

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Medicina



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**“EFECTO INMUNOMODULADOR DE IVERMECTINA Y
DIETILCARBAMACINA EN RATONES INFECTADOS CON
Nocardia brasiliensis”.**

Por

M.C. MARISELA GARCÍA HERNÁNDEZ

**Como requisito parcial para obtener el Título de
Doctorado en Ciencias con Especialidad en
Inmunología**

Junio 2009

**“EFECTO INMUNOMODULADOR DE IVERMECTINA Y
DIETILCARBAMACINA EN RATONES INFECTADOS CON *Nocardia
brasiliensis*”**

COMISIÓN DE TESIS

DR. CARLOS E. MEDINA DE LA GARZA

Director de Tesis

DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA

Co-director de Tesis

DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES CASTRO CORONA

Comisión de Tesis

DR. ERNESTO TORRES LÓPEZ

Comisión de Tesis

DR. med. JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ

Comisión de Tesis

DR. med. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

**“EFECTO INMUNOMODULADOR DE IVERMECTINA Y
DIETILCARBAMACINA EN RATONES INFECTADOS CON *Nocardia
brasiliensis*”**

POR:

M.C. Marisela García Hernández

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Carlos E. Medina De la Garza. Proyecto apoyado por PAICYT SA-1292-06 y SA-1669-07.

DEDICATORIA

*A Dios, mi familia y a los dedos de mi mano...
que siempre me acompañarán.*

AGRADECIMIENTOS

A mi Señor, creador y Dios, por todas las bendiciones que me has dado a lo largo de la vida. Ésta es tan solo una de ellas. Simplemente gracias.

A mis padres, Graciela y Marcelo, por ser mis motivadores número uno, por su amor y estar siempre ahí, dándome su ánimo y apoyo para realizar siempre lo que he deseado. Gracias por confiar en mí.

A mis hermanitas musicales La mayor y La menor; Lila y Anita, por su apoyo y gran amor.

A Rubén y a mis sobrinitas Dana y Lía, por la alegría de llamarme “tía Mayi”.

A los dedos de mi mano que siempre irán conmigo: Edgardo, por esa fe inmortal que tienes en mí; Adrián, por tu sinceridad y apoyo incondicionales; Carlos, por esa continua reciprocidad de confianza y a ti David, por hacer de nuestra amistad un elemento diferente. Gracias amigos por esa libertad que disfrutamos juntos.

A los que dejaron huella aunque no están cerca: Mabelle, Katy y Mony. Porque de alguna manera se quedaron conmigo.

A mi amigo, maestro y director de tesis, Dr. Carlos E. Medina De la Garza, por su fe en mí, por su apoyo incondicional para desarrollar esta meta y sobre todo por esa calidad humana que lo caracteriza. Gracias por lo que he aprendido con Ud., que más allá del conocimiento, son sus enseñanzas de vida y por esa “Confianza” ganada a lo largo de estos años.

Al Dr. Mario C. Salinas Carmona, por los conocimientos compartidos, por su valioso apoyo y asesoría para el desarrollo de este trabajo doctoral. Gracias por la oportunidad de poder desarrollarlo.

A la Dra. Ángeles Castro Corona, por su amistad, el cariño brindado y apoyo de siempre, por sus ánimos y su confianza. Gracias por su asesoramiento y por todas las recomendaciones.

Al Dr. Ernesto Torres López, por su amistad y honestidad, por su apoyo y disposición para el desarrollo de este proyecto y por los ánimos para seguirme desarrollando.

Al Dr. José Carlos Jaime Pérez, por la disposición para colaborar con su asesoría y revisión de éste trabajo.

A la Dra. Isabel Rivera y a la Q.F.B. Alejandra Gallegos y en general al laboratorio de Inmunología Celular por su apoyo y asesoría en el desarrollo técnico del proyecto.

A todos mis compañeros del Departamento que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización y cumplimiento de esta meta. En especial a Ara, Lizzy y Paco, por su amistad y apoyo.

A mis compañeros de Posgrado: Juan Carlos, Pily, Mary, Lulú, Humberto y Paco. Por el tiempo compartido en el desarrollo de esta etapa de nuestras vidas.

A todos mi sincero agradecimiento.

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|---|----------|
| Portada | i |
| Aprobación de tesis | ii |
| Lugar de trabajo | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos | v |
| Contenido | vii |
| Lista de figuras | xi |
| Lista de tablas | xiii |
| Abreviaturas | xiv |
| Resumen | xix |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Inmunomoduladores..... | 1 |
| 1.1.1 Inmunomoduladores de origen bacteriano..... | 4 |
| 1.1.2 Inmunomoduladores originados de células eucarióticas..... | 9 |
| 1.1.3 Inmunomoduladores farmacológicos o sintéticos..... | 14 |
| 1.2 Drogas antiparasitarias..... | 17 |
| 1.2.1 Antiparasitarios: Ivermectina y Dietilcarbamacina..... | 19 |
| 1.2.1.1 Ivermectina..... | 19 |
| 1.2.1.1.1 La ivermectina y su uso como inmunomodulador..... | 22 |
| 1.2.1.2 Dietilcarbamacina..... | 26 |
| 1.2.1.2.1 La dietilcarbamacina y su efecto sobre el sistema inmune.. | 28 |
| 1.2.1.2.2 La dietilcarbamacina como inmunomodulador terapéutico. | 30 |
| 1.3 Inmunomodulación en el tratamiento de enfermedades infecciosas..... | 33 |
| 1.3.1 Inmunomodulación en infecciones de difícil tratamiento: Nocardiosis y micetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i> | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4 Justificación..... | 40 |
| 1.5 Hipótesis..... | 41 |
| 1.6 Objetivos..... | 42 |
| 1.6.1 Objetivo general..... | 42 |
| 1.6.2 Objetivo específicos..... | 42 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 44 |
| 2.1 Animales de experimentación..... | 44 |
| 2.2 Fármacos..... | 44 |
| 2.2.1 Dietilcarbamacina..... | 44 |
| 2.2.2 Ivermectina..... | 44 |
| 2.3 Modelo de infección en el ratón..... | 45 |
| 2.3.1 Cepa de <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1..... | 45 |
| 2.3.2 Suspensión bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> | 45 |
| 2.3.3 Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias de <i>N. brasiliensi</i> | 46 |
| 2.3.3.1 Método de Miles y Misra..... | 47 |
| 2.4 Tratamiento con los fármacos..... | 47 |
| 2.5 Establecimiento del micetoma y evaluación..... | 48 |
| 2.6 Evaluación del Estallido Respiratorio en monocitos y polimorfonucleares.... | 49 |
| 2.6.1 Determinación del anión superóxido por la técnica 123-dihidro-rodamina mediante Citometría de flujo..... | 50 |
| 2.6.1.1 Obtención de leucocitos..... | 50 |
| 2.6.1.2 Estimulación con éster forbólico del ácido mirístico (PMA)..... | 51 |
| 2.6.1.3 Tinción con 1,2 Dihidro-rodamina (DHR)..... | 52 |
| 2.6.1.4 Adquisición y Análisis de muestras..... | 52 |
| 2.7 Ensayo de la Respuesta Proliferativa en células de bazo..... | 53 |
| 2.7.1 Obtención de las células de bazo..... | 53 |
| 2.7.2 Respuesta de proliferación de linfocitos de bazo a mitógeno (PHA) y a antígeno (ECC) de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 55 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.7.2.1 | Obtención del Extracto Crudo Celular (ECC) de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 56 |
| 2.7.2.1.1 | Determinación de proteínas por el método de Bradford.... | 57 |
| 2.7.2.1.2 | Análisis del patrón electroforético del ECC de <i>N. brasiliensis</i> mediante SDS-PAGE al 12% | 58 |
| 2.8 | Determinación de anticuerpos anti-P24 por técnica inmunoenzimática (ELISA)..... | 59 |
| 2.8.1 | Obtención del suero..... | 60 |
| 2.8.2 | Obtención y purificación de la proteína P-24 de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 60 |
| 2.8.2.1 | Precipitación proteica del extracto crudo de <i>Nocardia brasiliensis</i> | 60 |
| 2.8.2.2 | Cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-100..... | 61 |
| 2.8.3 | Esquema de inmunización para la obtención de sueros control positivos para prueba de ELISA anti- IgM y anti-IgG..... | 62 |
| 2.8.4 | Determinación de anticuerpos anti-IgG y anti-IgM anti P-24 por una técnica inmunoenzimática..... | 63 |
| 2.9 | Análisis estadístico..... | 64 |
| 3. | RESULTADOS | 65 |
| 3.1 | Cultivo de <i>N. brasiliensis</i> | 65 |
| 3.2 | Evaluación del micetoma..... | 66 |
| 3.2.1 | Características clínicas..... | 66 |
| 3.3 | Efecto sobre la lesión del micetoma..... | 69 |
| 3.4 | Efecto sobre el Estallido Respiratorio..... | 73 |
| 3.4.1 | Efecto sobre la producción del anión superóxido en células monocíticas..... | 73 |
| 3.4.2 | Efecto en la producción del anión superóxido en células polimorfonucleares..... | 75 |
| 3.5 | Efecto sobre la Respuesta Proliferativa en células de bazo..... | 77 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.5.1 | Linfoproliferación contra Extracto Crudo Celular..... | 77 |
| 3.5.2 | Linfoproliferación contra Concanavalina A..... | 79 |
| 3.6 | Efecto sobre la producción de anticuerpos anti-P24 de <i>N. brasiliensis</i> | 81 |
| 3.6.1 | Obtención y Purificación de anticuerpos anti-P24 de <i>N. brasiliensis</i> | 81 |
| 3.6.2 | Producción de anticuerpos IgG-anti P24 de <i>N. brasiliensis</i> | 82 |
| 3.6.3 | Producción de anticuerpos IgM-anti P24 de <i>N. brasiliensis</i> | 84 |
| 4. | DISCUSIÓN | 86 |
| 4.1 | Efecto de la ivermectina..... | 86 |
| 4.2 | Efecto de dietilcarbamacina..... | 91 |
| 4.3 | Efecto de antiparasitarios como adyuvantes en las infecciones por Intracelulares..... | 97 |
| 5. | CONCLUSIONES | 99 |
| 6. | PERSPECTIVAS | 100 |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 101 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| 2ME | 2-mercaptoetanol |
| Abs | Absorbancia |
| ACF | Adyuvante Completo de Freund |
| ADN | Ácido Desoxiribonucleico |
| AIF | Adyuvante Incompleto de Freund |
| AIF | Adyuvante Incompleto de Freund |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ARNm | Ácido Ribonucleico mensajero |
| ASB | Suero de Albúmina Bovina |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BCG | Bacilo de Calmette y Guérin |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| cAMP | Adenosina-monofosfato cíclico |
| CAS-BR-M | Virus de la leucemia murina |
| CD | Cluster Diferenciación |
| cels | Células |
| cGMP | Guanina-monofosfato cíclico |
| Cl ⁻ | Ión Cloro |
| cm | Centímetro |
| CMH II | Complejo Mayor de Histocompatibilidad II |

| | |
|-----------------|-----------------------------------|
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| Col. | Colaboradores |
| Con A | Concanavalina A |
| cpm | Cuentas por millón |
| CTRL | Control |
| DE | Desviación Estándar |
| DEC | Dietilcarbamacina |
| DHR | Dihidrorodamina |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DNCB | Dinitroclorobenceno |
| ECC | Extracto Celular Crudo |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| FDA | Food Drug Administration |
| FeLV | Virus de la leucemia felina |
| Fig. | Figura |
| g | Gramos |
| h | Hora (s) |
| HCl | Ácido Clorhídrico |
| HTLV | Human T Linfocyte Virus |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule-1 |
| IFNs | Interferones |
| IFN- γ | Interferón gamma |
| IgG | Inmunoglobulina G |

| | |
|--------|--------------------------------------|
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IL | Interleucina |
| IMF | Intensidad Media de Fluorescencia |
| IRO | Intermediarios Reactivos del Oxígeno |
| IVM | Ivermectina |
| KDa | Kilodalton |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LT | Linfocitos T |
| MANOVA | Análisis Multivariado |
| MDP | Muramil Dipéptido |
| mg | Miligramo |
| min. | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetros |
| MPM | Marcador de Peso Molecular |
| NBT | Nitroblue Tetrazolium |
| NK | Natural Killer |
| NO | Óxido Nítrico |
| °C | Grados Celsius |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPD | Orto-fenilendiamina |
| p/v | Relación peso sobre volúmen |

| | |
|---------------|---|
| P24 | Proteína P24 de <i>N. brasiliensis</i> |
| P61 | Proteína P61 de <i>N. brasiliensis</i> |
| PBS | Amortiguador de Fosfatos |
| PM | Peso Molecular |
| PMA | Éster forbólico del ácido mirístico |
| PMN | Polimorfonucleares |
| POPOP | 2,2-para-Fenilen-bis(5 feniloxazol) |
| PPDO | Precipitado |
| PPO | 2,5-Difeniloxazol |
| RPMI | Royal Park Memorial Institute Medium |
| s.c | subcutáneo |
| S.S. | Solución Salina |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS |
| SN | Sobrenadante |
| Th | Células T cooperadoras |
| TLR | Toll-like Receptor |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral alfa |
| TNF- β | Factor de Necrosis Tumoral beta |
| TT | toxoides de titani |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| v.o. | Vía oral |
| v/v | Relación volúmen sobre volúmen |

| | |
|---------|-----------------------------------|
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule-1 |
| V_0 | Volúmen Vacío |
| xg | Campo gravitacional |
| μg | Microgramo |
| μl | Microlito |
| - | Negativo |
| % | Porcentaje |
| + | Positivo |

RESUMEN

Marisela García Hernández
Facultad de Medicina
U.A.N.L.

Obtención de Grado: Junio 2009

Título del estudio:

“Efecto Inmunomodulador de Ivermectina y Dietilcarbamacina en ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*”

Número de páginas: 124

Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología

Propósito y Método de Estudio: El sistema inmune puede ser manipulado de manera no específica por agentes inmunoestimuladores que son capaces de potenciar los mecanismos de defensa del hospedero para proveer protección contra las infecciones. Algunos antiparasitarios con propiedades inmunomoduladoras pueden ser una terapia adjunta al tratamiento de las mismas. El objetivo fue evaluar el efecto inmunomodulador de la Ivermectina (IVM) y la Dietilcarbamacina (DEC) en un modelo de infección de ratón con actinomicetoma producido por *N. brasiliensis* sobre el establecimiento de la lesión tisular (micetoma), la producción de Intermediarios Reactivos del Oxígeno (IRO) por células fagocíticas, la linfoproliferación y la producción de anticuerpos IgG e IgM. Se formaron 4 grupos de ratones machos BALB/c. El grupo I y II; grupo Control (-) y Control (+) recibieron solución salina v.o. El grupo III recibió DEC (250 µg, v.o) durante 7 días y al grupo IV se le administró la IVM (8.5 µg, v.sc.) cada tercer día en 2 ocasiones; posteriormente se inocularon con *N. brasiliensis* en el cojinete plantar, y se evaluó el efecto de ambas drogas sobre: **a)** el tamaño de la lesión a lo largo de la infección; **b)** el Estallido Respiratorio (IRO) en células fagocíticas por la técnica de 123-dihidro-rodamina mediante citometría de flujo; **c)** la proliferación celular de los linfocitos T estimulados con ECC de *N. brasiliensis* y con Concanavalina A y **d)** la producción de anticuerpos IgG e IgM anti-P24 de *N. brasiliensis* en todos los grupos de estudio.

Contribuciones y Conclusiones: La DEC tiene un efecto modulador positivo al inhibir de manera significativa ($p < 0.05$) la progresión del micetoma en ratones BALB/c. La IVM a la dosis estudiada no tiene este efecto. El estallido respiratorio es potenciado significativamente ($p < 0.05$) en el día 3 post-infección en las células polimorfonucleares de los ratones que recibieron DEC por encima del resultado esperado en los monocitos. La IVM aumenta la producción de intermediarios reactivos del oxígeno en el día 1 post-infección de manera no significativa. La proliferación de linfocitos a ECC de *N. brasiliensis* y a Con A, se encuentra aumentada en el día 21 y 28 post-infección en el grupo que recibió DEC. La IVM no mostró diferencia significativa en la proliferación comparada con el control. La producción de anticuerpos IgG e IgM anti-P24 no aumenta con el tratamiento de DEC e IVM en los ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis*. La actividad de la DEC en relación a los parámetros estudiados en la infección por *Nocardia* es superior a la observada para la IVM. El presente estudio indica que la DEC posee además de su actividad antiparasitaria, una actividad inmunoestimuladora principalmente sobre la actividad fagocítica y la respuesta inmune celular, la cuál puede ser utilizada para combatir la enfermedad infecciosa o en su co-administración como adyuvante en la vacunación.

Firma del Director: _____
Dr. Carlos E. Medina De la Garza

Firma del Co-director: _____
Dr. Mario C. Salinas C.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunomoduladores

El sistema inmune puede ser manipulado con fines preventivos o terapéuticos, de manera específica por vacunación o inmunoterapia hiposensibilizante, o de manera no específica mediante inmunomodulación. Los inmunomoduladores incluyen tanto agentes inmunoestimuladores e inmunosupresores, sustancias que tienen la capacidad de aumentar o suprimir una respuesta inmunológica (Sajid y cols., 2006). Además de una respuesta inmune modificada, se ha reportado la modulación de la hematopoyesis, incluyendo cuentas incrementadas de eritrocitos y leucocitos e incremento en la activación de los macrófagos (Cox, 1988). Los inmunomoduladores o inmunoestimulantes, que incluyen sustancias biológicas y compuestos químicamente definidos, han sido empleados satisfactoriamente en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades humanas (Ballow, 1997, Martínez, 2005). En años recientes, el creciente interés en la inmunoterapia, ha dado como resultado una diversa colección de posibles agentes inmunomoduladores. En consecuencia, cuando nos referimos a inmunomodulación, hablamos de la manipulación del sistema inmunológico a través del uso de sustancias de origen farmacológico o biológico para inducir una respuesta inmune adecuada al estado que se desea tratar o prevenir. En la respuesta a la enfermedad infecciosa, el restaurar una respuesta inmune que se encuentra disminuida o la potenciación de una respuesta normal puede incrementar la resistencia a la infección, reducir la gravedad de la enfermedad o acortar el periodo de recuperación (Sajid y cols., 2006).

La modulación de la respuesta inmune, puede ocurrir por mecanismos directos o indirectos. Los mecanismos directos de inmunomodulación involucran la interacción de un inmunomodulador y/o su metabolito con un componente de las células del sistema inmune. De esta manera, el estímulo modulador induce una modificación directamente en las funciones de las células del sistema inmune (Martínez, 2005). Por otro lado, los mecanismos indirectos de la modulación involucran la interacción del inmunomodulador y/o su metabolito con un componente que no pertenece a las células efectoras de sistema inmunológico (Sanders y cols., 1991). Esta interacción con dicho componente, estimula o inhibe la liberación de un mensajero biológico que posee una actividad inmunomoduladora. Por lo tanto, un mecanismo directo de inmunomodulación es medible tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que un mecanismo indirecto es medible solamente *in vivo* (Sanders y cols., 1991).

El modo de acción de muchos inmunomoduladores no es del todo conocido, aunque generalmente sus principales células blanco en el sistema inmune son los linfocitos T y B, monocitos/macrófagos, granulocitos y células NK (Masihi, 2001). Sin embargo, se han propuesto diversas hipótesis que podrían explicar la acción de algunas de estas sustancias (Quinn, 1990; Pell, 1995). Muchos de los mecanismos de acción de los inmunomoduladores están basados en la alteración que producen en la actividad de las células inmunes, tales como cambios en la expresión genes, procesamiento del ARN mensajero, transporte intracelular de proteínas, síntesis proteica y la secreción y expresión de proteínas en la superficie celular, lo cual induce cambios celulares que pueden influir en la inducción, mantenimiento y regulación de la respuesta inmune (Quinn, 1990; Pell, 1995). En muchos casos, se ha observado que la acción de los inmunomoduladores está relacionada con el mecanismo y equilibrio de segundos

mensajeros que participan en las rutas de transducción de las señales celulares, como la adenosina-monofosfato cíclico (cAMP) y la guanina-mono-fosfato cíclico (cGMP) (Kehrli y Rhot, 1990; Quinn, 1990). Por ejemplo, se ha demostrado que el aumento de los niveles de cAMP inhibe la función efectora de los linfocitos lo que produce inmunosupresión, mientras que niveles altos de cGMP promueven un incremento de la actividad de los linfocitos maduros lo que se traduce en inmunoestimulación (Mulcahy y Quinn, 1986; Quinn, 1990).

Así, en algunos casos y dependiendo de la enfermedad, la finalidad de la modulación será aumentar la intensidad de la respuesta inmune que se encuentre disminuida por alguna causa (inmunosupresión, estrés, infecciones crónicas) mientras que en otros casos se tratará de reducirla cuando se encuentre fuera de regulación o control (enfermedades autoinmunes, alérgicas, trasplantes, hipersensibilidad). En la terapia de las enfermedades infecciosas ó neoplásicas el objetivo terapéutico se concentra en la activación del sistema inmune mediante el uso de moduladores con un efecto estimulador más que con un efecto inmunosupresor.

Una clasificación estricta de los inmunomoduladores de acuerdo a su actividad es difícil, porque en muchos de ellos no se conocen los mecanismos de acción. Según la clasificación realizada por Mulcahy y Quinn; y cuatro años más tarde por Reddy y Frey en 1990, podemos decir que dependiendo de su origen pueden dividirse en tres categorías: a) de origen bacteriano o microbiológico; b) de origen celular eucariótico y c) de origen farmacológico o sintético. (Mulcahy y Quinn, 1986; Reddy y Frey, 1990).

1.1.1 Inmunomoduladores de origen bacteriano

En este tipo de modificadores de la respuesta inmune, la inmunoterapia está dada por la administración de la forma no patogénica o atenuada de un microorganismo como en el caso del bacilo de Calmette-Guérin o por alguno de sus componentes bacterianos, como en el Adyuvante Completo de Freund, los lipopolisacáridos, el Muramil Dipéptido y el Lípido A.

El **Bacilo de Calmette y Guerin ó BCG**, es un inmunógeno altamente complejo que induce una respuesta inmune y básicamente de tipo celular. En 1921 Calmette y Guerin, después de 13 años y de 230 pases de cultivo del bacilo tuberculoso, consiguieron un bacilo no patógeno pero sí inmunógeno, cuyo empleo logró, con eficacia variable, disminuir la incidencia de la tuberculosis y meningitis tuberculosa por su efecto inmunoestimulador protector sistémico (Van Der Meijden y cols., 1989). En 1976, Morales y colaboradores reportaron, la utilidad de la instilación intravesical del BCG en el tratamiento de neoplasia vesical superficial (Morales y cols., 1976). Posteriormente, otros autores confirmaron su efectividad en la prevención de la recurrencia del carcinoma transicional de vejiga (Martínez-Pineiro y cols., 1995; Alexandroff y cols., 1999), la cual puede llegar hasta un 70-80%, si no se realiza un tratamiento complementario (Lamm, 1995). Si bien el mecanismo de acción no está claro, el BCG es considerado como la forma de inmunoterapia más eficaz hasta ahora contra el carcinoma de vejiga (Vázquez-La Vista y cols., 2007). Se sugieren tres posibilidades para su acción: la producción de una respuesta inmune específica al BCG, que estimula los mecanismos inmunes no específicos a destruir a las células tumorales; una reacción cruzada inmunitaria de la BCG con los antígenos tumorales y una acción local por efectos tóxicos y reacción inflamatoria intensa (Lamm y cols., 1986).

Se piensa que una gran variedad de células inmunocompetentes, así como células uroepiteliales y aún las mismas células neoplásicas de la vejiga, participan en el mecanismo inmunológico que ocurre durante la terapia intravesical con el BCG (Vázquez-Lavista y cols., 2007). Los efectos anti-tumorales del BCG parecen estar relacionados a mecanismos inmunológicos, los cuáles son reflejados por un incremento transitorio de varias citocinas (de Boer y cols., 1992) y la presencia de leucocitos inmunocompetentes activados en la orina dentro de las 24 primeras horas posterior a la instilación. Algunos estudios han reflejado una respuesta inflamatoria, por la presencia de citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-18 y TNF- α (Thalmann y Col., 1997; de Boer y cols., 1997) mientras que otros indicaron una activación específica de células T, mediante la producción de IL-2 e IFN- γ (Prescott y cols., 1990).

Otros estudios han revelado que los linfocitos T CD4+ y los monocitos actúan como células accesorias en la citotoxicidad mediada por células inducidas por el BCG (Thanhäuser y cols., 1995). Ciertamente, otro gran número de moléculas y células deben participar en la inmunomodulación inducida por el BCG, como la familia de moléculas de adhesión, las proteínas de choque térmico, los receptores tipo Toll (TLR), el óxido nítrico, las células dendríticas y sus subpoblaciones, las células T reguladoras (T-regs) y las recientemente descritas células Th17 (Vázquez-Lavista, 2007), todas ellas deben intervenir como efectoras y moduladoras tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. El BCG es un ejemplo de inmunomodulador que puede tener efecto en varios niveles del sistema inmune.

