

S
des.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFECTO DEL INMUNOMODULADOR LEVAMISOL SOBRE LA CICATRIZACION OSEA.

Tesis Presentada ante la División de estudios Profesionales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Por

BENJAMIN ALARCON ROMAN

ASESORES: MVZ. Francisco Javier Basurto A.
MVZ, DES-P. Norma Leticia Calderón Apodaca
MVZ. Eduardo Félix Tena Betancourt.

FALLA DE ORIGEN

MEXICO D.F.

DICIEMBRE 1996





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.

DEDICATORIA

A Dios : por estar conmigo siempre, cuidarme y guiarme.

A mis padres: Manuel Alarcón y Natividad Román por darme la vida y así poder descubrir lo bello e importante que es realizar un papel digno y responsable en la misma.

A Eva y Carmelo: Porque siempre me han apoyado e impulsado para poder salir adelante, por confiar en mí dándome la oportunidad de superarme no importándoles sacrificar algo de ellos, siendo para mí un gran ejemplo de bondad, humildad y grandeza. Por siempre para ustedes.

A César, Nataly y Víctor: Siempre pensando en ustedes , esperando sembrar en su persona ambición de superación, deseos de triunfar y muchas ganas de vivir, les dedicó ésta obra con mucho cariño deseoso de que algún día lleguen a la cumbre más alta; los quiero mucho.

A mis hermanos: Raymundo y Javier, que siempre han estado conmigo en momentos difíciles pero siempre unidos. Porque siempre han creído en mí y me han ayudado a cumplir mis metas, por vivir conmigo tantos momentos gratos que siempre llevo en lo más profundo de mi corazón.

A Penélope: A ti que has llenado mi vida de amor y cariño, que éstas conmigo en todo momento por desagradable que sea, a ti que me has enseñado a amar, a reconocer mis errores y festejar mis triunfos. Porque eres lo más valioso que tengo en la vida y todo lo que hago lo hago por ti, esperando algún día tener alguien

que siga nuestro ejemplo, que sea mi mano diestra y toda su vida de la muestra.
Porque te amo y siempre te amaré.

A mi tía Cristina: A usted que siempre ha sido un ejemplo de fortaleza y dedicación, por saber escuchar , comprender y aconsejar, la quiero mucho.

A toda la familia Román Nava: porque todos ustedes han inspirado en mi el deseo de superación constante.

Al Sr. Raúl Ramírez y familia por su apoyo y confianza que depositaron en mi.

A todos mis "cuates" de la Universidad: José Luis, Martín, Armando, Julio, Israel, Efraín Ismael, Leticia Murcio, Leticia "La gütera" Velázquez , Miriam, Abigail, Yazmín, Luis, Francisco "El Coruco" Narváez, Aldo, Dr. Francisco Martínez Garibay, Virginia, Teresa y todos aquellos que convivieron conmigo la vida estudiantil).

A mis amigos de la infancia: Ramiro, Gustavo, Jorge Escalera, Ignacio, Hugo, toda la familia Ponce, y todos aquellos que han convivido conmigo durante todos estos años.

A mis compañeros de trabajo en la secundaria, muy en especial al Prof. Anselmo Lara, profa. Martha Calderón y Teresa Plata.

A todos aquellos que han estado en mi vida y que ahora por el momento no los recuerdo.

A ti que te dignas a leer este humilde trabajo.

A aquellas personas que de alguna forma gritan, presumen y creen vivir en la opulencia , que se sienten superiores y son prepotentes no importándoles que al hacerlo dañen sentimientos de seres que sean o no allegados a ellos. Desgraciadamente son seres humanos y afortunadamente no son un ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al doctor Francisco Basurto por la dedicación y paciencia que ha tenido para que pudiera concluir el presente trabajo, por ser mi profesor y por ser mi amigo. Es un ejemplo a seguir.

Agradezco a la doctora Norma L. Calderón por su colaboración y apoyo en la elaboración de este trabajo.

A los MVZs. Eduardo Tena B., Enrique García F. , Rubén Alducin G., Consuelo Ramírez y todo el personal del bioterio de la jefatura de Control de Calidad del IMSS.

A los departamentos de Patología y Microbiología e Inmunología de la FMVZ así como al bioterio de la jefatura de Control de Calidad del IMSS, por haberme permitido realizar este trabajo dentro de sus instalaciones.

