Levamisole promotes the killing of *Listeria monocytogenes* by macrophages. *Fed Proc* 1976; 35 : 336
53. Oliveira Lima A, Javierre MO, Dias da Silva W, Setle CD. Immunological phagocytosis effect of drugs on phosphodiesterase activity. *Experientia* 1974; 30: 945-46.
54. Wynne KM, Dieppe PA, Huskisson EC. Levamisole and phagocytosis in rheumatoid arthritis. *AnnRheum* 1980 : 40 : 382-7.
55. Bravo-Cuellar A, Ramos-Damian M, Gomez-Estrada H. Estimulacion fagocitica de los macrofagos pulmonares de rata con levamisole. *Arch Invest Med (Mex)* 1981; 12: 443-448.
56. Vazquez Escobosa C, Gomez-Estrada H. Aumento de la actividad fagocitica de los polimorfonucleares humanos con levamisole. *Arch Invest Med (Mex)* 1981; 12: 449-456.
- 57 Huskisson EC, Dieppe PA, Scott J, Trapnell J, Balme RW.

Willoughby DA . Immunostimulant therapy with levamisole for rheumatoid arthritis. Lancet 1976 ; 1 : 393-395

57. Whitcomb ME, Merluzzi V, Cooperband SR. The effect of levamisole on Human Lymphocyte mediator production in vitro . Cell Immunol 1976; 218: 272-277.

58. Dayal R, Prassal R, Mathur P, Sharmen R, Elhence BR, Singh K . Effect of levamisole on T cell in minimal change nephrotic syndrome. Indian Peditr 1988; 25 : 1184-87.

59. Kimball ES, Clark MC, ScheiederCR, Persico FJ. Enhancement of *in vitro* lipopolisaccharide-stimulated interleukin-1 production by levamisole. Clin Immunol Immunopathol 1991; 58 : 385-398.

60. Ruzsala-Mallon V, Lin Y, Durr F, Shang B: Low molecular weight immunopotentiators . Int J Immunopharmacol 1988 ; 10 : 497-510.

61. Fischer GW, Crumrine MH, Balk MW, Chang SP, Hokama Y: Levamisole a synthetic agent with thymosin like activity (abstract). Peditr Res 1976; 10: 386.

62. Goldstein G: Mode of action of levamisole . J Rheumatol 1978 ; 5 (Suppl 4) : 143-138.

63. Capurro H, Konichenky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia RA. Simplified method for diagnosis of age in the newborn. J Peditr 1978; 93: 120-123.

64. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow Scand J Clin Lab Invest 1968; 21 (Suppl): 77-89.

65. Wrioth D, Kirkpatrick C, Calvin J. Effects of levamisole on normal and abnormal leukocyte locomotion . J Clin Invest 1977; 59: 741-50.

66 Thompson JS, Herbick JM, Klassen LW, Severson CD, Overlin VL.

- Blaschke JW, Silverman MA, Vogel LL. Studies on levamisole-induced a granulocytosis. *Blood* 1980; 56 : 388-396.
67. Rajkovic IA, Williams R. rapid microassay of phagocytosis bacterial killing, superoxide and hydrogen peroxide production by human neutrophils *in vitro* *J Immunol Methods* 1985; 75 :35-47.
68. Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA. *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes : diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood . *J Clin Invest* 1967; 46 :668-76.
69. Forman ML, Stiehm ER. Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low-birth-weight infants . *New Engl J Med* 1969; 281:926-31.
70. Mancilla RJ, Nurko SS, Castellanos CC, Santos FJI. Efectividad terapéutica de inmunoglobulina intravenosa pH 4.25 en sepsis neonatal experimental por *Xlebsiella pneumoniae*. *Bol Med Hosp Infan Mex* 1989; 46 :89-93.
71. Sneiderg RT, Lambert LH, Remington JS. Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. *J Clin Invest* 1974; 53:131-37
72. Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ. A 48 well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration . *J Immunol Methods* 1980 ; 33: 239-247.
73. Zigmond SH, Hirsh JG. Leukocyte locomotion and chemotaxis. *JExp Med* 1973; 1137: 387 -410.
74. Bailar JC, Louis TA, Lavarí PW, Polansky M. A classification for biomedical research reports. *N Engl J Med* 1964; 311: 1482-7.
75. Daniel WW, Estadísticas no paramétrica y de libre distribución.