Los **adyuvantes** son sustancias, inyectadas con un inmunógeno, que son utilizados para aumentar la respuesta inmune celular/humoral a ese mismo inmunógeno. En general, entre los

mecanismos que los adyuvantes utilizan para potenciar la respuesta inmune se encuentran: el efecto “depósito”, la presentación de antígeno, la distribución del antígeno, una modulación/activación inmune y la inducción de linfocitos citotóxicos (Stills, 2005). El **Adyuvante Completo de Freund (ACF)** fue desarrollado en 1937 (Freund y cols., 1937) y sus capacidades inmunomoduladoras no han sido superadas por ningún otro adyuvante (Smith y cols., 1992). El ACF modifica la respuesta inmunológica a través de microorganismos muertos o sus productos bacterianos como Muramil Dipéptido (MDP), Lipopolisacáridos (LPS), Lípido A. El ACF es la combinación de una emulsión de aceite mineral y micobacterias muertas y es uno de los adyuvantes más potentes conocidos para la estimulación de la inmunidad celular y humoral; el ACF tiene la gran desventaja de que su uso está restringido únicamente para animales de laboratorio, debido a que contiene aceite mineral que no es metabolizado por el humano y a que los elementos micobacterianos pueden conducir a grandes reacciones granulomatosas.

Con el descubrimiento de los receptores tipo Toll (TLRs), el mecanismo celular de reconocimiento de las micobacterias y la respuesta inmune se han entendido mejor así como la acción del ACF. El TLR2 y el TLR4 son críticos para el reconocimiento inicial y para la respuesta inmune a las infecciones micobacterianas por los macrófagos y células dendríticas. La activación de diferentes TLRs conduce a diferentes respuestas celulares y de citocinas, las cuales alteran la respuesta celular y humoral (Heldwein y Fenton, 2002; Means y cols., 1999; Nigou y cols., 2002). Los componentes micobacterianos del ACF tienden a producir una fuerte reacción de hipersensibilidad retardada y dirigen una respuesta inmune hacia un perfil tipo Th1 (Lindblad, 2000).

Los peptidoglicanos de las paredes bacterianas poseen propiedades inmunomoduladoras y su estudio como agentes inmunoestimuladores data desde 1974, cuando fue establecido que la actividad inmunoestimulante del adyuvante de Freund es dependiente de la fracción péptido muramil de la pared de *Mycobacterium tuberculosis*. El **Muramil Dipéptido (MDP)** es la unidad estructural más pequeña responsable de la actividad inmunoadyuvante del peptidoglucano de las paredes celulares bacterianas (Ellouz y cols., 1974; Chedid y cols., 1982; Girardin y cols., 2003). El MDP ha mostrado diversos efectos biológicos sobre las células inmunocompetentes *in vitro* (Chedid y cols., 1982) y un aumento en las actividades fagocíticas y microbicidas de monocitos y macrófagos (Cummings y cols. 1980; Riveau y cols., 1991). Puede también inducir la respuesta mitogénica de las células B (Dziarski, 1988; Souvannavong y cols., 1990) e incrementar la expresión de moléculas inmunoestimuladoras, como moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (CMHII), el CD40 y moléculas de adhesión-1 sobre monocitos y células B (Cohen y Cl., 1990; Heinzelmann y cols., 1997).

Otros componentes bacterianos que actúan como inmunoestimulantes, son los **lipopolisacáridos (LPS)**, constituyentes característicos de las paredes celulares bacterianas Gram-negativas, los cuales están localizados en el exterior de la membrana (Rietschel, 1992). La actividad adyuvante de los lipopolisacáridos fue descrita por primera vez por Johnson y cols., en 1956 y representan las endotoxinas de las bacterias Gram-negativas (Johnson y cols., 1956). La mayoría de los estudios reportan que activan directamente a los macrófagos, y su propiedad adyuvante puede deberse a su habilidad para estimular la producción y liberación de citocinas como la IL-1 (Warren y cols., 1986). Los LPS tienen efectos directos sobre los linfocitos y es un mitógeno de células B independiente de células T (Gery y cols., 1972) y poseen una variedad de

actividades biológicas en organismos superiores, incluyendo a los humanos: por ejemplo, la pirogenicidad y toxicidad letal. Desde otro punto de vista, los LPS muestran funciones fisiológicas esenciales para las bacterias y su supervivencia (Otto y cols., 1994). Estos polímeros complejos tienen sitios de unión para anticuerpos y otros componentes del suero, por lo tanto están involucrados en el reconocimiento y la eliminación de la bacteria por el sistema de defensa del hospedero. Sin embargo, pueden proteger también a las bacterias de los mecanismos celulares de defensa del hospedero y así jugar un papel en la virulencia de la bacteria. Los LPS son considerados inmunomoduladores potentes por su capacidad de activar linfocitos B, granulocitos y células mononucleares (Otto y cols., 1994). Tanamoto y cols., postularon que las propiedades biológicas de los LPS residen en la porción de lípido A de la molécula y éste postulado ha sido ahora confirmado por la producción de una gran familia de compuestos sintéticos del lípido A con múltiples actividades incluyendo el fenómeno de Schwartzman, la pirogenicidad, mitogenicidad y letalidad (Tanamoto y cols., 1984; Kotani y cols., 1984). Los componentes de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas tales como lipoproteínas, LPS y proteína I, constituyen componentes inmunológicamente activos y altamente funcionales, activando linfocitos B humanos y de ratón; así como macrófagos/monocitos (Ballou, 1997). Varios laboratorios han preparado análogos sintéticos de los constituyentes de las paredes celulares bacterianas biológicamente activos; como el lípido A, parte de los LPS de las bacterias Gram-negativas y el MDP (Dipéptido Muramil sintético) derivado de peptidoglicano bacteriano. Es relevante mencionar que los estudios para la búsqueda de un inmunomodulador también se concentran en encontrar moléculas que sean inocuas para el humano.

En conclusión, sabemos que la superficie bacteriana tiene un arreglo de proteínas localizadas que pueden también poseer actividades inmunomoduladoras capaces de inducir protección. El proceso de identificación de éstos dominios estructurales capaces de generar protección inmunológica esta bajo un intenso estudio; tradicionalmente la evaluación y eliminación de agentes candidatos para su uso como inmunomoduladores han estado basadas en el sistema de ensayo y error. La tecnología tradicional realiza el análisis de las paredes celulares bacterianas completas, identificando proteínas inmunoreactivas mediante inmunotransferencia, purificación y determinación de secuencias parciales de aminoácidos, clonación y recientemente mediante el análisis nucleotídico de genes para su expresión mediante tecnología de ADN recombinante. Dichas metodologías consumen mucho tiempo y únicamente son identificados un número limitado de candidatos. Actualmente, el análisis de proteínas podría identificar estructuras con potencial modulador. La bioinformática permite que esta gran cantidad de información obtenida, pueda ser aplicada en la búsqueda de genes de interés utilizando fuentes genómicas conocidas. Estas metodologías modernas podrán acelerar el proceso para identificar nuevos agentes inmunomoduladores y proveer rápidamente un grupo de candidatos potenciales (Masihi, 2001).

1.1.2 Inmunomoduladores originados de células eucarióticas

Las citocinas son factores solubles no antígeno específico que son producidos mayoritariamente por leucocitos e intervienen en la regulación de las células del sistema inmune y los procesos inflamatorios. Estas moléculas reguladoras intervienen en la respuesta protectora contra neoplasias y las infecciones. Aunque algunas citocinas son producidas por células

mononucleares ya sea constitutivamente o en respuesta a señales de activación, su inducción ha mostrado estar disminuida en pacientes con enfermedades infecciosas crónicas (Balwel y Burke, 1989; Hume, 1990; Smith, 1979; Bone, 1991) por lo que podrían beneficiarse mediante la administración exógena de éstas moléculas (Lotzová, 1994). Cuando utilizamos citocinas para inducir inmunoestimulación, las ventajas locales son: 1) la habilidad para generar de manera local, altas concentraciones de citocinas, similar a la respuesta propia del organismo contra antígenos extraños; 2) la habilidad de proveer altos niveles sostenidos de citocinas con efectos parácrinos que activen el sistema inmune (Chuan-Yuan y cols., 2005). Algunas citocinas estimulan la producción de otras, de manera que interactúan, ya sea en forma sinérgica o antagónica y así sus efectos locales y sistémicos, están íntimamente involucrados en el control de las infecciones del hospedero. Los avances en el entendimiento del papel de las citocinas en los desórdenes inflamatorios e inmunes han conducido al desarrollo de inmunoterapias basadas en citocinas, debido a sus múltiples funciones reguladoras y efectoras en muchas enfermedades. Éstas moléculas, sus receptores y rutas de señalización son candidatos prometedores para una participación inmunoterapéutica (Cutler y Brombacher, 2005). El entendimiento preciso del balance crítico entre citocinas pro-inflamatorias y reguladoras en las infecciones microbianas, es fundamental para usar y regular con certeza y seguridad los efectos benéficos que se buscan mediante la terapia con citocinas, explotando así su gran potencial para aumentar la resistencia contra diversos patógenos. Los linfocitos T cooperadores (Th1) son cruciales para orquestar las respuestas de citocinas y de suma importancia para la eliminación de las enfermedades infecciosas. Estas células producen IFN- γ , TNF- β e IL-2 que son requeridas para el desarrollo efectivo de la respuesta inmune mediada por células contra microorganismos intracelulares. Por otro lado, las células T cooperadoras (Th2) producen IL-4 e IL-5 que potencian la inmunidad

humoral a antígenos dependientes de células T y la inmunidad contra infecciones por helmintos (Masihi 2001). Por lo tanto, los pacientes donde la producción de citocinas está alterada o en aquellos que reciben tratamientos con quimioterapia (aumentando la susceptibilidad a infecciones) pueden beneficiarse de la terapia con citocinas exógenas.

Las posibilidades terapéuticas con citocinas han sido investigadas de manera más activa en neoplasias que en enfermedades infecciosas: sin embargo las propiedades de algunas citocinas como las que inducen la estimulación de la proliferación, diferenciación y activación de las células hematopoyéticas y linfoides, indican su posible papel terapéutico y profiláctico en las infecciones (Lotzová, 1994). A pesar del potencial terapéutico de las citocinas, se necesita reconocer que para ser efectivas, las citocinas tienen que ser administradas en altas dosis, resultando frecuentemente en efectos adversos graves. Adicionalmente, algunos pacientes pueden no responder a una terapia de citocinas *in vivo*, debido a su estado inmunocomprometido o factores inhibidores del hospedero que afectan la proliferación, activación y diferenciación de linfocitos (Lotzová, 1994). En estos casos, las citocinas pueden ser utilizadas para una activación de linfocitos *in vitro* y para la inducción de crecimiento y diferenciación de progenitores hematopoyéticos. Estas poblaciones, propagadas y activadas *in vitro*, pueden ser transferidas a pacientes para facilitar su defensa antimicrobiana (Lotzová, 1994). Otra forma de la terapia con citocinas que ha sido aplicada satisfactoriamente es la administración de citocinas recombinantes. La IL-2 ha sido utilizada en neoplasias (Dutcher, 2002), varios derivados del IFN- α en infecciones virales y neoplasias (Marcellin y cols., 2004), la IL-11 en el tratamiento post-quimioterapéutico el cuál indujo trombocitopenia (Isaacs y cols., 1997), el IFN- γ en neoplasias y osteoporosis y el IFN- β en esclerosis múltiple (Stuart y cols., 2004). Un hallazgo

importante observado por Arendse en ratones vacunados con IL-9 fue el aumento de la resistencia a la leishmaniasis cutánea (Arendse y cols., 2005) y en otros estudios con ratones vacunados con IL-12, se inducía protección contra la encefalomiелitis experimental autoinmune (Uyttenhove y cols., 2004).

El IFN- γ derivado de célula T, es una citocina importante, que es secretada por el subtipo Th1 de las células T y al igual que otras citocinas, tiene una gran variedad de efectos sobre numerosos tipos celulares. Un efecto ampliamente descrito, es la habilidad de aumentar la actividad microbicida y microbioestático del macrófago; este parece estar mediado por un incremento en la liberación de moléculas microbicidas como óxido nítrico e intermediarios reactivos del oxígeno (Murray, 1985). Las citocinas o sus combinaciones pueden tener uso terapéutico en algunas enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la IL-1, IL-3 y los factores de crecimiento hematopoyéticos, solos o en combinación, pueden ser benéficos en el tratamiento de infecciones asociadas con neutropenias o septicemia neonatal; o en la prevención de infecciones que acompañan a la anemia aplásica, a la quimioterapia, en inmunodeficiencias o en quemaduras. La IL-2, la IL-12, el TNF- α y los interferones (IFNs), pueden ser útiles en potenciar la defensa antimicrobiana del hospedero estimulando sus células efectoras. Además, los IFNs pueden tener un efecto inhibitorio directo sobre la replicación del ciclo de ciertos agentes microbianos (Lotzová, 1994).

Las citocinas, también han sido descritas como una espada de doble filo ya que se les han atribuido tanto efectos benéficos como dañinos. Se ha reportado que la IL-12 induce diferentes mecanismos que resultan tanto en protección como exacerbación. La administración de IL-12 exógena confiere protección en ratones BALB/c susceptibles a la infección por

Yersinia enterocolitica, pero exacerba la yersiniosis en ratones C57BL/6 (Bohn y cols, 1998). La administración de IL-4 a un grupo de ratones un día previo a retarlos con *Pseudonoma aeruginosa*, mejoró la supervivencia y disminuyó la producción de TNF- α ; en cambio la IL-4 administrada simultáneamente a la infección con *P. aeruginosa* incrementó la mortalidad y los niveles de TNF- α en ratones subletalmente infectados (Giampietri y cols., 2000). La sobreexpresión de IL-13 en ratones transgénicos suprime la expresión de IL-12 e IFN- γ haciendo a los ratones C57BL/6 que son resistentes; susceptibles a la infección de *Leishmania major* (Matthews, 2000). En ratones deficientes de IL-13 se demostró un aumento significativo en la supervivencia a la infección de *Schistosoma mansoni*, mientras que se observó una mortalidad incrementada en ratones deficientes de IL-4 y en ratones deficientes de IL-4/IL-13, sugiriendo un papel perjudicial de la IL-13 (Fallon, 2000). Se ha observado que la producción exagerada de citocinas inflamatorias como TNF, IL-1 e IL-6 juega un papel deletéreo en algunas infecciones como SIDA, malaria, sepsis, entre otras (Masihi, 2001).

El síndrome de filtración capilar es el principal efecto tóxico dependiente de la dosis, de la terapia con citocinas, específicamente IL-2. Este síndrome está caracterizado por un incremento en la permeabilidad vascular acompañado por una extravasación de fluidos y proteínas resultando en edema intersticial y falla orgánica. La patogénesis del daño de las células endoteliales es compleja y puede involucrar la activación o daño de células endoteliales y leucocitos, la liberación de citocinas y de mediadores de la inflamación, la alteración de la adhesión célula-célula, matriz-célula y en la función del citoesqueleto (Baluna y Vitetta, 1997).

Las limitaciones de la terapia con citocinas también han sido reconocidas y están asociadas a su toxicidad, a su comportamiento farmacológico incierto y a sus efectos

pleiotrópicos (Masihi, 2001). La eficacia de las citocinas exógenas capaces de potenciar mecanismos normales de defensa del hospedero puede estar reducida a pacientes inmunocomprometidos que carecen de células efectoras o que contienen factores relacionados con la enfermedad que impiden la activación de linfocitos. Las adaptaciones de virus, bacterias y parásitos a la presencia de citocinas plantean problemas nuevos y habrá que elucidar los mecanismos moleculares responsables de proteger o de las actividades antagónicas de las citocinas. La aplicación juiciosa y el conocimiento de las limitaciones son imperativas en la terapia con citocinas utilizada en el manejo de las enfermedades infecciosas (Masihi, 2001).

1.1.3 Inmunomoduladores farmacológicos o sintéticos

Una serie de sustancias farmacológicas han sido utilizadas como inmunomoduladores para aumentar las respuestas antineoplásicas o antinfeciosas con resultados variables en su eficacia.

La **talidomida** se sintetizó por primera vez en el año de 1954 por los laboratorios Chemie Grünenthal, en Alemania, con el nombre molecular de amida de ácido itilglutámico. Conocida por sus efectos sedantes e hipnóticos, y utilizada en el tratamiento de la hiperemesis gravídica. Sin toxicidad entonces reconocida, ya que fue probada en ratones a dosis de hasta 10,000 mg/kg sin observar efectos colaterales fatales (Powell y cols., 1996). Cuatro años después de su creación la talidomida fue retirada del mercado debido a graves problemas de teratogénesis en productos de madres tratadas con el fármaco, caracterizadas por amelia, focomelia, desarrollos defectuosos en brazos, piernas o bien alteraciones masivas internas

(George, 1999). La administración de alimentos y drogas (FDA) en EUA aprobó finalmente la comercialización del fármaco el año de 1998, para su uso en pacientes con lepra (Lesli, 1998). El interés de la talidomida a más de cuatro décadas de haber sido retirada, resurgió por sus propiedades inmunológicas y antiinflamatorias, ya que modula la síntesis de citocinas, especialmente del factor de necrosis tumoral alfa (FNT α) *in vitro* e *in vivo* (Powell y cols., 1996). Sampaio y cols. lograron demostrar la inhibición selectiva de la síntesis del FNT α por los monocitos, al reducir la vida media del ARN mensajero de esta citocina, cuyo papel es de suma importancia en la respuesta del hospedero a procesos infecciosos de etiología viral, parasitaria, micótica o bacteriana, así como también en patologías autoinmunes (Sampaio y cols., 1991). La talidomina también altera la densidad de las moléculas de adhesión en los leucocitos inducidas por el FNT α . Inhibe la fagocitosis realizada por los polimorfonucleares (Barnhill y cols., 1984) y tiene propiedades coestimuladoras en células T con aumento de la producción de interleucina 2, la cual tiene un papel importante en el efecto antiangiogénico de la talidomida (Vanchiere, 1997; Corral y Kaplan, 1999). Por último, influye sobre la quimiotaxis leucocitaria al inhibir la migración de monocitos y linfocitos al tejido afectado, en relación directa con la dosis (Meierhofer y cols., 1999). Varios análogos de la talidomida han sido sintetizados y evaluados para actividades antineoplásicas y anti-inflamatorias (Steven, 2005). La talidomina y sus análogos son potentes inhibidores de la producción de FNT- α por monocitos estimulados por LPS (Corral y cols., 1996). Esta inhibición es debida al incremento de la degradación del ARNm del FNT- α por la talidomida. La producción de otras citocinas como IL-1 β , IL-6 y el factor estimulador de colonias de granulocitos también es inhibida por la talidomida, mientras la IL-10 es estimulada (Corral y cols., 1999). Este fármaco ha mostrado

coestimular a linfocitos T, induciendo su proliferación, producción de citocinas y actividad citotóxica (Haslett y cols., 1998). La coestimulación involucra la entrega de una segunda señal a células naive para producir una respuesta antígeno específica (Steven, 2005). A su vez, la talidomina también ha mostrado disminuir la densidad de moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y la selectina E de la superficie celular, inducidas por FNT- α en células endoteliales de cordón umbilical en humanos, de esta manera disminuyendo la respuesta a un estímulo inflamatorio (Geitz y cols., 1996). Su incrementada potencia como inmunomodulador y anti-angiogénico y la aparente ausencia de efectos colaterales, han convertido a la talidomida y a sus análogos en potentes terapéuticos contra la neoplasia (Steven, 2005),

Otro ejemplo de fármaco inmunomodulador es el **Imiquimod**, con actividad antiviral, antitumoral e inmunomoduladora (Miller y Col, 1999; Marini, 2002). Este compuesto es una amina imidazoquinolina que potencia la respuesta inmune e induce IFN- α , IFN- γ e IL-12 (Sauder, 2000) y ha sido probada por la FDA de los Estados Unidos para el tratamiento de verrugas genitales causadas por papilomavirus humano. El imiquimod y sus compuestos relacionados como el S-28463, han mostrado estimular efectivamente la actividad leishmanicida (*L. donovani*) asociada con la síntesis de NO en macrófagos *in vitro* e *in vivo* en un modelo de ratón (Buates y Matlashewski, 1999). Además de la inducción de IFN- α y otras citocinas, también son inducidos otros efectores de la respuesta innata. Esto incluye la estimulación de la actividad de las células NK, la activación de macrófagos para producir óxido nítrico y la inducción de linfocitos B para proliferar y diferenciarse (Miller y cols., 1999). Las células de Langerhans, las principales células presentadoras de antígeno, también responden a la aplicación del imiquimod potenciando su migración a la región de los ganglios linfáticos, incrementando la

presentación de antígeno a las células T (Suzuki y cols., 2000). Se propone que la actividad antiviral y antitumoral del imiquimod en modelos animales proviene de la estimulación de la respuesta inmune innata y la inmunidad mediada por células. Se observó que los anticuerpos contra INF- α de ratón, bloquearon muchos de los efectos antivirales agudos y antitumorales, indicando que el IFN- α , como parte de la respuesta inmune innata, es parcialmente responsable de esta actividad (Sidky y cols., 1992).

1.2 Fármacos antiparasitarios

Ciertos fármacos antiparasitarios han mostrado tener una actividad inmunomoduladora; entre ellos se encuentran el levamisol (Naylor y Hadden, 2003; Mojzisova y cols., 2004), tiabendazol (Blecha, 1988), fenvalerato (Singhal y Chauhan, 2001), dieldrin (Flipo y cols., 1992), oxfendazole (Stankiewicz y cols., 1994), fenbendazole (Dvoroznakova y cols., 1998), niridazol, metronidazol (Hewlett y cols., 1981), carbofurano (Flippo y cols., 1992) e ivermectina (Sajid, 2004). Los efectos inmunomoduladores de estos fármacos antiparasitarios, han sido estudiados en enfermedades infecciosas bacterianas, virales, micóticas y helmínticas, así como en enfermedades neoplásicas y autoinmunes (Sajid y cols., 2006).

Como un fármaco representativo de este grupo de agentes tenemos el **levamisol**, (Clorhidrato de levo-2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazo (2,1-b) tiazol) y miembro de los tioimidazoles, inicialmente desarrollado como un antihelmíntico y usado extensamente para el tratamiento de helmintos gastrointestinales y tisulares (Thienpont y cols., 1966). Posteriormente, éste fármaco recibió una considerable atención como inmunomodulador y fue el primer agente

químicamente definido que mostró tener tal efecto (Webster, 1985; Renoux, 1986). Se han realizado diversos estudios para demostrar la actividad inmunomoduladora del levamisol, algunos de ellos con resultados contradictorios. Este fármaco, cuando fue administrado en combinación con la vacuna de parvovirus canino, potenció la producción de anticuerpos contra el parvo-virus, incrementó la actividad fagocítica y estimuló la actividad de proliferación de linfocitos (Mojzisova y cols., 2004) y de manera similar potenció la respuesta protectora de anticuerpos a la vacunación contra hepatitis B en pacientes con hemodiálisis (Kayatas, 2002). Aunque se cree que el levamisol no afecta directamente los linfocitos B, puede influir en la respuesta humoral indirectamente, afectando macrófagos y células T (Pelletier, Willoughby y Giroud, 1978) y esta inmunopotenciación es pronunciada en pacientes inmunocomprometidos (Hadden, 1994). El efecto del levamisol sobre la inmunidad celular es principalmente sobre linfocitos T deprimidos o anérgicos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Guerrero, 1977). Se le atribuye actividad timo-mimética en la diferenciación de células T (Naylor & Hadden, 2003) y se sugiere su uso como adyuvante para la vacuna oral experimental F4ac⁺ contra *E. coli* en cerdos, al estimular el tejido inmune en la lámina propia y las Placas de Peyer (Bozic y cols., 2002). Actualmente, el uso terapéutico del levamisol se relaciona con la actividad moduladora y adyuvante en el caso de neoplasias como la enfermedad de Hodking y en el adenocarcinoma colorectal (Sceto y cols., 2000, Chirigos, 1992; Kumran, 1993). Como se mencionó, el efecto inmunomoestimulador del levamisol no ha podido ser demostrado por todos los investigadores dedicados a su estudio (Sajid y cols., 2006), y a pesar de su uso actual, es necesario establecer consistentemente su efecto benéfico y modulador.

1.2.1 Antiparasitarios: Ivermectina y Dietilcarbamacina

Existen otros fármacos antiparasitarios, que han sido evaluados como inmunomoduladores con uso potencial como moduladores positivos. Tal es el caso de la ivermectina y la dietilcarbamacina. De manera interesante, en la revisión realizada por Sajid en el 2006, donde describe fármacos antiparasitarios con actividad inmunomoduladora, se describen el levamisol y la ivermectina entre otros, pero no la dietilcarbamacina, en la cual también se ha observado un efecto inmunomodulador además de su efecto antiparasitario (Mackenzie, 1980; Kephart y cols., 1984; Medina-De la Garza y cols., 1992, Kitchen y cols., 1992, 1993). En este trabajo, nuestro interés se enfoca a dos de éstas drogas antiparasitarias: la ivermectina y la dietilcarbamacina.

1.2.1.1 Ivermectina

Desde 1970 se inició la investigación de nuevas sustancias que tuvieran propiedades antihelmínticas. Más de 40 000 actinomicetos fueron estudiados en Estados Unidos y Japón, siendo *Streptomyces avermitilis* (presente en el suelo), el único que mostró producir un grupo de compuestos antihelmínticos a los que llamaron avermectinas (Burnham & Membrahtu, 2004). Varios derivados de las avermectinas se prepararon y analizaron: abamectina, ivermectina y doramectina. Después de evaluarlos, teniendo en cuenta su seguridad y eficacia, se seleccionó a uno de ellos, la ivermectina. La ivermectina es un análogo semisintético de la Avermectina B1a (Abamectina), una lactona macrocíclica de amplio espectro de administración oral, similar a otros antibióticos macrólidos pero desprovista de acción antibacteriana y con gran

acción contra una gran variedad de nematelmintos y ácaros: por ello ha sido usada en el mundo entero tanto en animales como en humanos para el control de esas parasitosis (Escalante y Valdivia, 2003).