Muy en especial agradezco a: Dr. Roberto Cervantes O., Dr. Luis Ocampo C., MVZ. Sergio Rosas, MVZ José Luis Mejía, PMVZ. Fco. Narvaez O. PMVZ. Armando Alcalá, Sra. Ernestina Orta y el Tec. Eduardo Miranda López quienes sin su colaboración no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a la doctora Aurora Velázquez por su apoyo en la traducción de artículos y a la doctora Laura Patricia Noé por sus acertados comentarios en la elaboración escrita del presente trabajo.

De igual forma agradezco a mis sinodales de mi examen profesional

MVZ. Alfredo Cortés Arcos.

MVZ. Isidro Castro Mendoza.

MVZ. Luis Ocampo Camberos.

MVZ. Francisco J. Basurto Alcántara

MVZ. Gabriela Calzada Nova

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. A todos mis profesores que formaron parte en mi vida profesional.

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN-----	1
INTRODUCCIÓN-----	2
MATERIAL Y MÉTODOS-----	12
RESULTADOS-----	14
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES-----	17
LITERATURA CITADA-----	19

RESUMEN

ALARCÓN ROMAN BENJAMIN. Efecto del inmunomodulador levamisol sobre la cicatrización ósea. (Bajo la dirección de los MVZ. **Francisco Javier Basurto Alcántara, DESP-P Norma Leticia Calderón Apodaca y Eduardo Félix Tena Betancourt**).

Con la finalidad de evaluar el efecto del levamisol sobre la cicatrización de fracturas se utilizaron 20 conejos hembras de 2 meses de edad y dos kilogramos de peso, a los cuales se les produjo una fractura quirúrgica en la costilla derecha número 10. Se dividieron en 4 lotes identificados según el tratamiento aplicado: I.- Antibiótico (Penicilina benzatínica, a dosis de 30,000 U.I./kg de peso), II.- Control absoluto negativo (sin medicamentos). III.- Levamisol (5 mg/kg de peso), IV.- Levamisol + antibiótico (dosis marcadas en los lotes I y III). A los 30 días se sacrificaron los animales mediante una sobredosis de anestesia (Pentobarbital sódico), para extraer la costilla afectada; se realizaron mediciones de los callos óseos, se hizo un estudio radiológico e histopatológico. Los resultados mostraron que sólo hubo diferencias significativas en el estudio histopatológico concerniente a la presencia de necrosis donde se observó que el lote III con levamisol manifestó una ausencia total de células necrosadas. En conclusión se considera que no se puede definir totalmente si el levamisol es útil en el tratamiento de fracturas por lo que se propone continuar el proyecto haciendo unas modificaciones tales como: 1.- Aumentar el tamaño de la muestra, 2.- Realizar fracturas en huesos largos tales como el peroné o fémur utilizando una osteosíntesis, 3.- Evaluar la fijación de calcio en los callos óseos utilizando tetraciclinas u otro indicador de calcio en la matriz ósea, 4.- Evaluar la fosfatasa alcalina de los osteoclastos por medio de pruebas inmunohistoquímicas.

INTRODUCCIÓN

Hay dos mecanismos de crecimiento óseo. En uno de ellos, los huesos largos crecen longitudinalmente en el cartilago de la epífisis, en el lugar en el que éstas están separadas de la diáfisis. Este crecimiento produce el depósito de cartilago nuevo, seguida por la conversión de éste en hueso neoformado, alargando la diáfisis y empujando la epífisis hacia los extremos, a la vez que el cartilago epifisiario es utilizado progresivamente; de forma que en la adolescencia no hay suficiente cartilago epifisiario como para proporcionar un crecimiento adicional. En éste momento se suelta la diáfisis y las epífisis, de forma que el hueso no sigue aumentando de longitud; la hormona del crecimiento estimula todos los mecanismos de crecimiento de cartilago en los huesos largos. Sin embargo, una vez que se han soldado las epífisis y las diáfisis, pierde su capacidad para alargar los huesos. En el segundo mecanismo de crecimiento óseo, los osteoblastos que se encuentran en el periostio y en algunas cavidades del hueso, depositan hueso de nueva formación en la superficie del viejo. Simultáneamente los osteoclastos destruyen el hueso antiguo. Cuando el ritmo de depósito es superior al de reabsorción aumenta el grosor óseo. La hormona del crecimiento aumenta de forma muy significativa a los osteoblastos, así pues los huesos pueden estar aumentando su tamaño a lo largo de toda la vida, bajo la influencia de esta hormona, lo que es especialmente importante en los huesos membranosos ⁵.