En : Daniel WW. Bioestadística . Base para el análisis de las ciencias de la salud . Ed. Limusa Mexico 1988 pp:503-557.

76. Downie NM. Pruebas estadísticas libres de distribución . En : Downie NM, Meath RW. Methods estadísticos aplicados. Editorial Harla Mexico 1986 pp 143-154.

77. Siegel S. El caso de dos muestras independientes . En Siegel S. Estadística no paramétrica . Ed. Trillas Mexico 1986 pp 143-154.

78. Morehead CP, Morehead M, Allen DM. Bacterial infections in malnourished children . Env Child Health 1974; 20:141.

79. Puri S, Chandra RK. Regulación nutricional de de la resistencia del huésped y valor predictivo de las pruebas inmunológicas en la evaluación del resultado final. Clin Pediatr Nort Am . 1985; 2: 529-547.

80. Chandra RK . Desnutrición fetal En : Inmunología de los trastornos nutricionales. Ed Manual Moderno Mexico 1982 pp 66-75.

81. Hernández D, Frenk S, Velasco-Candano L, Urrusti J, Yoshida P, Bernal-Torres A, Rosado A. Retraso intrauterino del crecimiento en el hombre. Reacción metabólica de los leucocitos a la fagocitosis. Arch Invest Med 1980; 11: 175-186.

82. Krause PJ, Herson VC, Eisenfeld L, Johnson GM. Enhancement of neutrophil function for treatment of neonatal infections. Pediatr Infect Dis J 1989; 32: 382-389.

83. Nkanginieme K, Ibe BC, O Konkwo PO, Azubuike JC, The immunostimulating effect of levamisole on BCG Conversion in Newborn Children . East Afr Med J 1986; 65 : 743-752.

84. Samsygin SA, Dolgino EN, Arian VI, Romana LA, Schevchikina GI. Immunomodulators in the complex therapy of newborn infants with

- suppurative surgical infections. Khirurgiia (Mosk) 1988; 2: 101-6.
85. Al-Ibrahim M, Holzman R. Concentrations of levamisole required for enhanced proliferation of human lymphocyte and phagocytosis. J Infect Dis 1977; 135: 517-523.
86. Mahmood T, Robinson W. Effect of Levamisole on human granulopoiesis in vitro (39936) Proc Soc Exp Biol Med 1977; 156: 359-364.
87. Repine J, Douglas S. Effect of Levamisole on morphology, bactericidal activity, and metabolism of human neutrophils in vitro (39972) Proc Soc Exp Biol Med 1977; 156: 527-530.
88. Hadden JW, Coffey RG, Hadden EM, Lopez Corrales E, Sunshine S. Effects of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and Cyclic Nucleotide levels Cell Immunol 1975; 20: 98-105.
89. Zurier RB, Weissmann G, Hoffstein S, Kammerman S, Tai H. Mechanism of Lysosomal Enzyme Release from Human Leucocytes II Effects of cAMP and cGMP, autonomic agonists and agents which affect microtubule function. J Clin Invest 1974; 53: 297-309.
90. Sandoval I, Cuatrecasas P. Microtúbulos y función celular. Investigación y Ciencia 1978; 17: 6-14.
91. Chandrashekar J, Chandra RK. Levamisole. A review and some observations on its effects on immunocompetence in protein-energy malnutrition and old age. Indian J Pediatr 1977; 46: 147.
92. Vazquez Escoboca C, Gómez-Estrada C. El levamisol no produce fracturas cromosómicas Arch Invest Med (Mex) 1981; 12:173-178.