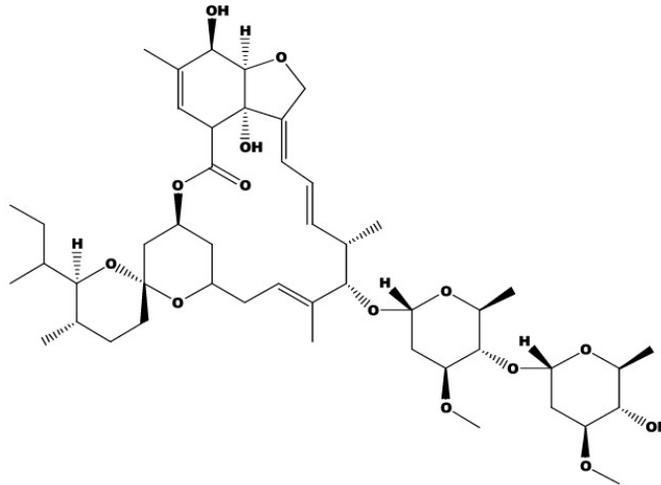


Fig 1. Estructura química de la ivermectina

En el humano la ivermectina ha sido ampliamente empleada para el control de la oncocercosis y se estima que su administración se ha llevado a cabo por más de 20 años en más de 10 millones de individuos de 30 países, lo que ha permitido controlar la enfermedad. A través de su uso se ha conocido mejor su mecanismo de acción, su tolerancia y efectos colaterales. En las regiones del mundo donde la oncocercosis es endémica, la ivermectina se prescribe a dosis de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cada 3 a 12 meses, siendo utilizada tanto como profiláctico y uso terapéutico. El conocimiento de su efecto acaricida, determinó que en 1992 Glazion iniciara un estudio doble ciego en adultos para el tratamiento de la escabiosis humana. El investigador la comparó contra un efectivo y conocido escabicida: el benzoato de bencilo al 10% en aplicación tópica por tres

noches consecutivas. La dosis de ivermectina oral administrada fue de 100 µg/kg en dosis única. Un mes después se valoró a los pacientes, encontrando que un 70% de los tratados con ivermectina habían curado, contra el 48% de los tratados con benzoato de bencilo. La ivermectina se administra sólo por vía oral en humanos y actualmente se ha definido que la dosis única y útil de ivermectina para el tratamiento de la escabiosis es de 150 a 200 µg/kg. Estudios previos han reportado que dosis menores son insuficientes. La dosis única de 200 µg/kg es eliminada lentamente del organismo, su vida media es de casi 16 h. La excreción del medicamento y de sus metabolitos es casi exclusivamente en las heces (Katzung, 2005). Los datos antes mencionados son sumamente relevantes por el extenso uso de la ivermectina como ectoparasiticida y aun por sus posibles limitaciones medioambientales de su uso masivo en medicina veterinaria (Iglesias y cols., 2006).

La ivermectina administrada a las dosis antes mencionadas, se excreta en bajas concentraciones por la leche materna alcanzando su más alta concentración dentro de 4 a 12 horas (P.R. Vademecum, 2006). No hay estudios de toxicidad en lactantes alimentados con leche materna de madres tratadas con ivermectina; sin embargo, se recomienda evitar su administración a mujeres lactantes. En resumen, a la fecha los múltiples estudios que aparecen en la literatura médica, han demostrado que la ivermectina es una opción terapéutica eficaz y segura para el tratamiento de todas las formas de escabiosis incluyendo las graves (sarna noruega o costrosa) (Barbosa y cols., 1999), así como en niños con escabiosis que cursan con tratamientos o enfermedades inmunosupresoras, que responden mal a los tratamientos habituales (Patel y cols., 1999).

1.2.1.1.1 La ivermectina y su uso como inmunomodulador

La 22,23-dihidroavermectina B1a o Ivermectina (IVM), es un análogo semi-sintético de la avermectina B1a (abamectin) originalmente aislado de la fermentación de *Streptomyces avermitilis*. La ivermectina provoca la inmovilización de los parásitos induciendo una parálisis tónica de la musculatura (Fernández y Fernández, 2000). Ésta parálisis es mediada por la potenciación y/o activación directa de los canales de Cloro (Cl⁻) sensibles a ivermectina, controlados por el glutamato. Esos canales están presentes sólo en los nervios y células musculares de los invertebrados y una vez elevados, acarrear un aumento en la permeabilidad de la membrana celular a los iones cloro mediante hiperpolarización de los nervios o células musculares, resultando en parálisis y muerte del parásito (Revectina, 1999). Además es extensivamente utilizado para controlar y tratar una amplia variedad de parásitos nemátodos (gusanos redondos) y artrópodos (insectos, y ácaros) que atacan el ganado y otros animales domésticos. Sin embargo, ha crecido la evidencia de que la actividad de la IVM puede no estar limitada estrictamente a la neurofisiología de los parásitos, sino que también puede influir el sistema inmune del hospedero (Rao y cols., 1987).

Blakley y Rousseaux en 1991, realizaron un estudio donde se evaluó el efecto de la ivermectina sobre la respuesta de anticuerpos dependiente de células T utilizando glóbulos rojos de carnero y la respuesta de anticuerpos independiente de células T, usando como antígeno el dinitro-ficoll, en ratones CD-1 y observaron que la respuesta dependiente de las células T era potenciada comparada con la respuesta independiente de T bajo el tratamiento de la IVM, por lo que se relacionó su efecto con la función de los linfocitos T y su posible aplicación en diferentes grados de inmunosupresión asociados a estrés, enfermedades infecciosas o deficiencias

nutricionales (Blakley y Rousseaux, 1991). También se encontró que la IVM a una dosis terapéutica, alteraba la cuenta de linfocitos sin afectar la concentración de inmunoglobulinas totales del suero, proteínas totales en el suero o el índice fagocítico en animales (Savanur y cols., 1996). Sin embargo en estudios previos, se encontró que en conejos tratados con IVM se incrementaba la concentración de las inmunoglobulinas totales antígeno-específicas y las proteínas totales en el suero (Savanur y cols., 1995).

Estudios realizados en conejos, determinaron que la IVM tiene una respuesta inmunopotenciadora dependiente de la dosis contra el antígeno tipo II de *Pasteurella multocida* (un polisacárido capsular) y glóbulos rojos de carnero, es decir, conforme aumenta la dosis se incrementa la respuesta inmunológica y viceversa. La inmunidad mediada por células fagocíticas, determinada por la actividad fagocítica y la prueba de NBT; y la inmunidad humoral, determinada por el ensayo de hemaglutinación indirecta y la formación de placas hemolíticas de Jerne, se incrementaron significativamente en los grupos tratados con IVM (Sajid, 2004).

Después del tratamiento con la IVM se incrementó significativamente la producción de IL-1 β y TNF- γ inducida por *Oncocherca volvulus*; de la misma manera aumentó, un mes después del tratamiento, la producción de IL-2 e IL-4 inducida por fitohemaglutinina. Estos resultados sugieren que la inmunosupresión mediada por la *Oncocherca* es reversible, con la subsecuente eliminación permanente de las microfilarias de la piel, posterior al tratamiento con ivermectina. La inmunidad celular específica contra el parásito y la producción consistente de IL-2 e INF- γ contribuyen al control de la reinfección (Soboslay y cols., 1994). Un estudio

comparativo de los efectos de la dietilcarbamacina e ivermectina sobre la respuesta inmune antígeno-específica filarial concluyó que no había diferencias significativas entre los dos fármacos antiparasitarios en términos de reactividad celular y humoral al antígeno filarial (Lammie y cols., 1992). Aunque se cree que la ivermectina y la dietilcarbamacina ejercen su actividad antiparasitaria por mecanismos diferentes, se observó el mismo patrón de cambios serológicos en los pacientes tratados con cualquiera de las dos drogas para el control de la microfilaremia (Zheng y cols., 1991). Sin embargo, en este estudio se mostró que la IVM tiene un efecto sinérgico sobre los factores inmunes del hospedero contra la infección (Rao y cols., 1987).

En 1993 Tischendorf y cols., estudiaron los efectos moduladores de tres diferentes drogas antihelmínticas, entre ellas la IVM, sobre las células efectoras eosinofílicas, específicamente la producción del anión superóxido y la generación de peróxido de hidrógeno *in vitro*. Ellos observaron que los eosinófilos pretratados con IVM (40 ng/ml) incrementaban la producción del anión superóxido, sin embargo la inhibición de la generación de este metabolito ocurría seguida a la administración de altas concentraciones de IVM (1000 ng/ml); además de que estos efectos moduladores fueron dependientes de la dosis. En cuanto a la generación del peróxido de hidrógeno se observó de la misma manera que con una dosis baja de IVM (20 ng/ml) se incrementaba hasta en un 12 % la producción de este metabolito; por lo que concluyeron que éstos efectos moduladores en la generación de radicales tóxicos de oxígeno por parte de los eosinófilos, mediante estos antihelmínticos, en especial la IVM, eran dosis-dependientes.

La presencia de microfilarias en la piel de pacientes con oncocercosis disminuye la acción del sistema inmunológico en lo referente al reconocimiento adecuado de antígenos del gusano adulto de *O. volvulus*. Esto se demostró por disminución de la respuesta proliferativa hacia los antígenos del adulto completo observada en pacientes con microfilarias positivas. La reducción de las microfilarias con una sola dosis de IVM, demostró ser suficiente para reducir parte de la inmunosupresión a determinados antígenos *in vitro*, lo que podría sugerir la presencia *in vivo* de células T de memoria iniciales a los antígenos de *O. volvulus* los cuáles son enmascarados en la presencia de las microfilarias (Soboslay y cols., 1991). Es posible que la presencia de altas concentraciones de algunos antígenos *in vivo* tengan efectos reguladores a la baja (a través de las citocinas que ellos inducen) y la eliminación de estos antígenos, ayudado por el tratamiento con la IVM, permita a las células T reactivas responder al reto de la proliferación (Akuffo y cols., 1996). Por ello, los autores de este trabajo concluyeron que el tratamiento con la IVM puede modular la respuesta inmune, permitiendo el reconocimiento *in vitro* de los antígenos a los cuáles las células de pacientes con oncocercosis no responden previamente (Akuffo y cols., 1996).

Debido a los diversos reportes acerca del efecto inmunopotenciador de la IVM, Sajid y colaboradores realizaron un estudio en conejos, donde se evaluó la respuesta inmune tanto celular y humoral posterior a un tratamiento con diversas dosis de IVM (200, 400 y 600µg/kg); evaluando la inmunidad celular a través de la prueba de Dinitroclorobenceno (DNCB) y ensayos de fagocitosis; la inmunidad humoral se determinó mediante hemaglutinación contra un antígeno de *P. multocida* y la formación de placas hemolíticas de Jerne. La reacción de hipersensibilidad retardada, determinada por la prueba de DNCB aumentó en conejos tratados

con IVM en comparación con los no tratados. La fagocitosis también se observó incrementada y se cree que puede ser debido al efecto inmunoestimulador de la IVM o a una mayor expresión de receptores de superficie de los fagocitos. La IVM tuvo en este estudio un efecto significativo sobre la cinética de los anticuerpos de los conejos contra un antígeno específico (*P. multocida*). La conclusión del estudio fue que la IVM en dosis terapéuticas tenía un pequeño pero significativo efecto inmunoestimulador que coincidía con los estudios previos realizados por Blakley y Rousseaux (Sajid y cols., 2007).

1.2.1.2 Dietilcarbamacina

La dietilcarbamacina (1-Dietilcarbamil-1-4-metil piperazina) ha sido utilizada en el tratamiento de enfermedades parasitarias humanas y veterinarias, particularmente infecciones por filarias. Su acción antifilarial fue descubierta y descrita por Hewitt (Hewitt y cols., 1947). La dietilcarbamacina ha sido utilizada contra todas las filariasis humanas: *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Loa loa*, *Mansonella ozzardi*, *Mansonella perstans*, *Mansonella streptocerca*, *Onchocerca volvulus* y *Wuchereria bancrofti* (Mackenzie y Kron, 1985). La dietilcarbamacina (DEC) fue probada para su uso en el tratamiento de la oncocercosis en México por Mazzotti en 1947 (Mazzotti, 1948). Mazzotti observó asimismo efectos secundarios graves luego de la administración del fármaco en individuos altamente infectados con *Onchocerca volvulus* (medido esto por el número de microfilarias por mg de piel), en lo que posteriormente fue bautizado como “reacción de Mazzotti”. Esta reacción ha sido usada como un recurso diagnóstico de uso restringido para detectar la presencia de *O. volvulus* en individuos con biopsias dérmicas negativas.

Químicamente la DEC es un derivado carbamilo sintético de la piperazina; puede ser sintetizado en forma salina como hidrocloreto, palmoato o dicitrato y es rápidamente soluble en agua. La forma cristalina esta comercialmente disponible bajo una variedad de nombres: Banocide (Wellcome, UK) o Hetrazan (Lederle, UK). El consenso terapéutico moderno recomienda la administración de la DEC en la forma de dicitrato (Abdi y cols., 1995).

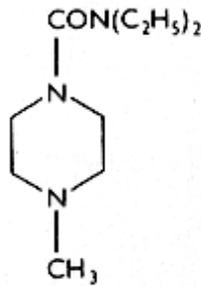


Fig 2. Estructura química de la dietilcarbamacina

En el humano se han probado varios esquemas de dosificación oral, adaptados a la gravedad de la enfermedad filarial y a las reacciones secundarias que puedan ser inducidas. La vida media en plasma de la DEC luego de una dosis oral única de 200-400 mg en voluntarios normales varia desde 6.1 a 8.1 h. Una dosis estándar de 200 mg de DEC produce un pico de concentración en sangre de 1.5-2.0 $\mu\text{g/ml}$ en 2h (Ree y cols., 1979). Investigaciones anteriores mostraron que una dosis única de 10 mg/kg produce un pico de concentración en sangre de 4-5 $\mu\text{g/ml}$ en 3h el cual declina a cero a las 48 h. La droga alcanza todas las partes del cuerpo en 20-25 min (Hillman y cols., 1983). La absorción rápida por el tracto gastrointestinal y la rapidez con que alcanza altas concentraciones plasmáticas parecen contribuir a los graves efectos secundarios vistos en individuos infectados con filarias.

1.2.1.2.1 La Dietilcarbamacina y su efecto sobre el sistema inmune

La DEC es un microfilaricida con moderado efecto macrofilaricida, es decir, tiene mayor efecto contra la larva que contra el gusano adulto. La característica mas notable y sorprendente de la DEC es que no tiene efecto sobre las microfilarias *in vitro* (Maisels y Denham, 1992). En contraste a este efecto, la DEC ejerce una respuesta inmediata *in vivo*. La inyección intravenosa de DEC en pacientes infectados con filarias sanguíneas, provoca la disminución de hasta 60% de las microfilarias circulantes en cuatro minutos y en ratas se logra observar hasta el 80% de eliminación de las microfilarias en sangre (Hawking y cols., 1950). La interpretación original de este efecto fué que la DEC actuaba como una opsonina, modificando a las microfilarias, para su posterior captura y destrucción por células del sistema fagocítico mononuclear. La DEC induce la movilización de las microfilarias por efecto directo sobre el sistema neuromuscular de los parásitos (Mackenzie y Kron, 1985). La administración de la DEC parece potenciar la acción de la acetilcolina microfilarial y resultar en un incremento en la movilidad parasitaria. En la infección por *W. bancrofti* la DEC moviliza a las microfilarias del pulmón a la circulación general. Alteraciones en cAMP/cGMP en las microfilarias pudieran contribuir a esta movilización del parásito (Mackenzie y Kron, 1985). Los parásitos son atrapados por los fagocitos en los capilares esplénicos y hepáticos luego de la administración de la DEC. La observación directa de las microfilarias circulantes en los vasos hepáticos de ratas aldoneras (*Sigmodon hispidus*) revelaron que minutos después de la administración de la DEC las microfilarias se adhieren a las paredes de los capilares. La adherencia de las microfilarias a los capilares y a los fagocitos fijos (por ejemplo células de Kupffer) en presencia de DEC podría ser debido al mismo mecanismo por el cual se promueve la adhesividad de los eosinófilos *in vitro*

(King y Nutman, 1991). Martínez-Báez y colaboradores, describieron la muerte de las microfilarias de *O. volvulus* en tejido luego de la administración de DEC y los infiltrados celulares mononucleares que rodearon estos parásitos: linfocitos y macrófagos (Martínez-Báez, 1949). Como se puede observar, en los efectos descritos para la DEC en su mecanismo antifilarial, se involucra principalmente a efectores del sistema inmune. La DEC tiene efectos fisiológicos directos sobre los granulocitos; horas después del tratamiento con la DEC, los eosinófilos tisulares se desgranulan en la superficie de las microfilarias (Mackenzie, 1980; Kephart y cols., 1984). La DEC induce la vacuolización de leucocitos *in vitro* de una manera dosis dependiente, los eosinófilos parecen ser más sensibles a esta acción que los neutrófilos (Kephart y cols., 1984). En los neutrófilos, la microscopia de luz demostró que la vacuolización fue más marcada entre dosis de 0.5 y 1.0 mg/ml, una concentración suprafisiológica de DEC. Niveles menores a 0.1 mg/ml no indujeron vacuolización, aunque estudios mas recientes sugieren que éstas células liberan enzimas a bajas concentraciones de la droga. En estudios efectuados en nuestro laboratorio mediante microscopía electrónica, mostraron que la vacuolización de los neutrófilos puede darse a concentraciones terapéuticas de 10 µg/ml de DEC (Medina-De la Garza y cols., 1992).

Las plaquetas también parecen ser influenciadas por la DEC. Cesbron y col. en 1987 demostraron que las plaquetas de voluntarios humanos no infectados tratados con DEC, se adhirieron a las microfilarias de *Loa loa in vitro*, y que plaquetas normales que recibieron DEC *in vitro*, también fueron capaces de eliminar microfilarias de *Brugia* (Cesbron y cols., 1987). Un hallazgo frecuente de diferentes grupos de trabajo es que la DEC incrementa la velocidad y el grado de adherencia de las microfilarias a las paredes vasculares, a plaquetas y a granulocitos

(Kephart y cols., 1984; Racz y cols., 1982; Medina-De la Garza y cols., 1990). En el sistema *Litomosoides sigmodonti/Mastomys*, más del 99% de las microfilarias en circulación se encuentran normalmente libres de cualquier célula adherida; no obstante, a las 4h de la administración de DEC, el 21 % de las microfilarias se encontraron adheridas a leucocitos (Zanher y cols., 1978). La adherencia de los eosinófilos en particular se incrementa de manera considerable por el tratamiento con DEC y su capacidad citotóxica se ve aumentada, medida como la capacidad de matar a las microfilarias (Kephart y cols., 1984, Racz y cols., 1982; Medina-De la Garza y cols., 1990).

1.2.1.2.2 La Dietilcarbamacina como Inmunomodulador Terapéutico

Los puntos tratados con anterioridad sugieren que la DEC ejerce su mecanismo de acción *in vivo* actuando en estrecha relación con el sistema de defensa del hospedero y ejerciendo funciones inmunomoduladoras. Como ya se mostró, la DEC es un inhibidor de la vía lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico, inhibiendo de manera dependiente de la dosis, la formación de leucotrienos A₄, B₄ y C₄. Asimismo, también se ha observado que la DEC inhibe de manera reversible la agregación plaquetaria, sugiriendo así un posible efecto sobre la vía de la ciclooxigenasa. Estos ejemplos nos indican un comportamiento aparentemente paradójico de la droga en lo que respecta al evento inflamatorio, ya que por una parte se observa una actividad estimulante y pro-inflamatoria con respecto a los efectores fagocíticos y por la otra se tiene un efecto anti-inflamatorio con respecto a los mediadores derivados del ácido araquidónico. Por otro lado, con anterioridad se ha mostrado la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias estimuladas por la DEC (Medina-De la Garza y cols., 1996). También se

demonstró la producción *in vitro* e *in vivo* de la β -quimiocina RANTES (*Regulated on Activation Normal T Cells Expressed and Secreted*) (Medina-De la Garza y cols., 2000; Medina-De la Garza y cols., 2002) en individuos sanos y en células obtenidas de ellos. Es atractivo, cuando menos teóricamente, contar con inmunomoduladores que puedan modificar *in vivo* la producción de quimiocinas ya que por ejemplo en el caso de la infección por VIH, la presencia de la quimiocina RANTES se relaciona con protección contra la progresión de la infección (Paxton y cols., 1998; Zagury y cols., 1998, Masihi, 2001).

En modelos animales se han hecho estudios sobre la respuesta de anticuerpos bajo la influencia de la DEC. Kitchen y colaboradores estudiaron la producción de anticuerpos en gatos inmunizados e infectados con el virus de la leucemia felina (FeLV) (Kitchen y Cotter, 1988). Cuando el tratamiento con DEC inició inmediatamente después del diagnóstico de la infección retroviral, se encontró una disminución en los niveles del virus en la circulación, así como una disminución de la velocidad de descenso del número de linfocitos periféricos (Kitchen y cols., 1988). Un estudio paralelo indicó que el tratamiento con DEC administrado junto con una sola dosis de Leukocell[®] (vacuna contra FeLV) aumentó el título y la duración de anticuerpos protectores en el suero (Kitchen, 1987). Por otro lado, Nelson y colaboradores utilizaron DEC como adyuvante en el tratamiento del linfoma causado por el FeLV encontrando resultados similares a los de Kitchen, con un aumento de las cuentas leucocitarias y un aumento de la sobrevivencia de los animales (Nelson y cols., 1995). El grupo de Kitchen reportó que el tratamiento con DEC estaba asociado con la prolongación de la supervivencia de ratones infectados con el virus de la leucemia murina (CAS-BR-M) (Kitchen y cols., 1990). Ambos retrovirus, el felino y el murino, provocan inmunodeficiencia análoga a la infección causada por los retrovirus

linfotrópicos-T humanos (HTLV-II). En estudios donde se trató con DEC a animales inmunosuprimidos farmacológicamente con ciclofosfamida e infectados experimentalmente con bacterias como *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, y hongos como *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, el tratamiento se relacionó con la disminución de los microorganismos infectantes en órganos como cerebro, riñón y pulmón. Asimismo, se evaluó en un modelo de ratón el efecto de la DEC sobre la administración de una vacuna comercial contra *Streptococcus pneumoniae*; los resultados de este experimento sugieren que la DEC aumentó el título de anticuerpos contra el *Streptococcus pneumoniae* (Kitchen y cols., 1992). Estos mismos autores estudiaron el efecto de la DEC asociado con el antifúngico fluconazol. En este estudio utilizaron ratones infectados experimentalmente con *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, observando que la DEC potenció el efecto terapéutico del fluconazol, medido por la disminución de los niveles de microorganismos en cerebro y riñón de los animales tratados con ambos fármacos en comparación con los tratados solo con fluconazol (Kitchen y cols., 1993).

Por otro lado, en nuestro laboratorio en el 2003, Guerrero-Ramírez realizó un estudio utilizando dosis terapéuticas de DEC en ratón BALB/c, ampliamente conocido como inmunocompetente. Y observó que usando la dosis terapéutica alta de DEC se inducía un estímulo en la respuesta fagocítica, a través del incremento del estallido respiratorio tanto en polimorfonucleares como células monocíticas, es decir en la respuesta inmune innata. En cambio, con la dosis terapéutica baja de DEC, hubo un incremento de la IL-2 e IL-12 en ratones inmunizados previamente con TT (toxoides tetánico), sugiriendo una respuesta tipo Th1. La DEC aumentó también la producción de IL-10 y disminuyó la producción de IL-2 en ratones

inmunizados con LPS, sugiriendo una respuesta tipo Th2. Por lo que podemos decir que a una dosis terapéutica baja de DEC induce un estímulo en la respuesta inmune humoral y celular, es decir, en la respuesta inmune adquirida.

La búsqueda de inmunomoduladores y adyuvantes es una tarea larga, difícil y cara, y por ello las pruebas iniciales deben ser conducidas en modelos de ratón estables y conocidos, como lo fue en el caso de Guerrero-Ramírez. Si bien la experiencia indica que compuestos que parecen prometedores en modelos de ratón, no funcionaron en el humano, los resultados obtenidos por Guerrero-Ramírez, y por otros investigadores (en humanos y animales) nos sugieren que el uso experimental como inmunomodulador y/o adyuvante de la DEC esta justificado y que existe apoyo experimental para su uso como adyuvante en la administración con antirretrovirales y antimicrobianos, como agente para la prevención–tratamiento de complicaciones por hongos y bacterias oportunistas en animales o individuos inmunosuprimidos y como adyuvante en la aplicación de vacunas.

1.3 Inmunomodulación en el tratamiento de enfermedades infecciosas

En la experiencia clínica es bien conocido, que el tratamiento antibiótico en las infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos no siempre es satisfactorio. Varios factores pueden contribuir a la falta de éxito. Un factor importante es la falla del mecanismo de defensa del hospedero para proveer un soporte adecuado para el tratamiento de antibióticos en el sitio de infección. Como ya se dijo, la administración de agentes que estimulen la resistencia antimicrobiana puede mejorar el tratamiento de las infecciones del hospedero inmunosuprimido.