Después de producirse una fractura, sufren daño tanto el hueso como los tejidos blandos circundantes. A causa de la angiorexis intra y extra ósea se forma un hematoma dentro y alrededor de la fractura. Los osteocitos de los extremos rotos son privados de la nutrición normal y mueren dependiendo de la cantidad de trauma asociado a la fractura, el periostio y tejidos blandos vecinos, también contendrán material necrótico. La presencia de necrosis evoca una respuesta

INTRODUCCIÓN

Hay dos mecanismos de crecimiento óseo. En uno de ellos, los huesos largos crecen longitudinalmente en el cartílago de la epífisis, en el lugar en el que éstas están separadas de la diáfisis. Este crecimiento produce el depósito de cartílago nuevo, seguida por la conversión de éste en hueso neoformado, alargando la diáfisis y empujando la epífisis hacia los extremos, a la vez que el cartílago epifisiario es utilizado progresivamente; de forma que en la adolescencia no hay suficiente cartílago epifisiario como para proporcionar un crecimiento adicional. En éste momento se suelta la diáfisis y las epífisis, de forma que el hueso no sigue aumentando de longitud; la hormona del crecimiento estimula todos los mecanismos de crecimiento de cartílago en los huesos largos. Sin embargo, una vez que se han soldado las epífisis y las diáfisis, pierde su capacidad para alargar los huesos. En el segundo mecanismo de crecimiento óseo, los osteoblastos que se encuentran en el periostio y en algunas cavidades del hueso, depositan hueso de nueva formación en la superficie del viejo. Simultáneamente los osteoclastos destruyen el hueso antiguo. Cuando el ritmo de depósito es superior al de reabsorción aumenta el grosor óseo. La hormona del crecimiento aumenta de forma muy significativa a los osteoblastos, así pues los huesos pueden estar aumentando su tamaño a lo largo de toda la vida, bajo la influencia de esta hormona, lo que es especialmente importante en los huesos membranosos ⁵.

Después de producirse una fractura, sufren daño tanto el hueso como los tejidos blandos circundantes. A causa de la angiorexis intra y extra ósea se forma un hematoma dentro y alrededor de la fractura. Los osteocitos de los extremos rotos son privados de la nutrición normal y mueren dependiendo de la cantidad de trauma asociado a la fractura, el periostio y tejidos blandos vecinos, también contendrán material necrótico. La presencia de necrosis evoca una respuesta

inflamatoria aguda, rápida e intensa. Las células inflamatorias agudas migran hasta la región, estas células son principalmente leucocitos polimorfonucleares y macrófagos alterados. Luego de la fase inflamatoria procede la reparación activándose al máximo todos los osteoblastos del periostio e intraóseos incluidos en la lesión. Casi de inmediato se forman muchos osteoblastos y condroblastos a partir de las células llamadas osteoprogenitoras, que son células madre ósea. Por tanto en breve plazo se desarrolla una masa voluminosa de tejido osteoblástico, condroblástico y matriz ósea orgánica nueva, seguida por el depósito de sales de calcio entre los dos extremos rotos del hueso^{5, 13, 7, 2}.

Existen 3 células principales en la reparación ósea que son los osteoblastos, los osteoclastos y los osteocitos. Estas células son similares a las identificadas en la formación del cartilago. En su desarrollo, un osteocito es en esencia un osteoblasto que a quedado rodeado de matriz ósea¹².

Los osteocitos son células susceptibles a la osteólisis, proceso fisiológico en el cual hay una reabsorción de calcio de la célula y que esta dado por factores como el de la hormona paratiroidea o por procesos fagocítico enzimáticos de los osteoclastos que son células gigantes fagocíticas del hueso⁵.

Los mecanismos de respuesta inmune son integrados por linfocitos, macrófagos, polimorfonucleares o granulocitos. Su participación es fundamental en los procesos inmunológicos^{14, 10, 16}.

La actividad de estas células es regulada por sustancias endógenas como las linfocinas, glucocorticoides, esteroides sexuales, hormonas tiroideas, etc., o también pueden ser influidas por sustancias exógenas como los lipopolisacáridos bacterianos, exotoxinas bacterianas, azúcares de hongos como el zymozan, proteínas virales, etc.^{14, 10}.

Actualmente se han encontrado linfocitos T cooperadores con el marcador CD4 y CD8; también se han encontrado diversidad en las linfocinas que secretan por lo que se les ha identificado con las variantes 0,1y2^{10,6}.