Actualmente, las infecciones continúan siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Cada individuo es susceptible a sufrir infecciones sin importar el estatus socioeconómico, sexo, edad o grupo étnico. De acuerdo a la OMS, por lo menos 30 nuevas enfermedades infecciosas han emergido en las últimas dos décadas. La actitud complaciente de que las enfermedades infecciosas eran tratables y un problema del pasado, prevaleció desde los años 50s hasta los 80s y contribuyó a una drástica disminución de los fondos destinados a las medidas de control. Las infecciones emergentes, tales como la tuberculosis, que causó gran devastación en el siglo 19, han resurgido de manera impetuosa. Las drogas antimicrobianas han sido un instrumento que ha salvado la vida de millones de personas en el mundo; sin embargo, la cura mágica de los antibióticos está siendo desgastada por la resistencia emergente de los microorganismos a las drogas. Esto se ha evidenciado por los efectos adversos en el control y tratamiento de enfermedades mortales causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y *Plasmodium falciparum* (Masihi, 2001). Las infecciones en niños, mayormente causadas por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, se han convertido en drogo-resistentes. Casi el 90% de cepas de *S. aureus* y cerca del 40% de las cepas de *Streptococcus pneumoniae* son resistentes a la penicilina, la cuál fue introducida en los años 40s. *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Shigella dysenteriae* se han reportado como multi-drogo resistentes. Las opciones de antibióticos para el tratamiento de infecciones comunes por bacterias, virus, parásitos y hongos se han limitado e incluso no existentes en algunos casos. La lucha por el control de las enfermedades infecciosas, lejos de estar por terminar, ha adquirido una nueva intensidad; por lo cual se necesitan urgentemente nuevos enfoques e ideas terapéuticas que actúen junto con las terapias establecidas.

Los agentes inmunoestimuladores son capaces de potenciar los mecanismos de defensa del hospedero para proveer la protección contra las infecciones. La principal promesa de los nuevos inmunomoduladores cae en su amplia actividad contra patógenos microbianos y en un modo de acción que es diferente de la acción microbicida directa de antibióticos, antivirales y antifúngicos establecidos. Prevenir la existencia y emergencia de las enfermedades infecciosas es un esfuerzo multidisciplinario y multifacético (Masihi, 2001).

1.3.1 Inmunomodulación e Infecciones de difícil tratamiento: Nocardiosis y micetoma por *Nocardia brasiliensis*

El advenimiento de la era antibiótica condujo a un cambio en la terapia no específica de patógenos contra las enfermedades infecciosas. Esto condujo a un énfasis hacia patógenos microbianos blanco, mientras se abandonaban las estrategias dirigidas hacia potenciar la inmunidad del hospedero (Masihi, 2000). Las opciones de drogas para el tratamiento de infecciones comunes de bacterias, virus, parásitos y hongos son limitadas y en algunos casos inexistentes, de ahí el interés en el descubrimiento de nuevas formas terapéuticas. La lucha por el control de las enfermedades infecciosas, ha adquirido una nueva dirección, hacia nuevos agentes que actúen como adyuvantes a las terapias ya establecidas (Masihi, 2001). En este contexto, se han realizado estudios donde se evaluó la actividad inmunomoduladora de la dietilcarbamacina y la ivermectina, además de su actividad antiparasitaria en diversas enfermedades producidas por microorganismos bacterianos. Entre los diferentes tipos de patógenos bacterianos conocidos, se encuentran los microorganismos intracelulares. El ingreso de los patógenos en las células hospederas, las ubica en un ambiente rico en nutrientes, y es una

de las estrategias utilizadas que en condiciones apropiadas, le permite sobrevivir, multiplicarse y escapar del sistema de defensa del hospedero. Patógenos facultativos intracelulares, en los que se incluyen algunos parásitos, hongos y bacterias, sobreviven al ataque de las células fagocíticas.

En teoría, las enfermedades infecciosas producidas por éstos y otros patógenos pueden ser prevenidas por vacunación, pero para algunas bacterias intracelulares, no hay vacunas efectivas para prevenir la enfermedad e incluso es aceptado que la inmunidad protectora es dependiente de la inmunidad celular (Kaufmann, 1993). Bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* y *Nocardia brasiliensis*, entre otros, evaden los mecanismos que evitan su destrucción y se adaptan para multiplicarse dentro de las células del hospedero. Entre estas células, los fagocitos son los principales blancos, ingiriendo la bacteria opsonizada con anticuerpos o con componentes del complemento, que en el caso de los patógenos extracelulares conduce a su destrucción, pero con las bacterias intracelulares, al no poder ser destruidos por las células, puede ayudar a diseminar la infección (Nathan y cols., 1980).

El micetoma es una enfermedad subcutánea, localizada y crónica causada por hongos (eumicetoma) o bacterias (actinomicetoma) (Welsh y cols., 1994). A nivel mundial, México es el país que tiene el mayor número de casos de actinomicetomas causado por *N. brasiliensis* (López-Martínez y cols., 1992). Cerca del 96% de los casos presentados en nuestro país, son producidos por actinomicetos y específicamente el 86.6% de los aislados está representado por *Nocardia brasiliensis* (López-Martínez y cols., 1992). *Nocardia brasiliensis* es una bacteria intracelular facultativa Gram (+), que vive como saprófita en la tierra y entra en la piel mediante

inoculación traumática. Aunque muchas personas son inoculadas accidentalmente, solo algunas desarrollan la lesión del actinomicetoma. La lesión inicial usualmente es una pequeña área de inflamación en el sitio primario de inoculación, posteriormente la presencia de supuración, formación de fístulas que toman la forma de agregados de micelio conocidos como gránulos actinomicóticos. La progresión de la enfermedad es lenta, puede llegar a involucrar tejidos subcutáneos, piel y en casos graves, se ven afectados los huesos y el pie entero. Las lesiones mayormente ocurren en el pie después de una introducción traumática, ya que usualmente los miembros del género de *Nocardia spp* son encontrados en la tierra y de ahí infectan a los trabajadores del campo que generalmente caminan descalzos (González-Ochoa, 1962). La inflamación puede ser tan pronunciada que la planta del pie puede tomar una curvatura convexa (Mariat y cols., 1977). Los mecanismos que controlan y resuelven la lesión son desconocidos. El papel de la respuesta inmune en la resistencia a *N. brasiliensis* está en proceso de ser caracterizada; tanto en modelos de ratón como en humanos y se ha sugerido que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en la resistencia (Ximénez y cols., 1980).

En 1996 Salinas-Carmona y Torres-López desarrollaron exitosamente un modelo de actinomicetoma en el ratón inmunocompetente BALB/c a través de la infección con *N. brasiliensis* en el cojinete plantar. La evaluación clínica del modelo experimental incluye: la presencia de inflamación, abscesos, úlceras y gránulos de descarga. En este modelo se observó que el micetoma se establece completamente después de 28 días de infección y la regresión espontánea de las lesiones del actinomicetoma inició 150 días después de la infección (Salinas-Carmona y Torres-López, 1996). No fue hasta 1999, cuando se describió la respuesta inmunológica a antígenos de *N. brasiliensis* en el mismo modelo experimental de ratón BALB/c

(Salinas-Carmona y cols., 1999). En ella se describió la evolución clínica, donde la mayor inflamación se hace presente a partir de las 72 horas de infección y se establecen criterios de evaluación clínica en una escala para evaluar el establecimiento del micetoma en el modelo de infección del ratón. Entre otras características clínicas, ellos reportaron un incremento del edema de manera continua, hiperemia y la presencia de pequeños abscesos que se presentan hasta el día 14.

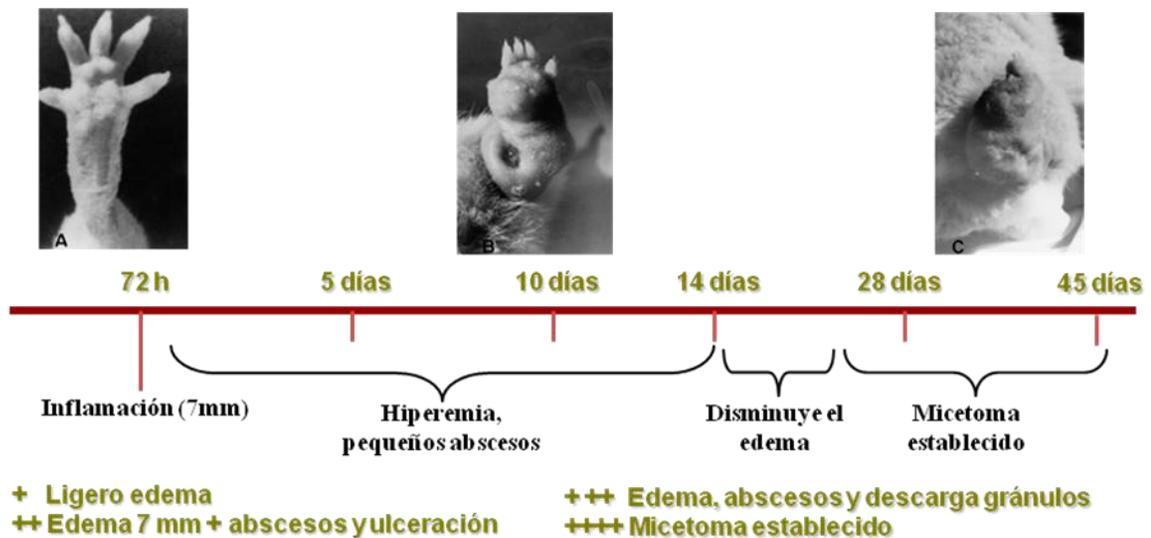


Fig 3. Escala del desarrollo del micetoma a lo largo de la infección.

El análisis histopatológico del material purulento obtenido de las lesiones, mostró la presencia de células monocíticas y polimorfonucleares que contenían abundantes agregados de bacilos y filamentos en formación. En el día 7 se demostró una intensa respuesta inflamatoria caracterizada por una gran cantidad de granulocitos presentes en los múltiples microabscesos; para el día 10 post-infección, se observó un incremento en el número de macrófagos en la periferia de la lesión y para el día 30 estos abscesos estaban limitados por células espumosas,

con microcolonias centrales de *N. brasiliensis*. Se evaluó la reactividad de los anticuerpos a antígenos inmunodominantes de *N. brasiliensis* (P24, P61) y los niveles séricos de citocinas Th1 y Th2, las cuáles se incrementaron dramáticamente a los 4 días de infección (Salinas-Carmona y cols., 1999). Un modelo experimental de infección con patógeno intracelular, cuya respuesta inmunológica está bien descrita, como es el caso del modelo de actinomicetoma desarrollado en el ratón BALB/c, es de gran utilidad para la clarificación del papel de los efectores de la respuesta inmune que pueden ser estimulados por agentes terapéuticos como drogas inmunomoduladoras.

1.4 Justificación

La modulación de la respuesta inmune puede incrementar la resistencia a enfermedades infecciosas, reducir la gravedad de la enfermedad o acortar el periodo de recuperación. Los efectos moduladores observados en drogas antiparasitarias como la ivermectina y dietilcarbamacina puede proveer una terapéutica adjunta útil para el tratamiento de infecciones en humanos, como en el caso de *Nocardia brasiliensis* y otras bacterias intracelulares.

1.5 Hipótesis

La ivermectina y dietilcarbamacina modulan positivamente la respuesta inmune en ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*.

1.6 Objetivos

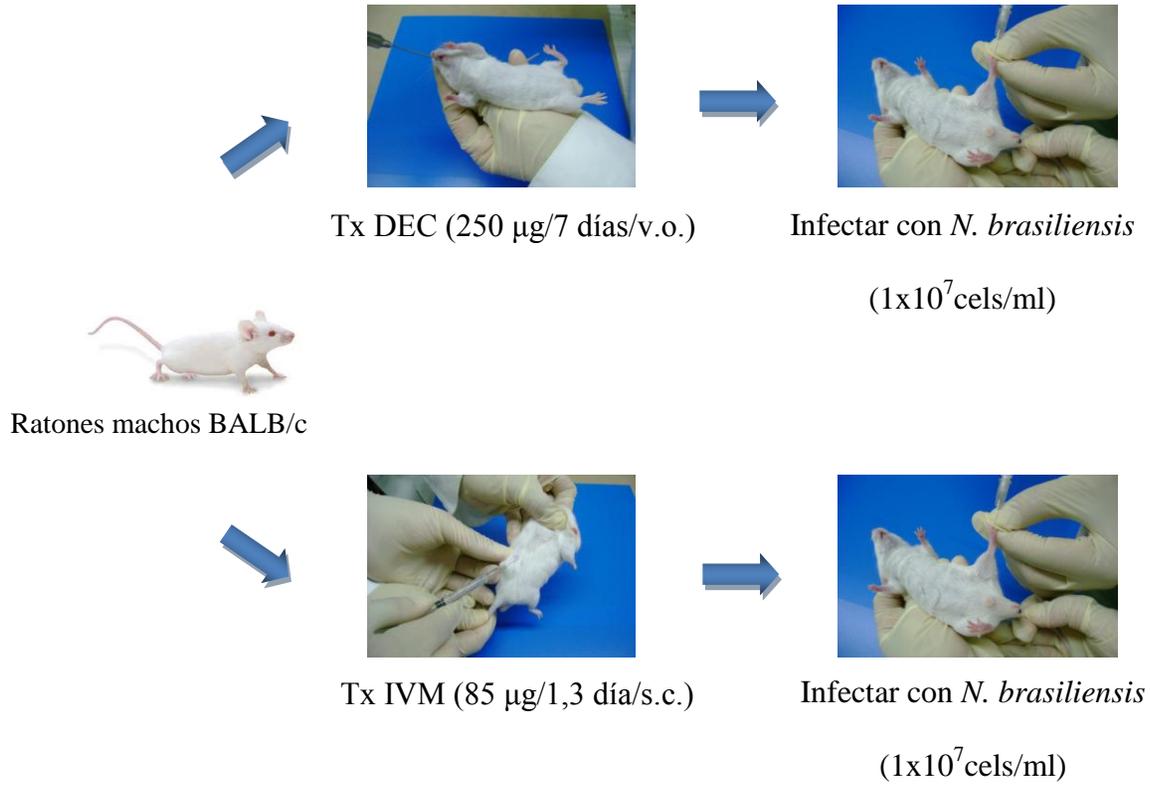
1.6.1 General

1. Determinar el efecto inmunomodulador del tratamiento con Ivermectina y Dietilcarbamacina en ratones infectados con *Nocardia brasiliensis*.

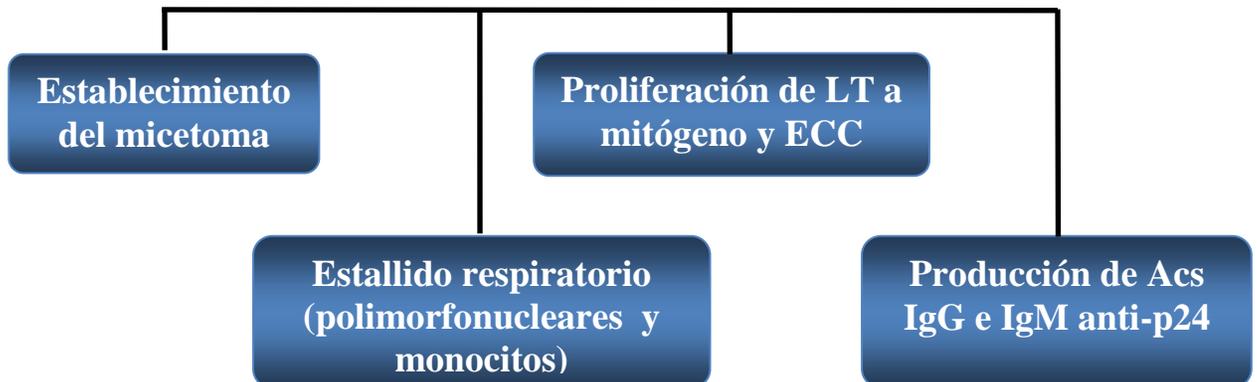
1.6.2 Específicos

1. Determinar el efecto modulador de Ivermectina y Dietilcarbamacina sobre el establecimiento del micetoma experimental en ratones BALB/c infectados con *Nocardia brasiliensis*.
2. Evaluar el efecto de Ivermectina y Dietilcarbamacina sobre la fagocitosis en PMN y monocitos de ratones BALB/c con actinomicetoma.
3. Evaluar la respuesta de proliferación celular a mitógeno y a extracto celular crudo (ECC) de *N. brasiliensis* en ratones infectados tratados con Ivermectina y Dietilcarbamacina.
4. Evaluar la producción de anticuerpos IgM e IgG anti-p24 de *Nocardia brasiliensis* en los ratones con tratamiento de Ivermectina y Dietilcarbamacina.

ESTRATEGIA GENERAL



EFEECTO INMUNOMODULADOR SOBRE:



1. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de entre 10 a 12 semanas de edad y con un peso de 40-42 g. Esta cepa fue donada en 1982 por el Dr. Hanson de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda MA), la cual ha sido mantenida en el bioterio del Departamento de Inmunología a una temperatura constante de 25°C en jaulas de acrílico de 37 cm x 15.5 cm. Todos los animales fueron alimentados *ad libitum* con agua estéril y nutricubos para roedores.

2.2 Fármacos

2.2.1 Dietilcarbamacina

La 1-Dietilcarbamil-1-4-metil piperazina, sal de citrato (DEC), fue adquirida en SIGMA (SIGMA D8765). Se preparó una solución de 2.5mg/ml de DEC disuelta en solución salina estéril 0.9% (Solución CS, PiSA) para la administración de 100 µl por vía oral (v.o.) en los modelos de ratón utilizados.

2.2.2 Ivermectina

Esta lactona macrocíclica semisintética (IVM), derivada del actinomiceto *Streptomyces avermitilis*, en presentación de solución inyectable (Iverffler Q-0180-111), se preparó en una

solución de 82µg/ml de ivermectina disuelta en prolipepilenglicol estéril para su administración por vía subcutánea (s.c.) en los modelos de ratón utilizados.

2.3 Modelo de infección en el ratón

Los ratones fueron inoculados de acuerdo al modelo de infección establecido previamente en 1996 por Salinas-Carmona y Torres-López en el departamento de Inmunología, el cuál está ampliamente documentado como procedimiento de infección en este modelo experimental (Salinas-Carmona y Torres-López, 1996).

2.3.1 Cepa de *Nocardia brasiliensis*

La cepa bacteriana de *N. brasiliensis* utilizada en los experimentos, fue la cepa obtenida de la resiembra de *N. brasiliensis* HUJEG-1 mantenida en el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario Dr. “José E. González”, U.A.N.L. La cual se aisló de un paciente con micetoma que acudió al Departamento de Dermatología del mismo hospital y cuyo registro se encuentra en el American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número 700358, realizado éste último por el Dr. Mario César Salinas Carmona en 1994.

2.3.2 Suspensión bacteriana de *N. brasiliensis* cepa 700358

Para obtener una suspensión unicelular de la bacteria, se tomaron 2 alícuotas de 1 ml cada una, de la cepa de *N. brasiliensis* congelada y mantenida en leche descremada de vaca al

10% a una temperatura de -70°C y se colocaron en un tubo cónico Falcon de 50 ml para realizar lavados con solución salina estéril al 0.9% centrifugando a una velocidad de 242 xg (centrífuga Beckman Model TJ-6) y así obtener un botón celular libre de leche. Posterior a los lavados se agregó 1 ml de solución salina (S.S.) estéril al 0.9%, la suspensión se homogenizó en vortex y con jeringa estéril se agregaron 0.5 ml de la suspensión reconstituida a matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuáles contenían 50 ml de medio de cultivo infusión cerebro-corazón (BHI Beckton Dickinson laboratories) previamente esterilizado al autoclave ($121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$). Posteriormente se incubó a 37°C durante 72 hrs hasta su fase logarítmica (Precision Economy Incubator).

Posterior a las 72 h, se decantó el sobrenadante y la masa bacteriana se lavó con solución salina estéril al 0.9% (S.S.). Después, las bacterias se disgregaron con un homogenizador Potter-Evelham hasta obtener una suspensión bacteriana unicelular. Previo a la infección se realizó una cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) utilizando el método de Miles y Misra (vide infra) y vertido en placa para ajustar el número de bacterias a partir de ésta suspensión unicelular que se utilizó para infectar a los ratones BALB/c en el cojinete plantar e inducir el micetoma experimental.

2.3.3 Cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias de *Nocardia brasiliensis*

Al obtener la suspensión unicelular de *N. brasiliensis*, fué necesario determinar el número de UFC/ml para ajustar la suspensión a una concentración de 10^7 UFC/ml. Los ratones BALB/c se inocularon en el cojinete plantar con 0.1 ml de ésta solución.

2.3.3.1 Método de Miles y Misra

Para cuantificar las UFC/ml que contenía la suspensión de *N. brasiliensis*, se utilizó el método de placa invertida (Miles y Misra, 1938). Se pipeteó 1ml de la suspensión unicelular de *N. brasiliensis* en una serie de tubos que contenían 9 ml de S.S. estéril, empezando con diluciones de 10^1 hasta 10^8 . Otro ml de cada una de las diluciones de la suspensión fue colocado por duplicado en placas de Petri e inmediatamente se vertió 10 ml del medio de cultivo Agar-BHI estéril previamente fundido y enfriado hasta 40°C , en cada una de ellas.

Las placas se mezclaron agitándolas en forma de 8 y cuando el medio solidificó, las placas se colocaron hacia abajo e incubaron a 37°C durante 3 días. El número de colonias de cada placa se contó con la ayuda de un cuenta-colonias (Québec Darfield Colony Counter, Reichert-Jung) y la cantidad de UFC/ml se determinó multiplicando el número promedio de colonias que crecieron por el inverso de su dilución. La densidad óptica correspondiente a cada dilución se determinó en un espectrofotómetro (Beckman DU 7500) a una longitud de onda de 325 nm.

2.4 Tratamiento con los fármacos

Se organizaron 3 grupos de 10 ratones machos de la cepa singénica BALB/c cada uno. Un grupo para el tratamiento con DEC, otro para el tratamiento con IVM y el tercero fue utilizado como grupo Control sin tratamiento.

La DEC fue administrada durante 7 días en una dosis de 250µg, equivalente a la dosis terapéutica más alta utilizada en el humano (500 mg) por vía oral utilizando jeringas de 1 ml (DL para insulina) y agujas de alimentación especializadas para la administración de medicamentos durante 7 días. La IVM fue administrada a una dosis de 85 µg/ml correspondiente a la dosis terapéutica utilizada en el humano (6 mg/kg) por vía subcutánea utilizando jeringas de 1ml (DL para insulina) con aguja de 23 G (Terumo) en el día 1 y 3 post-infección.

2.5 Establecimiento del micetoma y evaluación

Después de 1 hora de la administración de los medicamentos de acuerdo a los tratamientos mencionados en el punto 2.4, todos los grupos de ratones, se infectaron en el cojinete plantar con 100 µl de una suspensión celular de *Nocardia brasiliensis* de 10⁷ bacterias/ml (Ver 2.3.2). La evaluación del establecimiento del micetoma post-tratamiento, se realizó graficando la inflamación en mm, medida con un Vernier (Scala), contra el tiempo de infección hasta 90 días post-infección.

Al grupo Control se le administró solución salina estéril por vía oral utilizando jeringas de 1 ml (DL para insulina) y agujas de alimentación durante 7 días.

| ESQUEMA PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DEL MICETOMA | | | |
|--|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| GRUPO | INFECCIÓN | TRATAMIENTO | DOSIS Y VIA |
| I (CONTROL +) | <i>N. brasiliensis</i> | Solución salina estéril | 0.1ml/ 7 días/ v.o. |
| II (DEC) | <i>N. brasiliensis</i> | Dietilcarbamacina | 250 µg/ 7 días/ v.o. |
| III (IVM) | <i>N. brasiliensis</i> | Ivermectina | 85 µg/ días 1 y 3/ s.c. |

Tabla 1. Esquema para la evaluación del establecimiento del micetoma. Condiciones experimentales del modelo de ratón, se muestra el tratamiento, la dosis y el tiempo de administración en los diferentes grupos estudiados.

2.6 Evaluación de Estallido Respiratorio en monocitos y polimorfonucleares

Para la evaluación del Estallido respiratorio en células monocíticas y polimorfonucleares, se siguió la posología de los tratamientos con DEC e IVM, y los ratones se sangraron por punción del plexo retroorbital utilizando pipetas Pasteur nuevas, a los tiempos 0, 1 h, 1, 3, 7 días post-infección.

Para la realización de este experimento se utilizaron 4 grupos de ratones a los cuáles se les extrajo aproximadamente 500 µl de sangre completa a cada uno y se colocaron en tubos Eppendorf que contenían heparina. El esquema utilizado en este experimento fue el siguiente:

| ESQUEMA PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO | | | |
|--|----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| GRUPO | INFECCIÓN | TRATAMIENTO | DOSIS Y VIA |
| I (CONTROL -) | <i>Sin N. brasiliensis</i> | Solución salina estéril | 0.1ml/ 7 días/ v.o. |
| II (CONTROL +) | <i>N. brasiliensis</i> | Solución salina estéril | 0.1ml/ 7 días/ v.o. |
| III (DEC) | <i>N. brasiliensis</i> | Dietilcarbamacina | 250 µg/ 7 días/ v.o. |
| IV (IVM) | <i>N. brasiliensis</i> | Ivermectina | 85 µg/ 1,3 días/ s.c. |

Tabla 2. Esquema para la evaluación del Estallido Respiratorio. Condiciones experimentales del modelo de ratón que recibieron los diferentes tratamientos y fueron evaluados para estallido respiratorio en células monocíticas y polimorfonucleares.