Una vez que el monocito se aloja en un tejido se convierte en macrófago y recibe el nombre dependiendo del órgano donde resida por ejemplo células de Küpffer en hígado, células mesangiales en riñón entre otros^{14,16}.

Asimismo un macrófago puede actuar como célula presentadora de antígenos (CPA).

El linfocito T cooperador, como ya se menciona se divide en subgrupos identificados con los grupos 1y2, y su diferencia radica en el tipo de citocinas que liberan, donde tenemos que el subgrupo 1 produce la interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), interferón gamma (IFN) y factor de necrosis tumoral (TNF), mientras que el subgrupo 2 libera IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, las cuales van asociadas con la promoción de síntesis de proteínas en la producción de anticuerpos; por otro lado tenemos que ambos subgrupos de linfocitos producen el TNF y factores de colonización^{6,14,10,16}.

Existe la hipótesis de la existencia de un precursor para ambos subgrupos el cual se ha identificado con el número 0 y que produce todas las variedades de citocinas^{10,6}.

La CPA produce IL-1 la cual genera la activación de los linfocitos T y B, también estimula al hipotálamo para la producción del factor liberador de las corticotropinas para promover la liberación de ACTH, que inducirá la liberación de glucocorticoides en la corteza adrenal; por otro lado esta citocina puede actuar

sobre los centros termoreguladores en el hipotálamo promoviendo fiebre, induce la producción de endorfinas causando sedación y sueño ^{14,10,16}.

La CPA puede producir otras interleucinas que modifican la actividad de los linfocitos, tal es el caso de la IL-4, IL-6 e IL-8 siendo esta última un poderoso factor quimiotáctico para granulocitos. ^{14,10,16}

La CPA responde a los estímulos del interferón gamma, el cual ha demostrado ser una de las citocinas más activas e importantes para el sistema inmune; se descubrió por sus actividades antivirales de donde recibió el nombre de interferón por interferir con la replicación viral al estimular la síntesis de una proteína que inhibe la transcripción de ARN mensajero viral, posteriormente se encontraron variantes bioquímicas de la molécula a las cuales se les asoció con otras propiedades, una de ellas es la activación de macrófagos que consiste en potencializar su acción fagocítica, incrementando el número de lisosomas, la calidad de las enzimas lisosomales, estimula el metabolismo oxidativo en monocitos y macrófagos, lo que ha sido un factor fundamental en la eliminación total de parásitos intracelulares como las listerias; induce la expresión de MHC-II en todas las células presentadoras de antígeno; promueve la formación de receptores membranales para la porción Fc de las inmunoglobulinas, incrementando con esto la actividad fagocítica y citotoxicidad mediada por anticuerpos que realizan las células K y linfocitos T citotóxicos; incrementa la síntesis de IgG 2, inhibe el "switch" a la síntesis de IgE; se han estudiado sus propiedades antitumorales mediante dos mecanismos básicos: 1.- por el estímulo que produce sobre las células NK y macrófagos para estimular la síntesis y liberación del factor de necrosis tumoral y actuar sinérgicamente con él, y 2.- porque inhibe el crecimiento celular; por último se ha asociado con efectos inmunoreguladores los cuales dependen de la presencia y tipo de antígeno. ^{14,10,16,6}

Se han detectado tres variantes de interferón los cuales se identifican con las tres primeras letras del alfabeto griego siendo el alfa producido por los macrófagos, el beta por los fibroblastos y células somáticas y el gamma producido por los linfocitos.^{10,6}

El linfocito T cooperador al recibir el estímulo de la IL-1 reacciona produciendo la IL-2 la cual tiene el efecto de factor de crecimiento promoviendo la expansión clonal de los linfocitos T CD8 y sobre los linfocitos B; promueve la activación de monocitos.^{14,10}

Otro producto de secreción es el factor de necrosis tumoral el cual junto con el interferón y la interleucina-2 son producidos por los linfocitos T cooperador del subgrupo 1.^{10,6}

La IL-4 promueve que el linfocito B modifique el tipo de cadenas pesadas de los anticuerpos, lo cual se manifestará en la producción de IgG1 e IgE. Se ha demostrado que la IL-4 es un antagonista del interferón y se encuentra directamente relacionada con la respuesta a los alérgenos así como en los individuos atópicos; existen variedades de ratones como el Balb/C que producen la IL-4 en niveles mayores que otros ratones y que presentan una predisposición natural a las infecciones por parásitos intracelulares como las bacterias del género *Mycobacterium*, *Brucella*, *Mycoplasmas*, protozoarios del género *Leishmania* entre otros.^{14,10,16}

La IL-5 induce la diferenciación temprana del linfocito B a célula plasmática. Otra citocina de interés es la IL-12 que ha demostrado tener un efecto de potenciación sobre el interferón gamma, lo cual se manifiesta en un incremento en la resistencia a las parasitosis por patógenos intracelulares, así como tiene una poderosa

actividad reguladora negativa sobre el grupo 2 de linfocitos T cooperadores, al que inhibe en la síntesis de IL-4.^{10,6}

Los osteoclastos son una variedad de macrófagos que se encuentran en cavidades poco profundas de la superficie del hueso, llamadas lagunas de Howship, y que presentan una actividad importante en la renovación del hueso.^{4,1}

Los osteoclastos presentan vacuolas con actividad lisosómica debido a las reacciones histoquímicas positivas a la fosfatasa ácida.⁴

Aunque no se ha demostrado la actividad fagocítica de los osteoclastos si se ha podido apreciar la liberación de enzimas lisosomales hacia la matriz ósea durante la remodelación, por lo que se piensa que los osteoclastos se originan por la fusión de monocitos razón por la que se consideran como miembros del sistema fagocítico mononuclear difuso.⁴

La capacidad fagocítica de esta célula se incrementa por la acción del interferón gamma de los linfocitos, el cual al fijarse su receptor membranal es internalizado para promover la síntesis de ARN mensajero y promover con esto el número y calidad de enzimas lisosomales, el número de lisosomas, un incremento considerable en el número de receptores membranales y mayor capacidad de desplazamiento intracelular. Una gran cantidad de linfocinas actúan sobre estas células modificando ampliamente su comportamiento en los procesos de resistencia a las enfermedades.¹⁰

La regulación de la actividad de los osteoclastos esta dada por la acción de las hormonas paratiroidea y calcitonina.^{15,5}

El proceso de remodelación ósea se manifiesta con una actividad irregular. Las zonas donde se lleva a cabo la remodelación empiezan hacer infiltradas por un

gran número de osteoclastos, los cuales mediante procesos enzimáticos iniciaron la reabsorción del tejido óseo.^{5,4}

El sistema inmunocompetente libera linfocinas que tienen efecto directo sobre todas las variedades de macrófagos (por lo que suponemos que también lo tiene sobre los osteoclastos). Estas linfocinas producen efectos diversos sobre la célula fagocítica, sin embargo la hormona que ha demostrado tener un mayor efecto inmunorregulador es el interferón gamma que actúa sobre diversas células fagocíticas manifestando un incremento en el número y calidad de las enzimas lisosomales, incremento de receptores membranales, expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, así como mayor actividad fagocítica inespecífica.¹⁴

Por otro lado se ha observado que el levamisol tiene una marcada influencia sobre los mecanismos de regulación de la respuesta inmune, este se manifiesta de diferentes formas ya que puede promover la respuesta inmune en los procesos infecciosos y además disminuir la respuesta ante estados de inmunidad. Estos efectos inmunorreguladores de levamisol pueden ser debidos a la inducción de la liberación del interferón gamma al cual ya se le han identificado las actividades inmunorreguladoras que se describen para el levamisol.⁹

La producción de interferón gamma se puede inducir exógenamente mediante la administración subcutánea del isómero levógiro del tetramisol (levamisol), lo cual ha demostrado un aumento en las actividades fagocíticas de macrófagos.⁹

El método menos complicado y más informativo para investigar el origen celular del tejido del callo consiste en estudiar cortes de costilla fracturada, de conejos en fase de consolidación, se puede fracturar una costilla de conejo con los dedos y durante la consolidación las costillas adyacentes actúan como férula.¹²

JUSTIFICACIÓN

Debido a que los linfocitos tienen una fuerte influencia sobre los mecanismos reguladores de la fagocitosis, se considera importante conocer si las terapias inmunorreguladoras pueden tener algún efecto sobre los mecanismos de reparación ósea. Se ha demostrado que el levamisol tiene una fuerte influencia sobre la prevención de osteoporosis en humanos, por lo que consideramos que puede participar en los procesos de regulación de calcio; asimismo se ha demostrado que el levamisol puede modificar la respuesta inmune según sea el proceso en el que participen los linfocitos. Por lo anterior es importante estudiar la respuesta de levamisol sobre la reparación de fracturas, ya que en este proceso se conjuntan los dos efectos del fármaco antes mencionados. Deben activar todos los mecanismos de regulación de fijación de calcio y modificar las actividades celulares de los osteoclastos, que como los macrófagos se ven influenciados por la actividad linfocitaria.³¹

HIPÓTESIS

Si la actividad de los osteoclastos está regulada por la acción endocrina de los linfocitos y estos a su vez pueden ser modificados por la acción de fármacos inmunomoduladores, entonces al aplicar levamisol en animales con fracturas óseas se observará un aumento en la formación de callo óseo después de 30 días de reparación por los efectos inmunosupresores que se generan.