2.6.1 Determinación de anión superóxido por la técnica de 123-Dihidro-rodamina mediante citometría de flujo

La determinación del estallido respiratorio (anión superóxido) se realiza mediante la tinción con 123-dihidro-rodamina. La intensidad media de fluorescencia emitida por las células fagocíticas después de la estimulación con éster forbólico del ácido mirístico (PMA) es detectada mediante citometría de flujo (Emmendörffer y Col., 1990; Emmendörffer y Col., 1994).

2.6.1.1 Obtención de leucocitos

Se obtuvieron 500 µl de sangre completa en tubos Eppendorf con heparina. Se distribuyeron 100 µl en cada tubo de un grupo de tres por muestra de acuerdo al protocolo establecido para la prueba (tabla 3), los cuales tenían previamente 3 ml de solución de lisis

incubada a 37°C. Los tubos se agitaron ligeramente y se dejaron incubando por 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 183 xg (Centrífuga, Eppendorf 5403), el sobrenadante se descartó y el botón celular se lavó con amortiguador PBS pH 7.4, se centrifugó y el lavado se repitió 2 veces más. Posteriormente las células se resuspendieron en 1 ml de PBS pH 7.4 a una concentración final aproximada de 1.5×10^6 células/ml. Para cada ratón se analizaron 3 eventos como se muestra en la tabla 3 y cada muestra se realizó por triplicado.

| PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO | |
|---|---|
| Tubo | Grupo de tubos por muestra |
| 1 | Células sin estimular (Cel) |
| 2 | Células teñidas con 123-Dihidro-rodamina (DHR) |
| 3 | Células estimuladas con PMA y teñidas con DHR (PMA+DHR) |

Tabla 3. Protocolo para la evaluación del Estallido Respiratorio. Contenido del grupo de tubos correspondientes a cada muestra adquirida y analizada en el citómetro de flujo.

2.6.1.2 Estimulación con éster forbólico del ácido mirístico (PMA)

Se utilizó el éster forbólico del ácido mirístico (PMA, Phorbol-myristate acetate, SIGMA P8139), el cual se preparó a una concentración de 2 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA D5879) y posteriormente diluido en una relación de 1:100 en amortiguador PBS pH 7.4. Se almacenó en alícuotas de 10 µl a -20°C hasta su uso. Se añadieron 10 µl de esta dilución a los tubos correspondientes (tabla 3). Posteriormente se dejó incubar en baño María a 37°C por 10 minutos en obscuridad

2.6.1.3 Tinción con 123 -Dihidro-rodamina (DHR)

La 123-Dihidro-rodamina (DHR, SIGMA D1054) se disolvió en N,N-dimetilformamida (cat. SIGMA D4551) en una concentración de 15 µg/ml y se almacenó en volúmenes de 20 µl a -20°C, cada uno se diluyó en una relación de 1:250 en amortiguador PBS pH 7.4. Se añadieron 10 µl de esta solución a los tubos correspondientes (tabla 3), se dejó incubar por 15 minutos a 37°C en baño María en oscuridad.

2.6.1.4 Adquisición y Análisis de Muestras

La medición de la intensidad media de fluorescencia de las células se realizó utilizando un Citómetro de flujo marca Becton Dickinson modelo FACSort, utilizando el software Cellquest. Se adquirieron 10 000 eventos para cada uno de los tubos, en el orden anteriormente mencionado en la tabla 3. Se analizaron dos regiones: la región correspondiente a los granulocitos-neutrófilos y la correspondiente a los monocitos. Los resultados se obtuvieron mediante el análisis estadístico del índice de estimulación dado por la relación entre la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de las células estimuladas con PMA y la Intensidad Media de Fluorescencia de las células teñidas con DHR, detectada en los histogramas de fluorescencia de ambas poblaciones celulares.

$$\text{Índice de Oxidación: } \frac{\text{IMF de las células estimuladas (PMA+DHR)}}{\text{IMF de las células teñidas (DHR)}}$$

2.7 Ensayo de la Respuesta Proliferativa en células de Bazo

Siguiendo el esquema indicado en el punto 2.5 y posterior al tratamiento con los fármacos y a la infección con *N. brasiliensis*, los ratones se sangraron hasta morir para la obtención de suero y se les extrajo el bazo los días 0, 7, 14, 21 y 28 post-infección para la obtención de las células esplénicas utilizadas en la evaluación de Linfoproliferación a mitógeno (PHA) y a antígeno (ECC).

| ESQUEMA PARA LA EVALUACIÓN DE LA LINFOPROLIFERACIÓN | | | |
|---|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| GRUPO | INFECCIÓN | TRATAMIENTO | DOSIS Y VIA |
| I (CONTROL +) | <i>N. brasiliensis</i> | Solución salina estéril | 0.1ml/ 7 días/ v.o. |
| II (DEC) | <i>N. brasiliensis</i> | Dietilcarbamacina | 250 µg/ 7 días/ v.o. |
| III (IVM) | <i>N. brasiliensis</i> | Ivermectina | 85 µg/ 1,3 días/ s.c. |

Tabla 4. Esquema para la evaluación del Índice de estimulación de proliferación. Condiciones experimentales del modelo de ratón que recibieron los diferentes tratamientos y fueron evaluados para Linfoproliferación contra mitógeno (PHA) y antígeno (ECC).

2.7.1 Obtención de las células de bazo

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y en condiciones de asepsia se les extrajo el bazo, y se colocaron cada uno en cajas de Petri estériles que contenían 7 ml de medio RPMI estéril. Para la obtención del peso del órgano, las cajas de Petri con el medio se pesaron antes y posterior a la colocación del bazo, para la obtención del peso del órgano.

Cada bazo se disgregó y perfundió en condiciones de esterilidad, con la ayuda de una jeringa de 1ml (DL insulina) y un pequeño cedazo de metal estéril. Después de eliminar los detritos mediante sedimentación durante 10 min, la suspensión celular de cada bazo, se transfirió a un tubo cónico Falcon de 15 ml y los tubos se centrifugaron a 274 xg (Beckman modelo TJ-6) durante 10 min a 4°C, repitiendo este procedimiento 3 veces para su lavado, finalmente la suspensión celular se reconstituyó en 4 ml de RPMI. Posteriormente en otro tubo de 15 ml estéril se agregó 2 ml de Ficoll-Diatrizoato de sodio y los 4 ml de la suspensión de células de bazo; éstos últimos de manera muy cuidadosa para evitar romper el gradiente del diatrizoato. Los tubos se centrifugaron a 274 xg por 30 min y con una pipeta Pasteur estéril se obtuvo el anillo de la interfase en el cual estaban presentes las células mononucleares de interés. La manipulación de las células se realizó dentro de una campana de flujo laminar (CCI Contamination Control INC, Lansdale, Penna 19446).

Las células se lavaron con RPMI estéril 3 veces durante 5 min, en las mismas condiciones de centrifugación y se re-suspendieron en 1ml de medio RPMI. Se tomó una alícuota de esta suspensión para realizar el conteo de las células en una relación 1:10 en ácido acético al 2% (que contenía 0.1% p/v de azul de metileno, Sigma). Las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer bajo el objetivo 40x para estimar la densidad celular. A la par se evaluó la viabilidad de las células. Las células se ajustaron a razón de 1×10^6 células/ml.

2.7.2 Respuesta de proliferación de linfocitos de bazo a mitógeno Concanavalina A (Con A) y a antígenos (ECC) de *Nocardia brasiliensis*

Se utilizaron placas estériles (Microtest tissue culture plate Beckton Dickinson) con fondo plano para realizar los cultivos de células de bazo. El ensayo se realizó de la siguiente manera: en cada pozo se colocaron 2×10^5 células esplénicas contenidas en 200 μ l de medio RPMI estéril y suero de ternera fetal al 10% y se estimularon con Concanavalina A (Con A) (Sigma) (1.0 μ g/10 μ l) en el caso de la estimulación con el mitógeno y para la estimulación con el antígeno se utilizó ECC de *Nocardia brasiliensis* (1.0 μ g/10 μ l). Se utilizaron como control negativo de Linfoproliferación células sin estímulo. Las células se incubaron a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa (incubadora NAPCO) durante 3 días en el caso de los mitógenos y 5 días con el ECC; 18 horas antes de concluir el período de incubación se adicionó a cada pozo 1 μ Ci de timidina tritiada (metil-tritio/timidina con actividad específica de 5.0 Ci/mmol, Amersham).

Las células se recolectaron en papel filtro especial con la ayuda de una cosechadora (mini-MASH, Ma. Bioproducts); los papeles filtro se dejaron secar y se depositaron en frascos de vidrio que contenían una mezcla de tolueno, PPO y POPO (Sigma), usada para la cuantificación de la emisión beta en un contador de centelleo líquido (Beckman IS6000TA). Cada cultivo se realizó por triplicado. El resultado se expresó como índice de proliferación que se obtuvo mediante la relación del promedio de las cuentas por minuto (cpm) de las células estimuladas con mitógeno/antígeno y el promedio de las cuentas por minuto de las células no estimuladas.

Índice de Proliferación: Promedio de las cpm de las células estimuladas
Promedio de las cpm de las células no estimuladas

A partir del Extracto Celular Crudo (ECC) de *N. brasiliensis* se obtuvo la proteína inmunodominante P24 utilizada para estimular los linfocitos de bazo de los ratones y para el esquema de inmunización para la obtención de suero control positivo de anticuerpos IgM e IgG anti-P24 de *N. brasiliensis*.

2.7.2.1 Obtención del Extracto Celular Crudo (ECC) de *Nocardia brasiliensis*

A partir de la suspensión bacteriana unicelular de *N. brasiliensis* obtenida, se tomaron 0.5 ml y se inocularon 40 matraces Erlenmeyer de 2 litros conteniendo cada uno 150 ml de medio de cultivo BHI estéril. Estos matraces fueron incubados durante 7 días a 37°C (Vera-Cabrera y Col., 1992). Se recolectó la masa bacteriana de cada matraz, en un embudo de filtración grande que contenía un papel filtro. Esta masa se lavó con agua destilada estéril varias veces, para la eliminación del medio de cultivo. Posteriormente se deslipidizó con una mezcla de etanol:éter en diferentes proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 respectivamente. Los sobrenadantes obtenidos se eliminaron y la masa bacteriana deslipidizada se colocó en un refractario de vidrio por 3 días para la eliminación de los solventes.

La masa bacteriana totalmente seca se trituró con polvo de vidrio utilizando un mortero de porcelana y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml al cual se le adicionó amortiguador

de extracción (Tris-HCL/Acetato de magnesio 0.01M pH 7.4) y se dejó agitando a 4°C toda la noche. Al siguiente día la mezcla se centrifugó a 1200 xg /30 min y el sobrenadante se ultracentrifugó nuevamente a 13,148 xg por 10 min y se almacenó a -20°C. La extracción con el amortiguador Tris-HCl/Acetato de Mg 0.01M, se repitió 3 veces y la ultracentrifugación de los sobrenadantes se realizó bajo las mismas condiciones. Al finalizar cada extracción, los sobrenadantes fueron dializados utilizando membranas de diálisis con un poro de exclusión de 10 KDa contra agua destilada toda la noche y almacenados a -20°C. Todos los dializados fueron recolectados y filtrados con microfiltros estériles de 0.45µm de diámetro de poro. Esta extracción de proteínas es a lo que nos referiremos Extracto Celular Crudo (ECC) del cuál se obtuvo la proteína inmunodominante P24, procedimiento que se detallará más adelante (v.i.). El ECC se colocó en viales de vidrio de 15 ml cada uno para su liofilización y se almacenó a 4°C para su uso posterior (Salinas-Carmona y Col., 1999).

2.7.2.1.1 Determinación de proteínas por el Método de Bradford

La determinación de proteínas se realizó utilizando como estándar de proteínas la albúmina sérica bovina (ASB Sigma) (Bradford, 1976). Se preparó una solución de 1 mg/ml de ABS disuelta en agua destilada, a partir de esta solución se realizó una dilución 1:50 y se prepararon los diferentes estándares (2 a 18 µg/ml) cuyo volumen final fue de 500µl y posteriormente se le agregó 500µl del reactivo de Bradford. Se tomó una alícuota de 1 ml del ECC para determinar la concentración de proteínas y a partir de ahí las muestras problemas fueron diluidas a razón de 1:10, 1:50 o 1:100, se tomó 500 µl de las diluciones y se le añadió

500 µl del reactivo de Bradford. Después de incubar las muestras por 30 min a temperatura ambiente, se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU7500). Las lecturas obtenidas de los estándares y muestras se graficaron en absorbancia (Abs) contra concentración de las proteínas. La lectura obtenida (Abs) de las diluciones de las muestras del ECC se graficó en la curva de calibración y de ese modo se obtuvo la concentración de las proteínas presentes.

2.7.2.1.2 Análisis del patrón electroforético del extracto celular crudo (ECC) de *N. brasiliensis* mediante SDS-PAGE al 12%

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970) con las siguientes modificaciones: se utilizó un gel concentrador al 5%T, 2.7%C y el gel de separación al 12%T, 2.7%C. Para la realización del gel se utilizó el equipo de electroforesis mini-Protean II (BIO RAD). Los geles se pre-corrieron a 50 volts por 20 minutos (fuente de poder BIO RAD modelo 1000/500). Como amortiguador de corrimiento se utilizó un amortiguador Glicina 192mM, Base Trizma 25mM, SDS 0.1% p/v, pH 8.3 (Sigma).

Las muestras del ECC de *N. brasiliensis* se separaron electroforéticamente (SDS-PAGE) y la concentración proteica que se utilizó fue de 40µg de proteína/60µl/carril. La muestra problema se mezcló con el amortiguador de muestra 4X en una proporción de 3:1 conteniendo Tris-HCL 0.125M pH 6.8, 2% de dodecil-sulfato de sodio (SDS), 5% de 2-mercaptoetanol (2ME), 10% de sacarosa y azul de bromofenol. Los volúmenes de las muestras fueron de 60µl y luego se sometieron a ebullición 2 min antes de ser colocadas en los carriles del gel

concentrador. Los marcadores de peso molecular que se utilizaron se reconstituyeron de acuerdo al instructivo: citocromo C (16KDa Sigma) y la albúmina sérica (PM 66 KDa) a una concentración de 2 mg/ml y 5 mg/ml en amortiguador de PBS pH 7.4 respectivamente (Sigma).

Los marcadores se sometieron a ebullición 1 minuto y después se colocaron al igual que las muestras en los carriles del gel concentrador. Después el gel se colocó dentro de la cámara de electroforesis el cual contenía el amortiguador de corrimiento (Tris-HCL y Glicina). La electroforesis se realizó a 80 volts durante 1 hora y luego el voltaje se aumentó a 150 volts por 2.5 horas. Al término de la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie R (Sigma) al 0.1% p/v en metanol, 40% v/v, ácido acético, 10% v/v), durante 30 minutos en movimiento suave y después se destiñó utilizando metanol al 40% v/v, ácido acético al 10%v/v en cantidad suficiente para eliminar el exceso del colorante.

2.8 Determinación de anticuerpos anti-P24 por técnica inmunoenzimática (ELISA)

Para la evaluación de la producción de anticuerpos IgM e IgG anti-P24 de *N. brasiliensis*, se utilizó el suero obtenido del sangrado de los ratones (2.7) post-tratamiento e infectados con *N. brasiliensis*. Estos sueros fueron obtenidos por centrifugación (Beckman, Allegra 64R) a 6708 xg/4°C por 10 minutos, posteriormente se almacenaron a -70 °C hasta la determinación de anticuerpos IgM e IgG.

2.8.1 Obtención del suero

Los ratones se sangraron mediante punción retroorbital los días 0, 7, 14, 21 y 28 post-infección. Los sueros fueron centrifugados a $6,708 \times g/4^{\circ}\text{C}$ por 10 min. y almacenados en criotubos estériles de 2.0 ml (Corning) en volúmenes de 70 μl . Los sueros controles positivos y negativos se almacenaron de la misma manera. Todos los sueros se conservaron a -70°C para su uso posterior.

2.8.2 Obtención y purificación de la proteína P24 de *N. brasiliensis*

Para la obtención y purificación de la proteína inmunodominante P24 se realizó una semi-purificación a través de la precipitación de las proteínas del ECC y posteriormente una purificación con cromatografía de filtración en gel (Vera-Cabrera y Col., 1992).

2.8.2.1 Precipitación proteica del extracto crudo de *N. brasiliensis*

Se utilizaron 100 mg de proteína del ECC de *N. brasiliensis* disueltos en 12 ml de PBS pH 7.4 a los cuales se le añadieron 12 ml de una solución de sulfato de amonio saturada ajustada a pH 7.4. La precipitación de las proteínas se realizó en frío y se añadió el sulfato de amonio gota a gota y en agitación suave. La mezcla se centrifugó a $242 \times g$ durante 20 min. El sobrenadante (SN) se utilizó para la purificación de P24. El SN obtenido se dializó contra agua destilada, hasta que se eliminó el sulfato de amonio presente en el ECC. Se evaluó durante algunos días la presencia o eliminación de sales en el dializado mediante la prueba de cloruro de

bario saturado que consistió en mezclar de 2 a 3 ml de líquido de diálisis y una o 2 gotas de cloruro de bario saturado, la ausencia de turbidez demostraba la eliminación completa de las sales en el dializado.

Al finalizar la diálisis, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford y el sobrenadante se liofilizó colocando 15 ml en viales de vidrio de 100 ml. El SN liofilizado se resuspendió en un ml de PBS 0.1 M pH 7.4. Finalmente se centrifugó a 687 xg por 5 min y se colocó en una columna de vidrio (Wheaton) empacada con Sephadex G-100 y equilibrada con amortiguador fosfato-salina pH 7.2 y ajustada a un flujo de 0.5 ml por minuto para su elución.

2.8.2.2 Cromatografía de filtración con Sephadex G-100

Para la purificación de la proteína P24 de *Nocardia brasiliensis*, se utilizó una columna de vidrio (Wheaton S.P.) de 23 cm de largo por 2.5 cm de diámetro interno, donde se empaquetó una matriz de sephadex G-100 hidratada en PBS 0.1 M pH 7.4 mantenida a 4°C. Para determinar el volumen vacío (V_0) de la columna se pasó a través de ella dextrana azul (2.5 mg en 0.5 ml de PBS pH 7.4 con glicerol al 5%) la cual se eluyó con PBS pH 7.4 a razón de 0.5 ml por minuto y se recolectó el volumen total de elución. Después de estabilizada la columna se pasaron las siguientes proteínas de peso molecular (PM) conocido (marcadores Sigma):

Tabla 5. Marcadores de peso molecular utilizados en la columna de filtración molecular

| Marcador | Peso Molecular (KDa) |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Citocromo C (Horse heart C7150) | 16 |
| Albúmina Sérica Bovina (A8531 Sigma) | 66 |

Los marcadores proteicos fueron eluidos con PBS 0.1 M pH 7.4 a una velocidad de flujo de 0.5 ml por minuto a 4°C. Se recolectaron fracciones de 2 ml, a las cuales se le determinó el perfil de elución y el volumen vacío (V_0). Las muestras liofilizadas de SN se reconstituyeron en PBS (1mg/ml) y posteriormente se aplicaron a la columna con sephadex. Se utilizó como amortiguador de elución el amortiguador de PBS 0.1M pH 7.4. La elución de las proteínas se realizó a una temperatura de 4°C y se recolectaron fracciones de 2 ml a las cuales se les realizó cuantificación de proteínas por el método de Bradford (6.7.2.1.1) y una electroforesis analítica al 12% para determinar la presencia de la proteína P24 (6.7.2.1.2). Una vez localizada la proteína P24, las fracciones se liofilizaron y se almacenaron a 4°C para su uso posterior.

2.8.3 Esquema de inmunización para la obtención de sueros controles para prueba de ELISA anti IgM e IgG

Para la obtención de los sueros control positivos (suero hiper-inmune) se realizó el siguiente esquema de inmunización: se realizaron 3 inmunizaciones, en la primera se utilizaron 20 µg de ECC en 0.1 ml/ ratón con Adyuvante Completo de Freund (ACF) por vía subcutánea. Todos los animales se sangraron a partir del plexo retroorbitario los días 5, 6 y 7 post-inmunización para control positivo de IgM.

En la segunda dosis que se realizó a la semana, se utilizaron 20 µg de P24 en 0.1 ml/ratón con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) inmunizando ésta vez en el cojinete plantar. La tercera semana se administró la última dosis en el otro cojinete plantar del ratón utilizando 15 µg de P24 en 0.1 ml/ratón con AIF. Para la obtención de los sueros control positivo para IgG, los ratones fueron sangrados de plexo retroorbital los días 4 y 5 después de la última inmunización hasta morir. El suero obtenido se filtró por 0.22µm y se almacenó en alícuotas de 150 µl en criotubos. Se congeló a -70°C hasta su uso.

2.8.4 Determinación de anticuerpos anti IgG y anti-IgM contra P24 por ELISA

Para la detección de anticuerpos anti-P24 se utilizó la técnica inmunoenzimática (ELISA) la cual fue desarrollada por Salinas-Carmona y colaboradores (Salinas-Carmona y Col., 1993). La concentración proteica del antígeno fue de 0.5µg/200µl/pozo. Se usaron placas de poliestireno de 96 pozos fondo plano de 300µl de capacidad, marca Costar (EIA-RIA). El antígeno que se uso en los ensayos fue la proteína P24 a partir de la cual se agregó a cada pozo 0.5µg en 200µl de amortiguador de acetatos pH 5, se dejó a 4°C toda la noche y al siguiente día la placa se lavó durante 10 minutos 3 veces con una solución de lavado (PBS 0.1M pH 7.2-Tween 1:1000). Después los pozos se bloquearon con 200 µl de leche descremada (Svelty al 5%) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Los pozos se lavaron con solución de lavado (PBS 0.1M pH 7.2-Tween 1:1000, 3 lavados de 10 minutos cada uno) y se agregó 200µl del suero del ratón diluido a razón de 1:50 en el caso de IgG y a razón de 1:10 para IgM. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C sin y con agitación respectivamente. Los pozos se lavaron nuevamente

con solución de lavado (PBS 0.1M pH 7.2-Tween 1:1000, 3 lavados de 5 min cada uno) y se agregó 200µl del antisuero conjugado anti-IgM o IgG de ratón, conjugado con peroxidasa (Sigma). Las placas se incubaron por 1 hora a 37°C y se lavaron nuevamente con solución de lavado (3 lavados de 5 minutos). Finalmente para amplificar la reacción antígeno anticuerpo se agregó una solución de substrato/cromógeno (peróxido de hidrógeno y OPD) a un volumen de 160µl/pozo y se incubó por 20 minutos en obscuridad a temperatura ambiente. La reacción se da por terminada al agregar 40µl/pozo de ácido sulfúrico 1N. El resultado se obtuvo en unidades de absorbancia a 492 nm (diamedix BP-96 Microassay reader). Como controles se usaron sueros de ratones inmunizados (control positivo) y ratones no inmunizados (control negativo).

2.9 Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos se representan como promedios (\pm) desviación estándar (DE) y se analizaron mediante análisis de varianza multivariado (MANOVA). El criterio para la significancia estadística fue de $p < 0.05$. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico NCSS.

3. RESULTADOS

3.1 Cultivo de *Nocardia brasiliensis*

Se resembró la cepa de *Nocardia brasiliensis* a partir de la cepa ATCC 700358 mantenida en el Departamento de Inmunología y posterior al máximo crecimiento de su fase logarítmica alcanzada a las 72 h de incubación, fue homogenizada para infectar a los grupos de ratones que recibieron los tratamientos con los medicamentos, y para inocular matraces utilizados en la obtención y purificación de la proteína P24.

En la figura 4 se puede observar el crecimiento característico de *N. brasiliensis* en el medio de cultivo BHI, en forma de una especie de nata homogénea distribuida en todo el área de superficie del matraz. El color de esta capa de crecimiento que se desarrolla de manera continua es amarillenta, aspecto cremoso y presenta pequeñas rugosidades a lo largo de ella.



Fig 4. Crecimiento de *N. brasiliensis* en su fase exponencial. Cultivo de *N. brasiliensis* a las 72 h en caldo BHI, utilizado para producir el micetoma experimental en los ratones y para la obtención de la proteína P24.

La masa total obtenida de las dos cosechas de 40 matraces cada uno, realizadas para la obtención de P24, se muestra a continuación:

Tabla 6. Rendimiento en g de la masa bacteriana de *N. brasiliensis*

| COSECHAS DE <i>N. brasiliensis</i> | RENDIMIENTO (gramos de masa bacteriana) |
|---|--|
| Primera cosecha | 13.8 g |
| Segunda cosecha | 14.8 g |

3.2 Evaluación del micetoma

Para la evaluación del micetoma se registraron los milímetros (mm) de la lesión inflamatoria a lo largo de la infección en cada uno de los grupos de ratones después de haber recibido los diferentes tratamientos.