OBJETIVOS

A.- Evaluar la actividad terapéutica del levamisol en la reparación de fracturas óseas, actuando como inmunorregulador.

B.- Analizar histológica y radiológicamente la formación de callo óseo en fractura de costilla de conejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron cuatro lotes de conejos; cada uno compuesto por cinco animales, de la raza Nueva Zelanda blanco, de dos meses de edad, convencionales.

Los animales fueron identificados con números progresivos tatuados en la oreja, y fueron alojados en jaulas de acero inoxidable proporcionándoles una dieta peletizada y agua a libre acceso diariamente.

Se utilizó como tranquilizante hidrocloreuro de xilazina (**Rompum®**, **Lab. Bayer**) a dosis de 0.03 mg/kg. I.V. y bajo anestesia general fina con pentobarbital sódico (**Anestesal®**, **Lab. Smith Kline**) a dosis de 15 mg/kg. I.V. Se realizó en todos los animales una incisión dorsal, como medio de aproximación a la costilla número 10 del lado derecho a la cual se le produjo una fractura mediante el uso de un costotomo marca **Bard-Parker®**. Se suturó por planos y se les realizó el siguiente manejo:

El lote número 1 se utilizó como control de antibiótico, al cual solo se le aplicó penicilina benzatínica a dosis de 30,000 U.I. (**Benzetacil®**, **Lab. Mallinkroot Veterinary**) en una sola ocasión inmediatamente al terminar la cirugía.

El lote número dos se utilizó como testigo absoluto al cual no se le aplicó ningún fármaco ni antibiótico en el postoperatorio.

El lote número tres sólo se aplicó el levamisol a una dosis de 5 mg/kg de peso.

El lote número cuatro se le aplicó el levamisol por vía subcutánea dosis de 5 mg/kg de peso y antibiótico (30,000 U.I.) por vía intramuscular.

Treinta días después de la cirugía se sacrificaron todos los conejos mediante una sobredosis de anestesia utilizando pentobarbital sódico (**Anestosal®**, Lab. Smith Kline) y se procedió a extraer las costillas tratadas y realizar lo siguiente:

1.- Con un vernier se obtuvo la medida de los diámetros menor y mayor de los callos óseos, y con los datos obtenidos se calculó la media.

2.- Se tomaron dos placas radiográficas empleando una proyección anteroposterior y lateral utilizando un chasis con pantalla intensificadora tipo rápida y película radiográfica **Kodak®**; la distancia empleada entre el punto focal y la película radiográfica fue de un metro; las características evaluadas fueron: Presencia o ausencia de líneas de fractura, callo óseo y pseudoartrosis (los valores para la estadística fueron 0= ausente, 1= presente).

3.- Se introdujeron por lotes en formalina amortiguada al 10% con un pH de 7.2 en recipientes estériles para su fijación. Posteriormente se procedió a su descalcificación introduciendo los huesos en una solución descalcificadora de ácido nítrico con formol al 37% durante 24 horas; se deshidrataron y se incluyeron en parafina. Se les realizaron cortes con el microtomo a tres micrómetros de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina para su posterior observación al microscopio óptico.⁸

Se les evaluaron los siguientes parámetros: Presencia de material necrótico, presencia de cartilago, presencia de tejido fibroso, formación de hueso esponjoso y presencia de osteoclastos, siendo los valores de referencia para el análisis estadístico 0= ausente, 1= escasos, 2= moderado y 3= abundantes.

4.- A los resultados se les aplicó estadística no paramétrica utilizando la metodología de **Wilcoxon**, y un análisis de varianza de **Kruskal Wallis**.¹¹

RESULTADOS

En el cuadro No. 1 aunque no hubo diferencias significativas se observa que el lote No. 3, en el cual sólo se utilizó levamisol, el diámetro del callo óseo fue mayor mientras que el menor corresponde al lote No. 1 donde sólo se aplicó antibiótico.