3.2.1 Características clínicas

Como se muestra en la figura 5, en los primeros días de la infección fue evidente la hiperemia e inflamación de las patas infectadas en todos los grupos de estudio (DEC, IVM y Control).

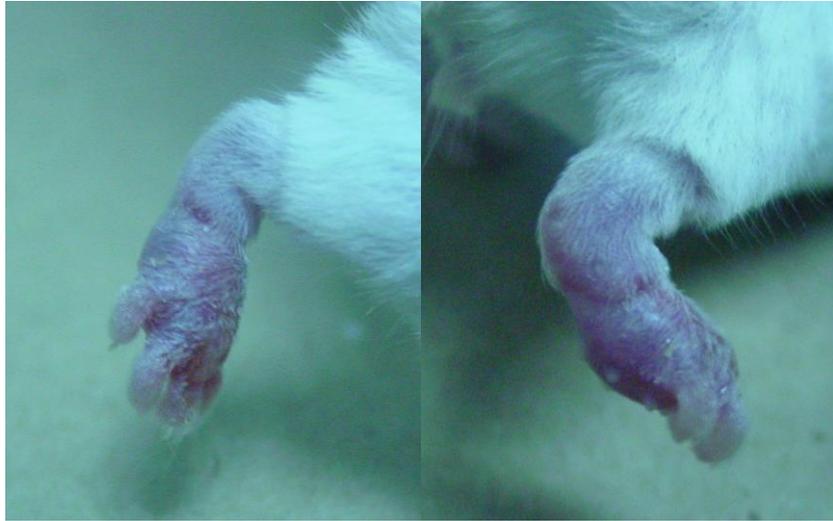


Fig 5. Características clínicas en la pata del ratón en los primeros días del micetoma. Inflamación, edema y eritema a partir del día 2 de infección en todos los grupos.

De la misma manera se observó la formación de úlceras, fístulas y gránulos de descarga a partir del día 6 post infección en todos los grupos de tratamiento como se muestra en la fig. 6. En el día 17 se observó una ligera disminución de la lesión en los tres grupos de estudio, debido a la fase de remisión natural que cursa el micetoma experimental alrededor del día 14. Podemos decir que las manifestaciones clínicas en general, fueron similares en todos los grupos de estudio para éste día.

En el caso del grupo que recibió la IVM, pareciera que su administración favoreció el incremento en el tamaño de la lesión. Para este y otras subsecuentes comparaciones y del desarrollo del micetoma es conveniente referirnos a la fig. 3 que muestra la escala del desarrollo del micetoma. A partir del día 20 post-infección (fig. 7), en el grupo que recibió la DEC empieza a disminuir el tamaño de la lesión, los cambios en la inflamación son evidentes, hay disminución de eritema e hiperemia (fig. 7 y 8) y las fistulas y gránulos de descarga empiezan a desaparecer no así en los que recibieron IVM y el grupo Control.

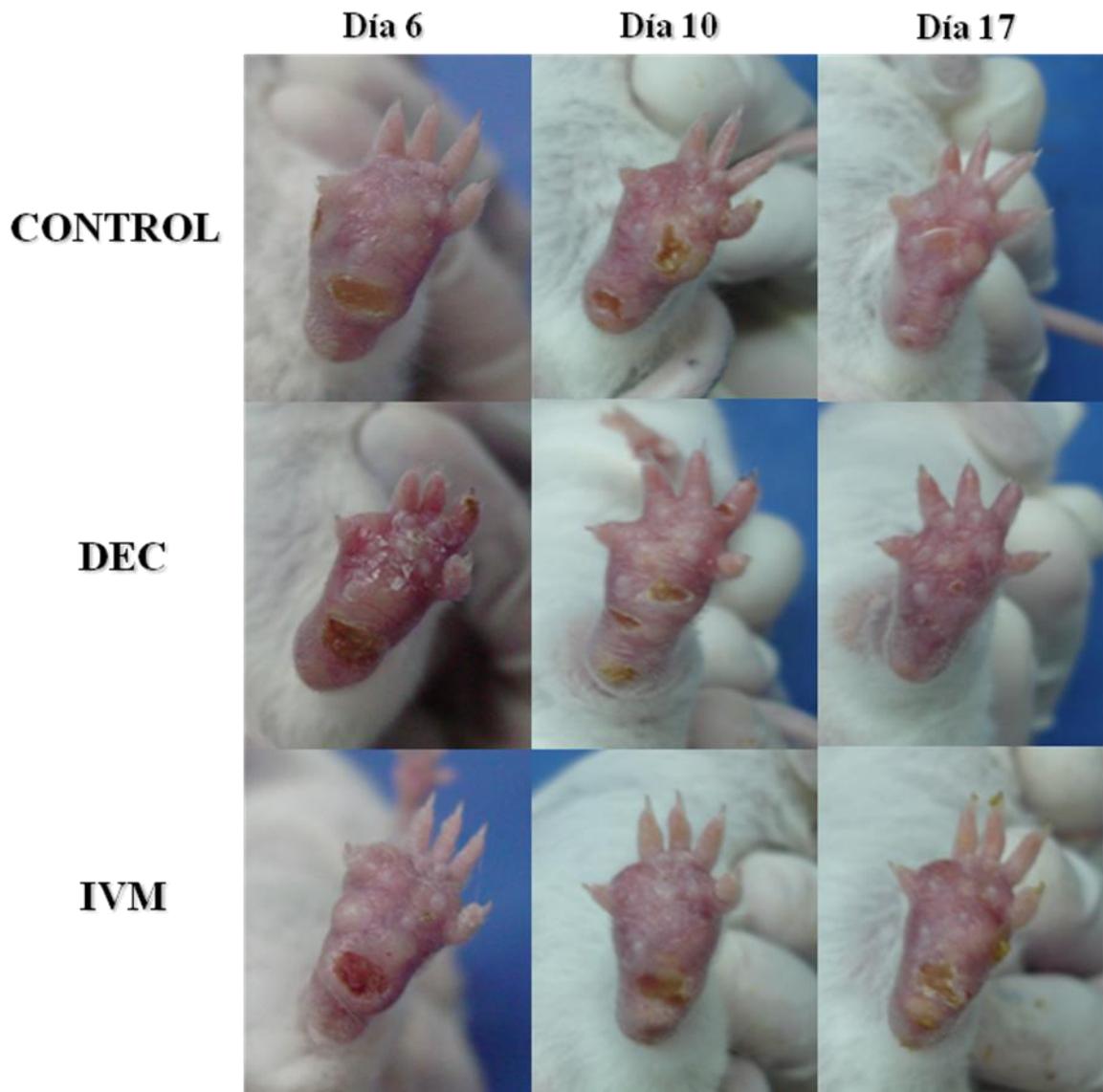


Fig 6. Comparación de la evolución de la lesión del micetoma (A). Infección a los días 6, 10 y 17 en los diferentes grupos de tratamiento (CTRL, DEC e IVM).

3.3 Efecto sobre la lesión

De acuerdo a la historia natural del desarrollo del micetoma, podemos decir que entre los días 14-24 post-infección (fig.7), el micetoma se ha establecido. Los ratones que recibieron la IVM no mostraron ningún efecto positivo en la inhibición de la lesión, y observamos que el tamaño de la lesión se incrementó, incluso más que el grupo control (fig. 7 y 8).

En el caso del grupo de ratones que recibió la DEC, observamos de manera impresionante (fig. 6-8) no solamente la disminución de la lesión, sino que de alguna manera es inhibido el establecimiento del actinomicetoma. Esta inhibición fue estadísticamente significativa entre el grupo que recibió la DEC y el grupo control e IVM (fig. 9). Esta disminución de la lesión se hace evidente a lo largo del resto de la infección (día 24 en adelante).

La figura 9 muestra el efecto modulador positivo que tuvo la DEC en la inhibición del tamaño de la lesión y sobre el establecimiento del micetoma en el grupo de ratones, no así los ratones que recibieron IVM. Esta inhibición es significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

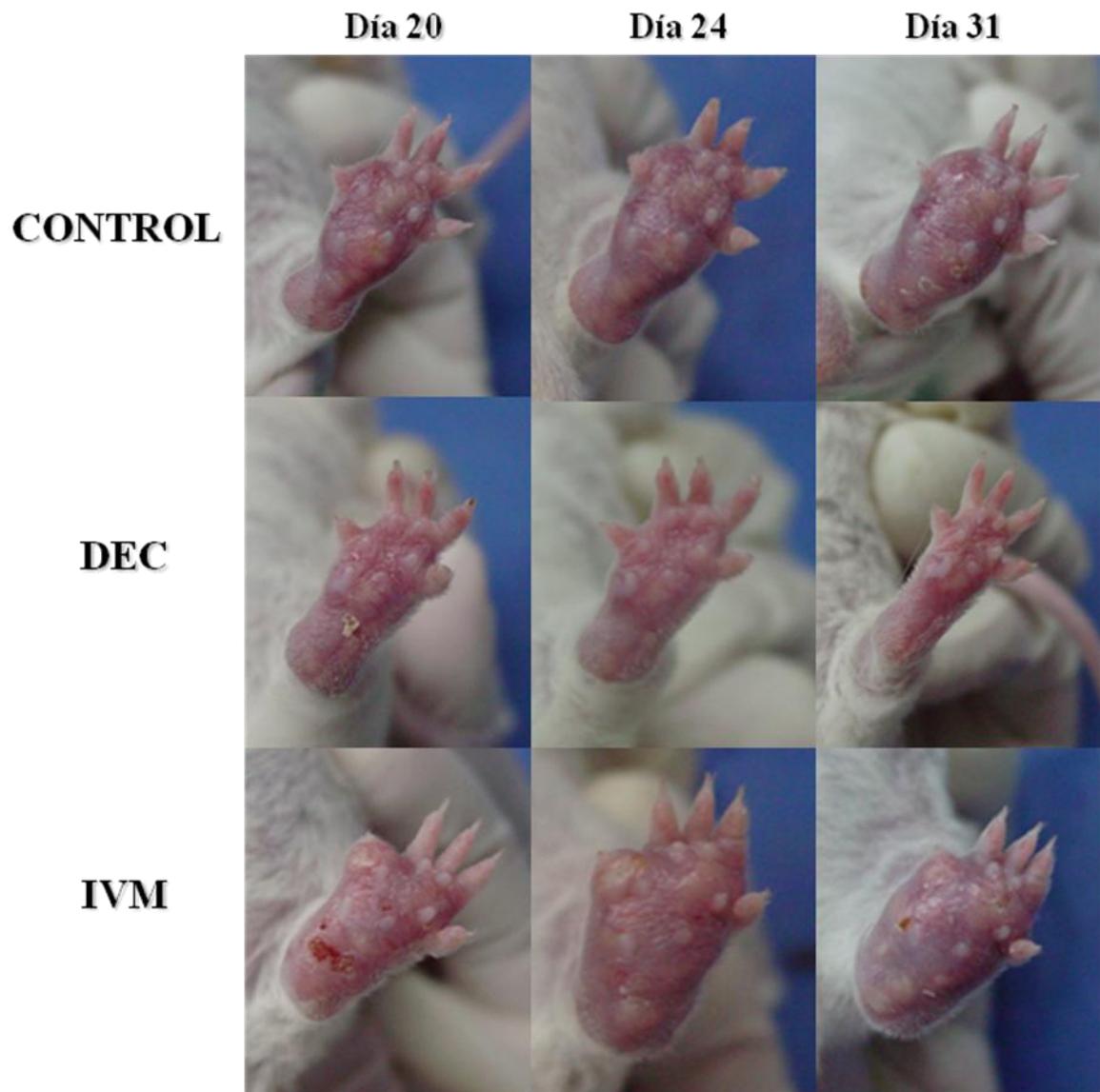


Fig 7. Comparación de la evolución de la lesión del micetoma (B). Infección a los días 20, 24 y 31 en los diferentes grupos de tratamiento (CTRL, DEC e IVM).

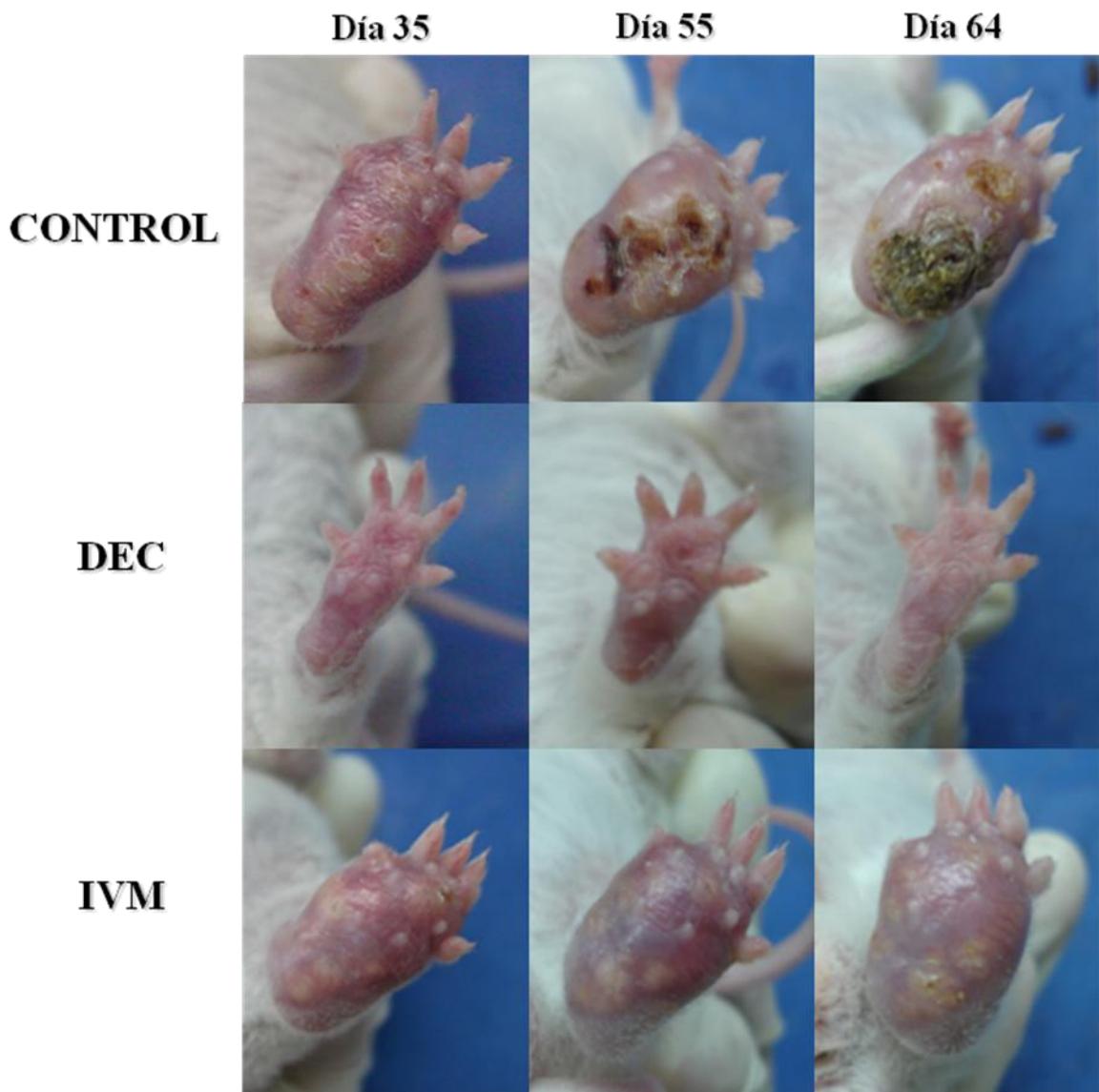


Fig 8. Comparación de la evolución de la lesión del micetoma (C). Infección a los días 35, 55 y 64 en los diferentes grupos de tratamiento (CTRL, DEC e IVM).

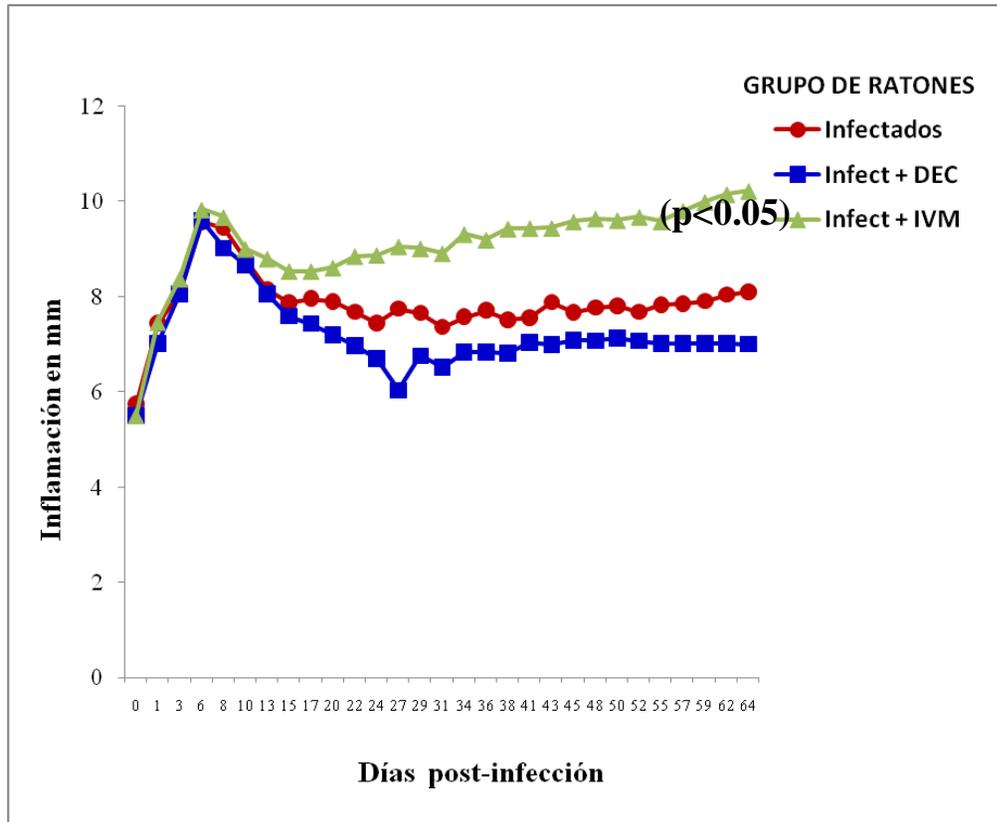


Fig 9. Efecto de la IVM y DEC sobre el establecimiento del micetoma. Medición de la inflamación de la lesión del cojinete plantar en cada uno de los grupos de ratones que recibieron los diferentes tratamientos (n=5).

3.4 Efecto sobre el Estallido Respiratorio

Después de la administración de los tratamientos con DEC e IVM también se evaluó el estallido respiratorio producido en las células monocíticas y polimorfonucleares, mediante la técnica de 123-dihidrorodamina.

3.4.1 Efecto sobre la producción del anión superóxido en células monocíticas

Se midió el Índice de Oxidación de las células monocíticas posterior a la estimulación con IVM y DEC. En el caso del grupo que recibió IVM, hubo un incremento de los intermediarios reactivos del oxígeno en los primeros 60 min. post-estimulación con los medicamentos, pero inmediatamente después inició el descenso en su producción (fig. 10). El grupo que recibió DEC incrementó de manera ligera el estallido respiratorio, manteniéndose constante este incremento dentro de las primeras 24 h de la infección, pero éste incremento no resultó significativo en relación con el grupo Control positivo. Aunque el control positivo presenta un incremento continuo en el estallido respiratorio hasta el día 1, éste desciende abruptamente. En ninguno de grupos se presentó una diferencia significativa.

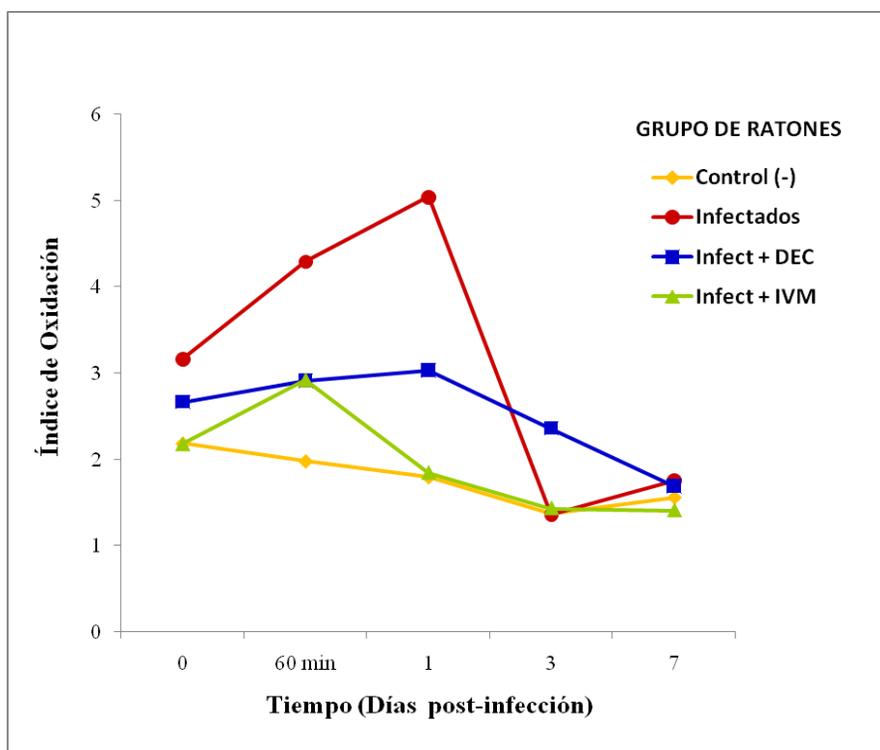


Fig 10. Evaluación del Estallido Respiratorio en células mononucleares. Los ratones BALB/c recibieron tratamiento con IVM, DEC y los grupos Control (-) e Infeccionados, solución salina. La infección con *N. brasiliensis* se realizó como se describe en el texto. Se muestran el Índice de Oxidación medido por citometría de flujo al tiempo al tiempo 0, 60 min, 1, 3 y 7 días post-infección (n=3).

| ÍNDICES DE OXIDACIÓN EN LAS CÉLULAS MONONUCLEARES | | | | | |
|---|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| GRUPOS | TIEMPO POST-INFECCIÓN (DÍAS) | | | | |
| | 0 | 1h | 1 | 3 | 7 |
| Control (-) | 2.39±1.03 | 2.00±0.32 | 1.81±0.24 | 1.39±0.23 | 1.60±0.34 |
| Infeccionados | 3.23±0.64 | 4.34±0.63 | 5.82±3.22 | 1.36±0.04 | 1.84±0.61 |
| Infec + DEC | 2.98±1.48 | 3.01±0.74 | 3.10±0.66 | 2.49±0.82 | 1.69±0.19 |
| Infec + IVM | 2.18±0.20 | 3.06±0.87 | 1.99±0.71 | 1.48±0.41 | 1.44±0.33 |

Tabla 7. Índices de Oxidación en células mononucleares. Valores promedio de los índices de oxidación obtenidos en los diferentes grupos (ver texto y fig. 10). Se muestra promedio y desviación estándar ($X \pm DS$).

3.4.2 Efecto en la producción del anión superóxido en células polimorfonucleares

En el caso del estallido respiratorio de las células polimorfonucleares obtenidas de los ratones que recibieron IVM, posterior a los 60 min de la infección hubo un incremento notable en la producción de los intermediarios de oxígeno, pero después del día 1 empezó un descenso en el estallido respiratorio (fig. 11). Aunque los demás grupos tuvieron el mismo comportamiento posterior a primer día de infección; el grupo que recibió DEC presentó un incremento el cual mantuvo de manera constante a lo largo de los primeros días de la infección, dicho incremento resultó estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con todos los grupos.