Cuadro 1				
Tabla comparativa de las medias de los diámetros, mayor y menor de los callos óseos "in situ"				
Lote	1	2	3	4
Tratamiento	antibiótico	control	levamisol	leva./anti.
máximo	0.486 ± 0.035	0.537 ± 0.024	0.548 ± 0.037	0.514 ± 0.028
mínimo	0.374 ± 0.007	0.438 ± 0.017	0.399 ± 0.055	0.408 ± 0.024

Debido a que la forma de medidas predisponía a un alto índice de error se decidió tomar placas radiográficas para determinar el diámetro, donde observamos que tampoco hubo diferencias significativas pero el diámetro mayor correspondió al lote control y el menor a la mezcla levamisol-antibiótico (cuadro 2).

Cuadro 2				
Tabla comparativa de las medias de los diámetros, de los callos óseos en radiografía				
Lote	1	2	3	4
Tratamiento	antibiótico	control	levamisol	leva./anti.
antero-posterior	0.524 ± 0.025	0.546 ± 0.052	0.520 ± 0.054	0.525 ± 0.032
lateral	0.530 ± 0.049	0.584 ± 0.031	0.530 ± 0.044	0.503 ± 0.036

Al continuar con la evaluación radiológica se evaluó el callo óseo, líneas de fractura y presencia de pseudoartrosis.

Se encontró que no hubo diferencias significativas para la presencia de callo óseo ya que las frecuencias fueron semejantes.

Para la línea de fractura aunque no hubo diferencias significativas la respuesta fue mayor del lote control es decir que todos presentaron líneas de fractura y el valor menor correspondió al levamisol donde un sólo animal presentó línea de fractura, los valores intermedios quedaron en el lote No. 1 y el lote No. 4 en la presencia de pseudoartrosis los valores fueron semejantes para los cuatro grupos (**cuadro 3**).

Cuadro 3				
Tabla comparativa de las medidas de los valores asignados a la evaluación radiológica de los callos óseos				
Lote	1	2	3	4
Tratamiento	antibiótico	control	levamisol	leva./anti.
callo óseo	0.750	0.800	0.800	0.750
línea de fractura	0.250	1.000	0.200	0.500
pseudoartrosis	0.250	0.200	0.200	0.250

En el **cuadro 4** se presenta la evaluación histopatológica de los callos óseos donde se dieron valores arbitrarios según el tipo de tejido analizado dando el valor de 0 para la ausencia total, 1 para escasos, 2 para moderado y 3 para abundante, haciendo dos lecturas por personas diferentes para reducir el índice de error. En la presencia de cartilago no hubo diferencias significativas encontrando la mayor presencia de este tejido en el lote No. 4 y el menor en el lote No. 3.

Con respecto a la formación de hueso esponjoso no lamelar el valor mayor correspondió al lote control y el menor para lote No. 1 y lote No. 4.

La presencia de tejido fibroso el valor mayor correspondió al lote No. 4 y el menor al lote No. 3.

La presencia de necrosis siendo esta focal o multifocal fue mayor en el lote No. 4 y el valor menor fue en el lote No. 3, esta diferencia fue significativa.

En cuanto a la presencia de osteoclastos el valor menor correspondió al lote No. 3 y el valor mayor correspondió al lote No. 4.

El parámetro utilizado en el conteo de osteoclastos fue de leve cuando se encontraban de 1 a 3 por campo de 40X, moderado cuando se encontraban de 3 a 5 y abundante cuando se encontraban más de 5 dentro del mismo campo.

Cabe señalar que en ningún animal se observaron células inflamatorias. Por lo que se deduce que en todos los animales se llevaba a cabo la fase de remodelación.

Cuadro 4				
Tabla comparativa de las medias de los valores de la evaluación histopatológica de los callos óseos				
Lote	1	2	3	4
Tratamiento	antibiótico	control	levamisol	leva./anti.
cartilago	1.750	1.800	1.400	2.500
hueso esponjoso	1.750	2.400	2.000	1.750
tejido fibroso	1.750	1.400	1.000	2.000
necrosis	1.000	0.800	(*) 0.000	1.500
osteoclastos	1.250	1.600	1.200	1.750

(*) p= 0.004 vs todos los grupos

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos no podemos descartar la utilidad del levamisol como un adyuvante en los procesos de reparación ósea, debido a que se encontró una disminución considerable de la necrosis en los callos óseos.