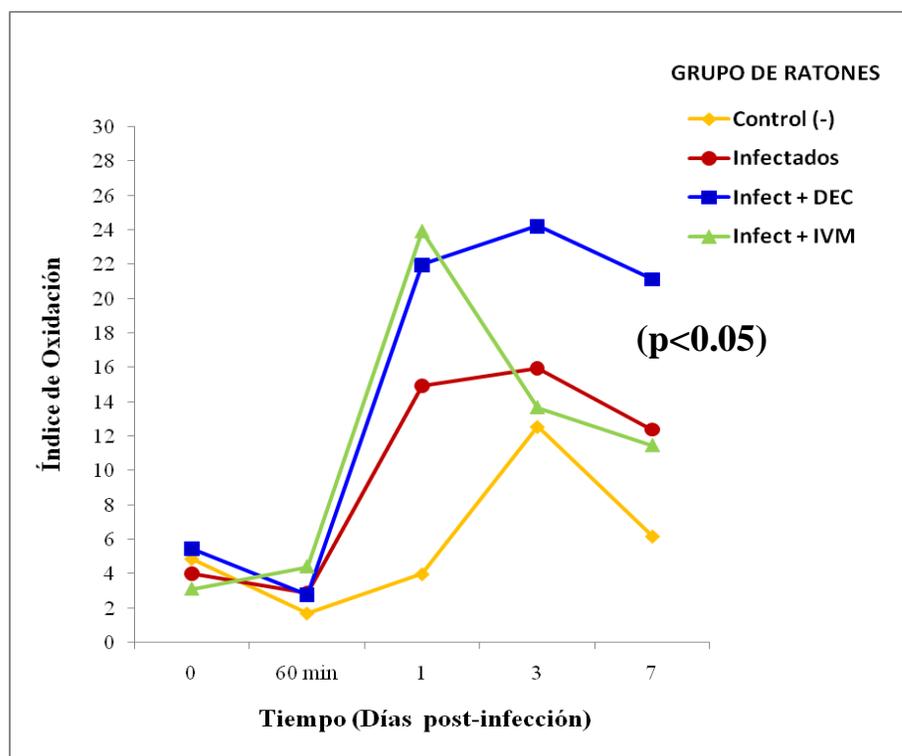


Fig 11. Evaluación del Estallido Respiratorio en células polimorfonucleares. Los ratones BALB/c recibieron tratamiento con IVM, DEC y los grupos Control (-) e Infectados, solución salina. La infección con *N. brasiliensis* se realizó como se describe en el texto. Se muestran el Índice de Oxidación medido por citometría de flujo al tiempo al tiempo 0, 60 min, 1, 3 y 7 días post-infección (n=3).

| ÍNDICES DE OXIDACIÓN EN LAS CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES | | | | | |
|--|------------------------------|-----------|------------|-------------|------------|
| GRUPOS | TIEMPO POST-INFECCIÓN (DÍAS) | | | | |
| | 0 | 1h | 1 | 3 | 7 |
| Control (-) | 4.97±1.07 | 1.78±0.60 | 4.26±1.58 | 12.63±1.44 | 6.66±2.53 |
| Infectados | 4.03±0.46 | 2.88±0.33 | 16.36±6.90 | 16.09±2.08 | 12.43±1.22 |
| Infect + DEC | 5.79±2.11 | 2.88±0.83 | 22.31±4.01 | 26.01±10.01 | 21.15±1.08 |
| Infect + IVM | 3.14±0.32 | 4.61±1.30 | 24.28±4.34 | 16.05±7.58 | 12.64±5.87 |

Tabla 8. Índices de oxidación en células polimorfonucleares. Valores promedio de los índices de oxidación obtenidos en los diferentes grupos (ver texto y fig. 11). Se muestra promedio y desviación estándar ($X \pm DS$).

3.5 Efecto sobre la Respuesta proliferativa en células de bazo

3.5.1 Obtención del Extracto Celular Crudo (ECC)

Tabla 9. Cuantificación de proteínas de ECC, SN y PPDO de la masa bacteriana de *N. brasiliensis*

| COSECHAS DE <i>N. brasiliensis</i> | EXTRACTO CELULAR CRUDO (ECC) | SOBRENADANTE (SN) | PRECIPITADO (PPDO) |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------|
| Primera cosecha | 779.98 mg | 259.11 mg | 28.24 mg |
| Segunda cosecha | 272.88 mg | 176.40 mg | 3.16 mg |

3.5.2 Linfoproliferación contra Extracto Celular Crudo

En el caso de la estimulación de las células linfocíticas de los ratones que recibieron IVM contra el ECC (antígeno), hubo un incremento continuo en el índice de proliferación presentado hasta el día 14 post-infección, pero este aumento no fue significativo, ni permaneció de manera constante. Las células del grupo de ratones que recibieron DEC incrementaron también su proliferación, mostrando un pico muy significativo en el día 21 contra el ECC de *N. brasiliensis* ($p < 0.05$). El grupo control no presentó grandes cambios en su linfoproliferación y su comportamiento fue similar al reportado por Salinas-Carmona en la descripción de la proliferación celular de las células linfocíticas contra ECC de *Nocardia brasiliensis*.

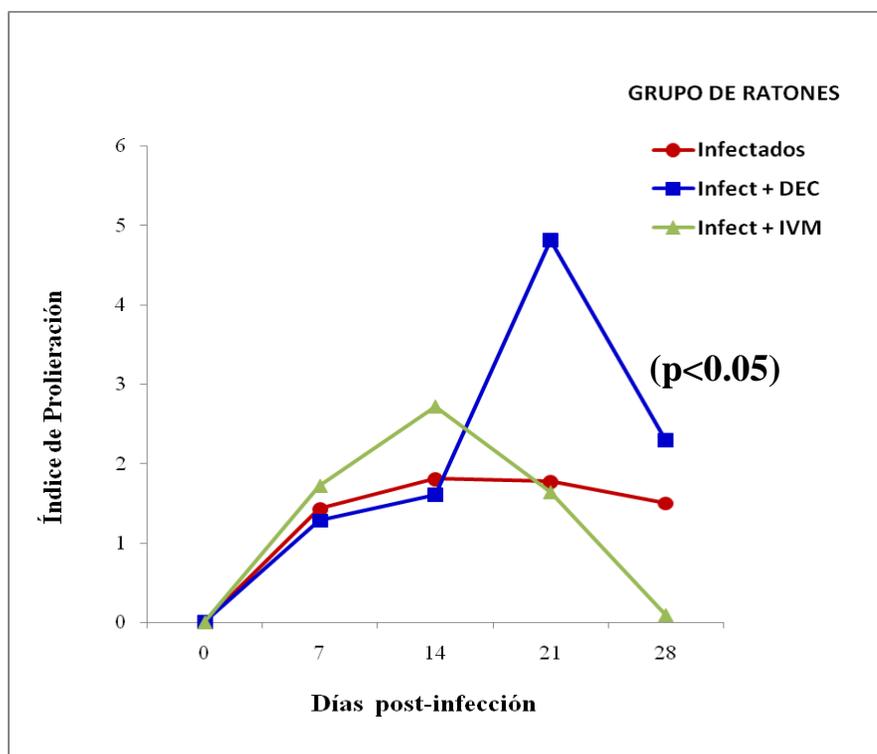


Fig 12. Evaluación de la Proliferación de linfocitos inducida por ECC de *N. brasiliensis*. Los ratones BALB/c recibieron tratamiento con IVM, DEC y el grupo de Infectados, solución salina. La infección con *N. brasiliensis* se realizó como se describe en el texto. Se muestran el Índice de Proliferación de las células linfocíticas de bazo estimuladas con ECC al tiempo 0, 7, 14, 21 y 28 días post-infección (n=3).

| ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS A ECC DE <i>N. brasiliensis</i> | | | | | |
|---|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| GRUPOS | TIEMPO POST-INFECCIÓN (DÍAS) | | | | |
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Infectedos | 0±0.0 | 1.46±0.30 | 1.98±0.78 | 1.85±0.65 | 1.52±0.22 |
| Infect + DEC | 0±0.0 | 1.28±0.10 | 1.66±0.44 | 4.97±1.22 | 2.46±0.88 |
| Infect + IVM | 0±0.0 | 1.73±0.21 | 2.73±0.29 | 2.08±1.45 | 0.10±0.03 |

Tabla 10. Índices de proliferación en células linfocíticas a ECC. Valores promedio de los índices de proliferación obtenidos en los diferentes grupos (ver texto y fig. 12). Se muestra promedio y desviación estándar ($X \pm DS$).

3.5.2 Linfoproliferación inducida con el mitógeno Concanavalina A

Las células linfocíticas de los ratones que recibieron IVM contra la Concanavalina (mitógeno), no mostraron ninguna diferencia en el índice de proliferación, si bien hubo ligeros incrementos, llegando el máximo al día 14 post-infección, este aumento no fue significativo. Sin embargo las células del grupo de ratones que recibieron DEC fueron incrementando de manera significativa su proliferación a partir del día 14, notoriamente mostrado hasta el día 21 post-infección ($p < 0.05$). El grupo control no mostró ninguna diferencia significativa en su linfoproliferación.

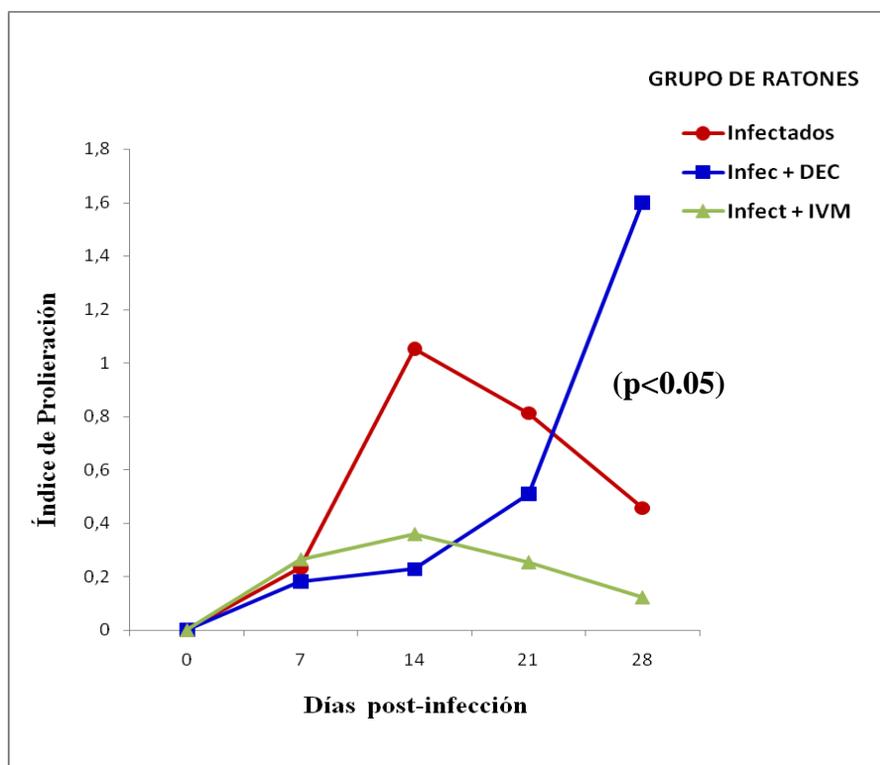


Fig 13. Evaluación de la Proliferación de linfocitos inducida por Concanavalina A. Los ratones BALB/c recibieron tratamiento con IVM, DEC y el grupo de Infectados, solución salina. La infección con *N. brasiliensis* se realizó como se describe en el texto. Se muestran el Índice de Proliferación de las células linfocíticas de bazo estimuladas con Concanavalina A al tiempo 0, 7, 14, 21 y 28 días post-infección (n=3).

| ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS A CONCAVALINA A | | | | | |
|--|------------------------------|------------|------------|-----------|-----------|
| GRUPOS | TIEMPO POST-INFECCIÓN (DÍAS) | | | | |
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Infectados | 0±0.0 | 0.24±0.068 | 1.14±0.046 | 0.95±0.49 | 0.47±0.09 |
| Infec + DEC | 0±0.0 | 0.19±0.065 | 0.23±0.029 | 0.52±0.09 | 1.6±0.03 |
| Infec + IVM | 0±0.0 | 0.28±0.075 | 0.43±0.21 | 0.32±0.22 | 0.13±0.03 |

Tabla 11. Índices de proliferación en células linfocíticas a Con A. Valores promedio de los índices de proliferación obtenidos en los diferentes grupos (ver texto y fig. 13). Se muestra promedio y desviación estándar ($X \pm DS$).

3.6 Efecto sobre la Producción de anticuerpos anti p-24 de *Nocardia brasiliensis*

3.6.1 Obtención y Purificación de la proteína P24 de *N. brasiliensis*

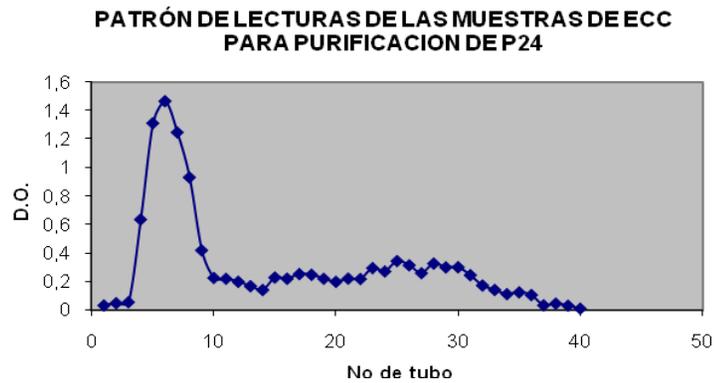


Fig. 14 Gráfica de elución de la purificación de P24 de *N. brasiliensis*. Patrón de las absorbancias de cada una de las muestras eluidas en la obtención de P24 de *N. brasiliensis*.

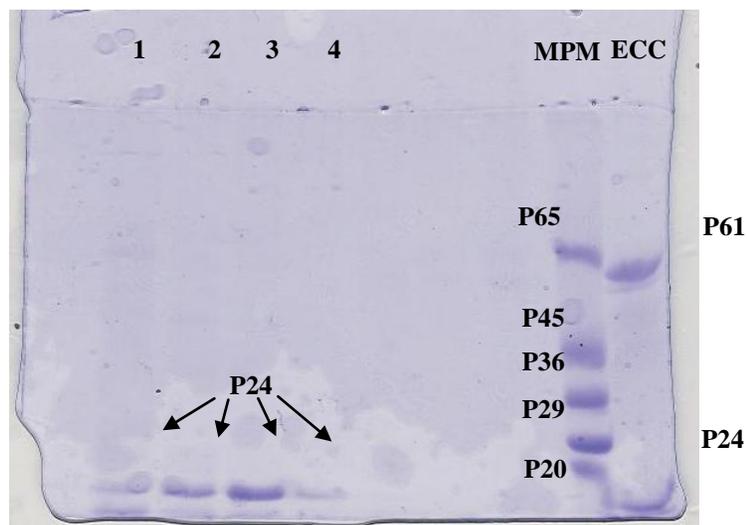


Fig. 15 Electroforesis para la verificación de la purificación de la P24 de *N. brasiliensis*. Patrón electroforético de las proteínas purificadas de P24 de los eluidos (A a la F) del ECC y de los marcadores de peso molecular (MPM).

Tabla 12. Cuantificación de proteína P24 purificada a partir del ECC de *N. brasiliensis*

| MUESTRAS DE ECC PURIFICADAS POR CROMATOGRADÍA DE EXCLUSIÓN EN GEL CON SEPHADEX G-100 | RENDIMIENTO (mg totales de proteína P24) |
|---|---|
| Eluido A | 1.994 mg |
| Eluido B | 6.344 mg |
| Eluido C | 4.237 mg |
| Eluido D | 4.228 mg |
| Eluido E | 3.096 mg |
| Eluido F | 4.074 mg |

En la fig. 14, se muestra el patrón de absorbancias obtenido para cada una de las muestras de ECC de *N. brasiliensis* purificadas por cromatografía con Shepadex. Los eluidos obtenidos de la A a la F se seleccionaron para el análisis SDS-PAGE y determinación de proteínas (fig. 15). La cuantificación total de la proteína P24 obtenida por cada uno de los eluidos se muestra en la tabla 12.

3.6.2 Producción de anticuerpos IgG anti-p24 de *N. brasiliensis*

La producción de anticuerpos IgG fue incrementando a lo largo de la infección en los tres grupos de estudio. Este aumento fue homogéneo en los tres grupos por lo que no marcó ninguna diferencia significativa entre la producción de anticuerpos ellos.

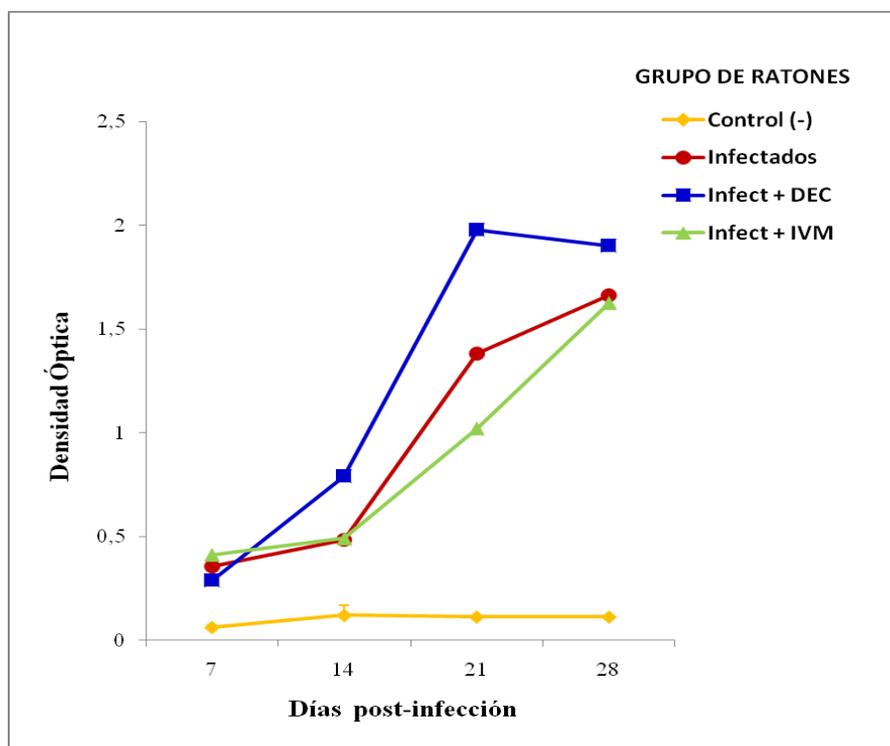


Fig 16. Determinación de IgG contra P24 de *N. brasiliensis*. Los ratones BALB/c recibieron tratamiento con IVM, DEC y el grupo Control (-) e Infectados, solución salina. La infección con *N. brasiliensis* se realizó como se describe en el texto. Se muestran la producción de anticuerpos IgG a los días 0, 7, 14, 21 y 28 post-infección (n=3).

| DENSIDADES ÓPTICAS EN LA DETERMINACIÓN DE ACS IgG ANTI P-24 | | | | |
|--|-------------------------------------|-----------|------------|------------|
| GRUPOS | TIEMPO POST-INFECCIÓN (DÍAS) | | | |
| | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Control (-) | 0.061±0.01 | 0.13±0.05 | 0.11±0.006 | 0.11±0.006 |
| Infectados | 0.35±0.68 | 0.49±0.24 | 1.38±0.10 | 1.38±0.76 |
| Infect + DEC | 0.28±0.12 | 0.79±0.62 | 1.97±0.79 | 1.97±0.88 |
| Infect + IVM | 0.41±0.12 | 0.48±0.67 | 1.02±0.35 | 1.02±0.24 |

Tabla 13. Densidades ópticas de la determinación de Acs IgG anti P-24. Valores promedio de las densidades ópticas obtenidas en la determinación de anticuerpos IgG en los diferentes grupos (ver texto y fig. 16). Se muestra promedio y desviación estándar (X ±DS).

3.6.3 Producción de anticuerpos IgM anti-p24 de *N. brasiliensis*

En el caso de los anticuerpos IgM producidos en los ratones que recibieron los diferentes tratamientos, ninguno de los grupos mostró incrementos importantes, los ligeros aumentos mostrados a lo largo de la infección no arrojaron ninguna diferencia significativa.

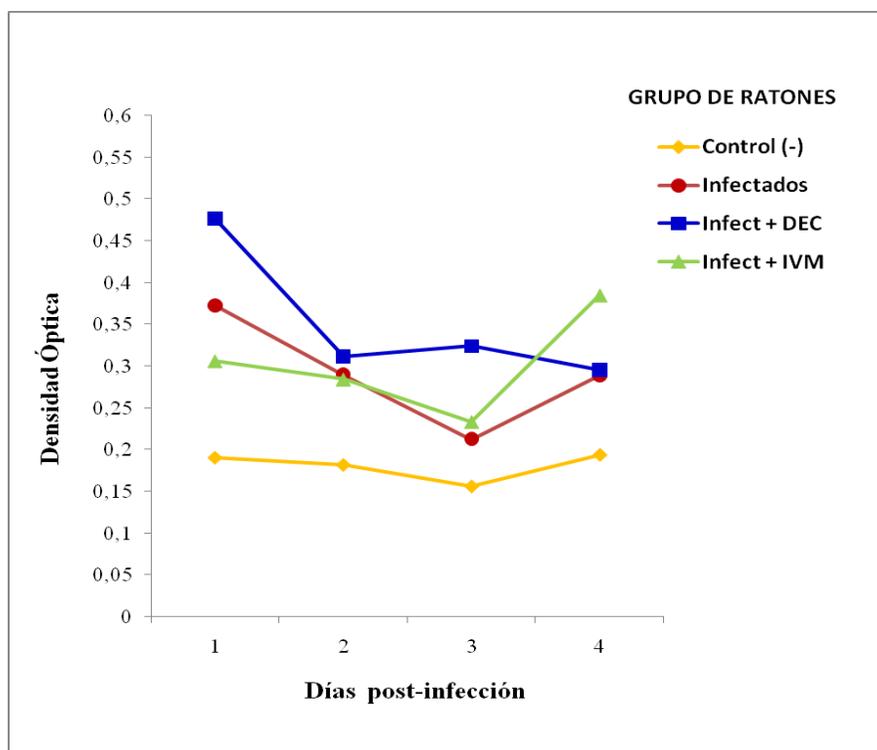


Fig 17. Determinación de IgM contra P24 de *N. brasiliensis*. Los ratones BALB/c recibieron tratamiento con IVM, DEC y el grupo Control (-) e Infectados, solución salina. La infección con *N. brasiliensis* se realizó como se describe en el texto. Se muestran la producción de anticuerpos IgM a los días 0, 7, 14, 21 y 28 post-infección (n=3).

| DENSIDADES ÓPTICAS EN LA DETERMINACIÓN DE Ac`s IgM ANTI P-24 | | | | |
|---|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| GRUPOS | TIEMPO POST-INFECCIÓN (DÍAS) | | | |
| | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Control (-) | 0.19±0.03 | 0.18±0.01 | 0.15±0.02 | 0.19±0.01 |
| Infectados | 0.37±0.06 | 0.28±0.10 | 0.21±0.05 | 0.29±0.03 |
| Infect + DEC | 0.47±0.03 | 0.31±0.05 | 0.32±0.07 | 0.29±0.02 |
| Infect + IVM | 0.30±0.03 | 0.28±0.07 | 0.23±0.03 | 0.38±0.11 |

Tabla 14. Densidades ópticas de la determinación de Acs IgM anti P-24. Valores promedio de las densidades ópticas obtenidas en la determinación de anticuerpos IgM en los diferentes grupos (ver texto y fig. 17). Se muestra promedio y desviación estándar ($X \pm DS$).

4. DISCUSIÓN

La inmunofarmacología estudia la inmunomodulación así como formas y estrategias para restaurar la funcionalidad del sistema inmune y potenciar la resistencia a la enfermedad infecciosa o neoplásica. La evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de fármacos conocidos, puede proveer las bases para su uso terapéutico en la infección, o como adyuvante en la infección o vacunación, sobre todo al usar fármacos cuyos índices terapéuticos son altos y sus propiedades moduladoras estén presentes a dosis usadas en la posología habitual en humanos. Siguiendo este concepto, en el presente trabajo se estudió el efecto inmunomodulador de la IVM y DEC, ambos fármacos anti-parasitarios con antecedentes de ser inmunomoduladores. Esta evaluación se hizo en el modelo de infección de actinomicetoma en el ratón BALB/c y se evaluó el efecto de éstas drogas sobre el establecimiento de la lesión (micetoma), el índice de oxidación de células fagocíticas, la linfoproliferación T y la producción de anticuerpos IgG e IgM.

4.1 Efecto de la ivermectina

La evaluación en el modelo del actinomicetoma, desarrollado por Salinas-Carmona y Torres-López en el ratón inmunocompetente BALB/c descrito previamente, en donde la presencia clínica de inflamación, úlceras y formación de abscesos con destrucción de tejido en una lesión deformante y de difícil tratamiento, constituyeron un modelo ideal para una evaluación de inmunomodulación farmacológica, considerando que este modelo cuenta con un conocimiento detallado de la respuesta inmunológica a la infección (Salinas-Carmona y Col.,

1999). De acuerdo con nuestros resultados, la IVM no parece tener un efecto modulador positivo en la inhibición de la lesión producida por *N. brasiliensis*; por el contrario, parece favorecer el desarrollo de la lesión, sin observarse ninguna tendencia a la desaparición de la lesión en los ratones que recibieron IVM. Contrario a nuestros resultados, existe el reporte de la efectividad de la IVM dada como tratamiento alternativo para la papilomatosis cutánea bovina, infección viral por *Papilomavirus*; en donde el 88 y 77% de los animales a los que se les administró una y dos dosis terapéuticas respectivamente, tuvieron una recuperación completa en un período de observación de 3 meses (Börkú y Col. 2007). Aunque en el modelo de infección utilizado no observamos un efecto inmunomodulador positivo sobre el micetoma nocardioso, utilizando la dosis terapéutica de la IVM, como en el caso de Borku y cols, pensamos que sí existe un efecto sobre la respuesta inflamatoria mostrado a través de un incremento en el tamaño de la lesión comparada con los controles. El presente es el primer reporte a nuestro conocimiento que usa un modelo de infección por bacterias intracelulares, donde se ha administrado la IVM como adyuvante para la resolución de las mismas, o para observar la evolución de la lesión con el tratamiento, por lo cual es difícil establecer una secuencia comparativa de efectividad en un modelo similar de infección. Sin embargo, el hecho de que la lesión no respondiera al tratamiento experimental con IVM sugiere que el efecto putativo que pudiese ejercer la IVM sobre los efectores iniciales de la respuesta a *Nocardia*, tales como los fagocitos profesionales polimorfonucleares y macrófagos, no se encuentra presente.