Se ha demostrado que el levamisol induce la liberación del interferón gamma y este a su vez modifica considerablemente la respuesta inmune, ya que por un lado puede promover la respuesta ante la presencia de ciertos inmunógenos y puede inhibirla en la ausencia de estos⁹.

Por esta razón consideramos que los efectos observados sobre la disminución de la necrosis pueden ser debidos a la supresión de la producción del factor de necrosis tumoral así como la disminución en la actividad citotóxica de las células NK, las cuales se ha demostrado que modifican su respuesta en presencia del interferón gamma, además de que tienen una relevante participación en los procesos de cicatrización del organismo.²

El levamisol no sólo tiene efectos antihelmínticos o inmunomoduladores, también tiene un fuerte efecto sobre la regulación de AMP y GMP, los cuales participan activamente sobre los mecanismos de regulación del metabolismo celular, el cual podría estar participando sobre la producción de enzimas lisosomales de los osteoclastos y sobre la maduración de los osteocitos³.

También es de considerar que el levamisol tiene otro efecto farmacológico que es el de antioxidante, el cual también se ha demostrado que protege a las células de la necrosis autooxidativa y evitar la acción de agentes autonecrosantes^{3,10}.

Por todo lo anterior no podemos concluir si los efectos de levamisol sobre las fracturas son de origen inmunológico, por lo que se propone que para otra ocasión se repita el trabajo con las siguientes modificaciones: 1.- Aumentar el tamaño de muestra. 2.- Cambiar el sitio de fractura utilizando huesos largos como el peroné o fémur, 3.- Se determine la concentración del interferón gamma en la sangre, 4.- Se evalúe la fijación de calcio en el callo óseo mediante el empleo de tetraciclinas u otro marcador de calcio y 5.- Determinar la actividad de las fosfatasas de los osteoclastos mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Lo anterior es debido a que durante el presente proyecto surgieron dudas que consideramos se podrían resolver haciendo las modificaciones propuestas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

LITERATURA CITADA

- 1.- **Baron R., Tran Van P., Nefussi J.R. and Vignery A.:** Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. Am. J. Pathology. vol. 122 1982.
- 2.- **Borel P.J. and Maquart F.X.:** La Cicatrización. Mundo Científico No. 119 Vol. 11. México 1986.
- 3.- **Euzeby, J.P.:** Propriétés Immunoestimulantes Du Levamisol. Revue. Med. Vet. Ecole Nationale Vétérinaire de toulouse.: 416-426. 1986.
- 4.- **Fawcet, D.W.:** Tratado de Histología. Interamericana. 11a. Edición., México. 1986.
- 5.- **Guyton, A.C.:** Tratado de Fisiología Médica. Interamericana. Séptima Edición, México 1989.
- 6.- **Heinzel, F.P., Rerko, R.M., Ahmed, F. and Pearlman E:** Endogenous IL-12 is required for control Th2 responses capable of exacerbating leishmaniasis in normal resistant mice. J. Immunology. vol. 155. 1995.
- 7.- **Jubb, K.V.F. and Kennedy P.C.:** Pathology of Domestic Animals Vol. 1, Segunda Edición., Academic Press. Londres 1980.

8.- **Lee G. Luna.**: Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology. Tercera Edición. McGraw Hill Inc., USA. 1968.

9.- **López, S.P.**: Mecanismo de Acción Antiviral del IFN. Interferon y Biotecnología . 1:1-15. La Habana Cuba 1984.

10.- **Male D.; Champion B.; Cooke A. and Owen M.**: Advance Immunology Second edition Gower Medical Publishing, London. 1991.

11.- **Marques de Cantú M.J.**: Probabilidad y Estadística para las Ciencias Químico Biológicas. Preedición. McGraw Hill, México 1990.

12.- **Rudy, R.L.**: Manejo de las Fracturas de los Miembros de los Pequeños Animales. Hemisferio Sur. Primera Edición, México 1981.

13.- **Stephen J. Ettinger.**: Tratado de Medicina Interna Veterinaria, Tomo 2 Tercera Edición. Intermedica, Argentina 1992.

14.- **Stites, D.P.**: Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno. Sexta Edición., México 1988.

15.- **Thomas, M.L., Forte, L.R.**: Serum Calcium And Parathyroid Hormone During The Reproductive Cycle In Normal And Vitamin D- Deficient rats. Endocrinology. 110:703-707. 1989.

16.- **Tizard I.**: Inmunología Veterinaria.; 3a. Edición, Interamericana. México 1989.