En concordancia con estos resultados, en la evaluación específica del Índice de oxidación de las células fagocíticas (monocitos-macrófagos y polimorfonucleares), del grupo de ratones que recibieron la IVM no se observó un efecto estimulador en la producción de los

intermediarios reactivos del oxígeno en ninguna de las dos poblaciones celulares, contrario a lo reportado por Tischendorf y cols. (Tischendorf y Col., 1993), donde se observó que la producción del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno aumentaba en células granulocíticas eosinofílas posterior a una estimulación con IVM. Una comparación directa de resultados es difícil ya que se trabajó con células distintas, que sin embargo son capaces de producir un estallido respiratorio potente. Adicionalmente, ellos estimulaban *in vitro*, donde las células fueron expuestas directamente a la IVM, además de usar una dosis considerada supra fisiológica que supera proporcionalmente a la usada en humanos. En nuestro modelo de infección, la estimulación de las células fue *in vivo* y la dosis que utilizamos fue la terapéutica (200µg/kg). Sajid y cols., evaluaron la capacidad fagocítica de macrófagos de conejos estimulados con IVM, utilizando entre las dosis (200, 400 y 600 µg/kg), la dosis terapéutica (Sajid y Col., 2007). Si bien Sajid observó el incremento de la capacidad de los macrófagos para fagocitar, hecho que se sugiere sea causado por una mayor expresión de receptores de la superficie para la fagocitosis, no pudo mostrar que también estuviera aumentada la capacidad de eliminación de los microorganismos a través de los intermediarios reactivos del oxígeno medidos. En el presente estudio se privilegió el uso del equivalente de la dosis terapéutica humana para no considerar resultados que impliquen el uso de dosis que no son extrapolables a un uso inmunomodulador en humanos.

Por otro lado, de acuerdo a los reportes de Blakley, el efecto inmunomodulador de la IVM parece estar relacionado con la función de los linfocitos T ya que la respuesta inmune contra glóbulos rojos de carnero, un antígeno timodependiente, fue potenciado posterior al tratamiento con la IVM (Blakey, 1991). En nuestro estudio, no observamos un efecto en la

proliferación celular de los linfocitos T en el grupo al que se le administró IVM, ni en presencia del antígeno (ECC) como del mitógeno (Con A). Si bien es cierto que además de su actividad endo- y ectoparasitaria comprobada, la IVM ha demostrado tener un efecto potenciador sobre el sistema inmune incrementando la respuesta inmune celular de linfocitos T (Blakley, 1991; Savanur y Col., 1996, López Olvera y Col. 2006), también se ha observado de manera contradictoria un efecto inmunosupresor en la actividad de los anticuerpos y en el perfil de anticuerpos específicos en conejos inmunizados con extracto completo de *Psoroptes cuniculi* posterior al tratamiento con IVM (Uhlir y Volf, 1992; Stankiewicz y Cols., 1995). Esto es debido a que la IVM, tiene una farmacocinética dosis-dependiente; comprobado en humanos y en ciervos por Krishna y col. quienes midieron la determinación de IVM en plasma mediante HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (Krishna y Klotz, 1993), y observaron que las concentraciones plasmáticas se incrementaron de manera lineal conforme incrementaba la dosis, sin embargo la vida media de eliminación (12.6-13.4 h) fué independiente de la dosis (Krishna y Klotz, 1993). Esto podría sugerir que la respuesta inmune a un determinado antígeno puede variar de acuerdo a la concentración plasmática de la ivermectina, según lo observado por Sajid y cols. (2006), en cuyo estudio se observó un incremento en la inmunidad celular, medida por la reacción de hipersensibilidad retardada. Ellos usaron dosis de 200, 400 y 600 µg/kg, en donde a mayor dosis se observó mayor efecto en la reacción de hipersensibilidad retardada; cabe recalcar que la dosis mas alta usada por estos autores (600 µg/kg) es tres veces mayor que la dosis terapéutica utilizada en nuestro estudio. Señalamos nuevamente, la importancia de realizar estudios con dosis terapéuticas cuyo uso pueda dar una mayor seguridad en su traslado a su uso en humanos sin efectos graves relacionados con las dosis altas.

Con respecto a la inmunidad humoral, no encontramos en el presente estudio una correlación entre la producción de anticuerpos y una aparente protección que inhiba la lesión. Sajid y cols (2007) reportaron un ligero efecto pero estadísticamente significativo de la IVM sobre la producción de anticuerpos totales de conejos contra un antígeno específico, la vacuna de *P. multocida*, usando una dosis terapéutica. Este efecto fue dosis dependiente, según se discutió anteriormente. Por su parte Savanur y col. (1995) no reportaron los mismos resultados contra un antígeno de *Salmonella* en conejos tratados con una dosis de 200µg/kg de IVM, lo cual refuerza la observación de la dependencia de la dosis y la ineffectividad de la dosis terapéutica sobre efectores humorales. El tratamiento con IVM en los ensayos de Sajid, incrementó también la respuesta específica contra glóbulos rojos de carnero, resultados que apoyan los obtenidos por Blakley (1991) donde también se incrementó la producción de anticuerpos dependiente de linfocitos, pero solo de forma significativa utilizando una dosis mayor a la terapéutica. Nuevamente observamos que el efecto inmunomodulador que ha sido reportado con el tratamiento con IVM, la dosificación utilizada está por arriba de 200 µg/kg, que es la dosis fisiológica normalmente indicada en el humano. En este caso, nuestros resultados coinciden con el estudio de Blakley (1991) y de Savanur (1995) donde tampoco se observó alguna alteración significativa en relación a la producción de anticuerpos bajo tratamiento con IVM con dicha dosis. En resumen, aunque la comparación de los resultados, obtenidos por los diferentes grupos que han usado IVM como posible inmunomodulador son difíciles de contrastar en el modelo presentado en este trabajo, la evidencia indica que en los parámetros inmunológicos fagocíticos, celulares y humorales en la infección nocardiosa no se ven modificados por la IVM, y la infección y formación de micetoma siguen su historia natural sin inhibición o alteración de la lesión.

4.2 Efecto de la dietilcarbamacina

En todos los grupos de ratones infectados con *N. brasiliensis* se presentó inflamación y posteriormente el desarrollo del micetoma. Con el tratamiento de DEC, el micetoma no evolucionó en el tiempo esperado de acuerdo a la historia natural experimental (Salinas y Col., 1999). El efecto inhibitorio de la progresión del micetoma, inclusive después de la evolución inicial de la lesión, sugiere que los mecanismos involucrados en la progresión de la lesión pertenecen tanto a la inmunidad innata como a la inmunidad adquirida. La explicación de esta inhibición de la lesión puede estar relacionada de manera inicial con los efectores innatos de la inmunidad, los fagocitos profesionales polimorfonucleares y macrófagos, que son los que establecen el primer contacto con el agente agresor. Anteriormente, el efecto de la DEC sobre los fagocitos fue bien documentado por Guerrero-Ramírez (2003) en el mismo modelo del ratón BALB/c, en donde se estableció la dependencia de la dosis y el tiempo de la administración de la DEC sobre el estallido respiratorio medido asimismo con la técnica de la 123-dihidrorodamina. Este trabajo permitió establecer la dosis y el tiempo de administración usados en el presente estudio. Asimismo, la administración de la DEC antes de la inoculación con *Nocardia*, responde a lo encontrado con Guerrero-Ramírez. Es importante señalar que con anterioridad ya se había encontrado de manera inespecífica un aumento en la producción de anión superóxido y quimiolumiscencia por parte de leucocitos humanos tratados *in vitro* con DEC (Pascual y Col., 1991). Nosotros sugerimos que el aumento en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno bajo la influencia de la DEC documentado en el presente estudio, concuerda con lo descrito anteriormente y permite sugerir la idea de un efecto *in vivo*

durante las etapas iniciales de la lesión, como una posible explicación del efecto de la DEC sobre el micetoma.

La lesión inflamatoria inicial en el cojinete plantar del ratón ocurre a las 72 horas de la inoculación (Salinas-Carmona y Col., 1999) y los microabscesos a los 5 días, todo ello dentro del tiempo de administración de la DEC en nuestro esquema. La fase logarítmica de *N. brasiliensis* (en caldo BHI) es de 72 horas. En este punto de la lesión, en que se produjeron microabscesos se infiere que la lesión se desarrolla según su historia natural, sin embargo, el efecto de la DEC presente todavía en esta etapa, permite suponer que su presencia tiene efecto *in vivo* sobre las células inflamatorias fagocíticas que han demostrado activarse en este y en otros trabajos (Pascual y Col., 1990; Guerrero, 2003). El efecto directo sobre el estallido respiratorio encontrado en el presente estudio está en parcial coincidencia con lo encontrado por Guerrero-Ramírez, quien usó el mismo modelo y la misma metodología de evaluación del Índice de oxidación de las células estimuladas con DEC. En nuestro estudio, las células polimorfonucleares incrementaron la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, no así los monocitos. Guerrero-Ramírez (2003) observó que el estallido respiratorio tanto en monocitos como polimorfonucleares de ratón fue potenciado posterior a la administración de DEC (dosis baja y alta).

En el presente trabajo el incremento en la generación de metabolitos reactivos del oxígeno en los polimorfonucleares del grupo que recibió DEC, mantuvo un patrón ascendente desde la inoculación hasta el día 3, sugiriendo una mayor actividad fagocítica y antimicrobiana durante las primeras 72 horas de la infección. Estos resultados corresponden con lo descrito por Guerrero-Ramírez, donde la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células, se

incrementó más en las células polimorfonucleares con la misma dosis de DEC utilizada en nuestro trabajo (Guerrero-Ramírez, 2003). Siguiendo con las posibles causas de la inhibición de la progresión del micetoma en relación a la actividad de los PMN y macrófagos, se sugiere que el tiempo de administración y el efecto activador sobre los mismos, permiten un control de la progresión de la lesión que se hace evidente a partir del día 20 de la infección. Esta es la primera vez que tal efecto inhibitorio de una lesión inflamatoria abscedada de estas características es descrito para la DEC y a nuestro conocimiento no existen estudios previos que permitan una comparación de este efecto. Sobre la activación del estallido respiratorio de granulocitos polimorfonucleares y eosinófilos, existen antecedentes de un efecto activador de la DEC (vide infra). El mecanismo antifilarial de la droga es desconocido: sin embargo su efecto sobre las mencionadas células granulocíticas está bien documentado y se considera por lo menos uno de los mecanismos relacionados con la muerte parasitaria en los tejidos. Medina De la Garza y cols., reportaron un efecto estimulador de la DEC sobre la interacción de los eosinófilos y neutrófilos de pacientes con onchocercosis y las microfilarias de *O. volvulus* para su eliminación, cuando las células fueron pre-tratadas con la droga *in vitro* (Medina-De la Garza y Col. 1990), lo cual aunado a las observaciones de King y Col., (1983) y Ráczy y col. (1982), sugirieron una acción de la DEC *in vivo* sobre los efectores celulares fagocíticos del hospedero más que sobre el parásito mismo. Es decir una potenciación de la función oxidativa de las células posterior a la exposición de la droga. La influencia de la DEC en un modelo infeccioso producido por *N. brasiliensis* parece confirmar *in vivo* su efecto inmunomodulador observado en estudios previos por Guerrero-Ramírez sobre el estallido respiratorio (Guerrero-Ramírez, 2003). A pesar de que la actividad de los monocitos no se modificó en nuestro estudio *in vitro*, se inhibió la lesión *in vivo* de una manera evidente.

Parece existir una relación importante entre el efecto de inhibición del establecimiento del micetoma en el caso del grupo que recibió DEC y el incremento en la producción de los intermediarios reactivos del oxígeno en las células polimorfonucleares; probablemente disminuyendo el rápido crecimiento de los microorganismos, factor importante para el establecimiento de la lesión. Por otro lado, la respuesta fagocítica por si sola, no parece ser la respuesta que prevalezca sobre el tiempo total de establecimiento de la lesión, cuyo punto de establecimiento total se considera al 24º día, para este tiempo post-infección, los mecanismos de inmunidad adquirida ya se encuentran presentes. En nuestro estudio, la proliferación de linfocitos en el grupo de ratones que recibió la DEC estimulados con el ECC de *N. brasiliensis* como con el mitógeno Concanavalina A, incrementó de manera significativa en los días 21 y 28 post-infección respectivamente, en relación a la IVM y el Control por lo que la actividad mitogénica se encuentra diferenciadamente mas alta en los días en que el establecimiento del micetoma es completo en el control y en el grupo tratado con DEC se encuentra una disminución significativa del volumen de la lesión. Esta correlación entre el aumento de la actividad linfocítica, verificada *ex vivo* y la resolución de la lesión *in situ*, sugieren una respuesta celular montada y aparentemente efectiva. Cabe sugerir un efecto sinérgico y secuencial entre los primeros días del establecimiento de la infección durante las primeras dos semanas a través del las células polimorfonucleares con un grado alto de control de la lesión, con una posterior actividad mitótica aumentada de los linfocitos T enfrentados al antígeno de extracto celular crudo de *N. brasiliensis* (ECC), iniciando el día 14 y manteniendo un nivel semejante hasta el día 21, según descrito por Salinas Carmona y cols (1999), similar a lo observado en el presente estudio, donde el pico máximo de actividad se observo el día 21 con ECC y el día 28 con Con A. La respuesta a ECC al dia 21 por parte de la IVM y el control

indican una actividad mitótica baja en esos grupos, que no aumenta en la última evaluación al día 28. No existen muchos reportes del efecto directo de la DEC sobre la función de los linfocitos T. Como parte de la evaluación de la inmunidad celular, que no se encuentra incluida en este estudio, pero que merece consideración como parte fundamental de la posible modificación inmunomoduladora de la DEC a nivel celular, está la producción de citocinas, la cual ha sido estudiada en células aisladas humanas o en individuos normales a quienes se administraron dosis terapéuticas de DEC (Medina-De la Garza y Col., 1996), donde se reportó que la DEC estimula la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente IL-6, así como la IL-2 de células mononucleares *in vitro*. También reportó la producción aumentada de la quimiocina RANTES *in vitro* e *in vivo*, en voluntarios humanos sanos (Medina-De la Garza y Col., 2000; Medina-De la Garza y Col., 2002) importante citocina quimioattractante de células T y monocitos. Guerrero-Ramírez (2003) observó que en ratones inmunizados con toxoide tetánico usando la dosis terapéutica de DEC había un incremento en la producción de IL-2 e IL-12 y a su vez la disminución significativa de la producción de IL-10, por lo que estos resultados en conjunto sugieren una activación de la respuesta tipo Th1 o celular. Estos datos de estudios anteriores, documentan la posible participación de la respuesta celular en el control completo a nivel de respuesta adquirida observado en nuestro estudio a partir del día 21 de la lesión micetómica.

De la misma manera que con la IVM, no encontramos en este trabajo una correlación entre la producción de anticuerpos y la aparente protección que se da al inhibirse la lesión en el caso del grupo que recibió DEC. Aunque los estudios de Kitchen y colaboradores (1992;1993) y Guerrero-Ramírez (2003), han mostrado en general un incremento en la producción de

anticuerpos bajo el efecto de la DEC, es importante notar que la respuesta fue diferente de acuerdo al antígeno usado y la dosis. En el caso de Guerrero-Ramírez (2003), la producción de anticuerpos IgG y anticuerpos totales anti-Toxoides tetani fue mayor con la dosis alta (500mg/kg) de DEC; y en opuesto la producción de los anticuerpos anti-LPS fue mayor con la dosis baja (50 mg/kg). Guerrero-Ramírez sugiere que probablemente el efecto potenciador de la respuesta humoral que ejerce la DEC puede ser variable de acuerdo a la naturaleza del antígeno (Guerrero-Ramírez, 2003). En este mismo sentido, los resultados obtenidos por Kitchen y cols. con dos modelos diferentes de animales, usando Leukocell[®] (Kitchen y cols, 1987) y una vacuna capsular de *Streptococcus pneumoniae* (Kitchen y Col., 1992) mostraron una respuesta de anticuerpos cuantitativamente mayor a la observada por Guerrero-Ramírez o aquella encontrada en el presente estudio. La naturaleza del antígeno es un factor que debe ser considerado si se desea utilizar la DEC como un posible adyuvante de administración concomitante a la de una vacuna. Las diferencias observadas sugieren que el posible efecto adyuvante de este fármaco debe ser identificado con estudios individuales y específicos de la respuesta humoral para cada agente inmunizante. La actividad de la DEC en la protección o inhibición de la lesión micetómica en este modelo parece entonces ser resultado de una sinergia entre la actividad fagocítica y el relevo de la misma por la respuesta inmune adquirida, a través de su brazo celular. Existen muy pocos modelos de infección que hayan sido probados con DEC para evaluación de su actividad inmunomoduladora. Kitchen y cols. (1993) sugirieron un efecto protector de la DEC en un modelo de ratones CF-1 al administrar la droga más fluconazol a animales infectados con *Aspergillus*, *Candida* y *Criptococcus*; en este modelo se encontró que los animales tratados con el antifúngico y la DEC mostraban una menor mortalidad, un menor número de microorganismos recuperados (post mortem) de los órganos infectados y un aumento

en la producción de anticuerpos anti-*Cryptococcus* en los ratones que recibieron ambas drogas (Kitchen y Cols., 1993). Sin embargo, este trabajo es difícil de interpretar por la poco ortodoxa mezcla de metodologías y variables usadas en los experimentos, que impiden a nuestra experiencia, una adecuada comparación de sus resultados globales.

La resistencia a las infecciones bacterianas intracelulares como *Nocardia* involucra a casi todos los componentes del sistema inmune y principalmente a las células T. Parece ser que en el caso del grupo de ratones que recibió la DEC, la respuesta inmunológica innata, tiende a contener a los patógenos invasores en el sitio de la inflamación, donde posteriormente interacciones complejas entre las células fagocíticas y las células T toman lugar, entre las cuales la presentación de los antígenos del patógeno y la producción de las citocinas proinflamatorias y moduladoras adecuadas, lo que podría tener un lugar importante en la evolución, progresión o en la inhibición de la lesión, como fue el caso en el presente estudio.

4.3 Efecto de antiparasitarios como adyuvantes en las infecciones por intracelulares

Es cierto que las vacunas representan una de las maneras más exitosas en la ciencia médica para combatir enfermedades infecciosas, pero para aumentar la magnitud y la calidad de la respuesta inmune a los inmunógenos protectores, se requiere en ocasiones de un adyuvante. Por ello son de actual importancia los esfuerzos para identificar nuevas sustancias adyuvantes, efectivas y sobre todo no tóxicas: adyuvantes que activen al sistema inmunológico en la inducción de una respuesta inmune segura, potente y de mayor duración (Chiarella y Col.,

2007). En este sentido, existen como ejemplos bajo investigación el uso de sustancias inmunomoduladoras como adyuvantes, como el levamisol (Bozic y Col., 2003) y algunas otras como el LPS, lípido A, bajo las cuáles se puede estimular a las células del sistema inmune innato y a través de ellas a la respuesta inmune adquirida (O'Hagan y Col., 2001). Desafortunadamente la mayoría de los adyuvantes convencionales son definidos como sustancias complejas que fallan en cumplir criterios de seguridad y eficacia (Mutwiri y Col., 2007). Es plausible imaginar el uso de la DEC como una alternativa de adyuvante inmunomodulador con índice terapéutico alto, y posibilidad de estímulo de la respuesta celular.

El presente estudio indica que la DEC posee además de su actividad antiparasitaria, una actividad inmunoestimuladora principalmente sobre la actividad fagocítica y la respuesta inmune celular. Pero evidentemente no existen muchos reportes acerca del uso de ésta clase de fármacos en enfermedades infecciosas de difícil tratamiento, tal como el micetoma por *Nocardia* y otras enfermedades infecciosas por intracelulares. Los resultados presentados en este trabajo evidencian la posibilidad de utilizar la DEC como tratamiento terapéutico con el fin de estimular el sistema inmune. La administración de estas drogas antiparasitarias con propiedades moduladoras, puede inducir una activación del sistema inmune, y de esta manera incrementar la defensa contra enfermedades infecciosas y ser usada como adyuvante junto con un agente antibacteriano o antiparasitario, o bien ser utilizada para su posible co-administración como adyuvante externo por vía oral en la vacunación. Drogas químicamente definidas y seguras, de uso actual en el humano, utilizadas a dosis terapéuticas, y con actividad inmunomoduladora como es en el caso de lo mostrado por la DEC, pueden representar oportunidades importantes para su uso en el combate de la enfermedad infecciosa.

5. CONCLUSIONES

- ❖ La Dietilcarmabacina tiene un efecto modulador positivo al inhibir de manera significativa ($p < 0.05$) la progresión del micetoma en ratones BALB/c. La Ivermectina a la dosis estudiada no tiene este efecto.

- ❖ El estallido respiratorio es potenciado significativamente ($p < 0.05$) al 3er. día post-infección en las células polimorfonucleares en los ratones tratados con DEC por encima del resultado esperado en los monocitos. La Ivermectina aumenta la producción de intermediarios reactivos del oxígeno en el día 1 post-infección de manera no significativa.

- ❖ La respuesta de proliferación de linfocitos a ECC de *Nocardia brasiliensis* y a Con A, se encontró aumentada al día 21 y 28 post-infección en el grupo que recibió DEC. La IVM no mostró diferencia significativa en la proliferación comparada con el control.

- ❖ La producción de anticuerpos IgG e IgM anti-P24 no mostraron aumento con el tratamiento de Dietilcarmabacina e Ivermectina en ratones BALB/c infectados con *Nocardia brasiliensis*.

- ❖ La actividad de la DEC en relación a los parámetros estudiados y en el modelo de la infección por *Nocardia* es superior a la observada para la IVM.

PERSPECTIVAS

- El presente estudio sienta las bases para continuar con el trabajo histopatológico de las lesiones producidas por *Nocardia* bajo tratamiento con DEC, en el cuál se podrían determinar los eventos celulares de resolución de la lesión y limitación del daño observados.
- Es necesario continuar la investigación a nivel histológico y sistémico, y así mismo determinar los patrones de citocinas bajo el tratamiento con DEC.
- Evaluar el efecto de IVM y DEC en otros modelos de infección por otros organismos intracelulares.
- Evaluar en diferentes modelos de experimentación el efecto adyuvante (adyuvante oral externo) de la DEC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdi YA, Ericsson, O., Gustafsson, L. L. & Hellgren, U. (1995). Handbook of drugs for tropical parasitic infections. Taylor & Francis. 2nd Edition.
2. Akuffo H, Maasho K, Lavebratt C, Engstrom K and Britton S (1996). Ivermectine-induced immunopotentialiation in onchocerciasis: recognition of selected antigens following a single dose of ivermectin. *Clin Exp Immunolo* 103:244-52.
3. Alexandroff AB, Jackson AM, O`Donnel MZ, James K (1999). BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on.*Lancet* 353: 1689-94.
4. Arendse BJ, Van Snick & Brombacher (2005). Interleukin 9 is a susceptibility factor in Leishmania major infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. *J Immunol.* 174:2205-11.
5. Ballow, M. & Nelson, R. (1997). Immunopharmacology: immunomodulation and immunotherapy. *Journal American Medical Association* 10:278, 2008-17.
6. Baluna Roxana y Ellen Vitetta: Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* (1997) 37(2-3):117-32.
7. Balwell FR, Burke F (1989). The cytokine network. *Immunol Today.* 10:299
8. Barbosa-Luz E, Leal-de Acevedo S, Alvimar-Ferreira J, Melo-Monteiro C (1999). Tratamento da sarna costrosa com ivermectina. *An Bras Dermatol.* Rio de Janeiro; 74: 17 5 -7.
9. Barnhill RL, Doll NJ, Millikan LE(1984). Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Am Acad Dermatol;* 11:814-19.

10. Blakely, B.R. and Rousseaux, C.G. (1991). Effect of ivermectin on the immune response in mice. *American Journal of Veterinary Research* 52, 593-595.
11. Blecha F (1988). Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock. *Journal of Animal Science* 66, 2084-90.
12. Bohn E, Schmitt E, Bielfeldt C, Noll A, Schulte R, Autenrieth IB: Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. *Infect Immun* (1998) 66:2213-20.
13. Bone RC (1991). The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med.* 115:457.
14. Borkü, MK, Atala y O, Kibar M, Cam Y y Atasever A (2007). Ivermectin is an effective treatment for bovine cutaneous papillomatosis. *Research in Veterinary Science* (83):360-3.
15. Bozic F, Bilic V & Valpotic I (2002). Modulation by levamisole of CD45RA and CD45RC isoforms expression in the gut of weaned pigs vaccinated against colibacillosis. *Journal of Veterinary pharmacology and Therapeutics.* 25:69-72.
16. Bozic F, Bilic V & Valpotic V (2003). Levamisole mucosal adjuvant activity for a live attenuated *Escherichia coli* oral vaccine in weaned pigs. *J vet Pharmacol Therap.* 26:225-32.
17. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
18. Burnham G y Mebrahtu (2004). Review: The delivery ivermectin (mectizan). *Tropical Medicine and International Health.* 9: A26-46.
19. Cesbron JY, Capron A, Vargaftig BB, Lagarde M, Pincemail J, Braquet P, Taelman H. and Joseph M (1987). Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Parasitology* 100, 407-15.

20. Chedid LA, Parant MA, Audibert FM, Riveau GJ, Parant FJ, Lederer E, Choay, JP, Lefrancier PL (1982). Biological activity of a new synthetic muramyl peptide adjuvant devoid of pyrogenicity. *Infect Immun.* 35, 417–24.
21. Chiarella P, Massi E, De Robertis M, Signori E, Fazio VM (2007). Adjuvants in vaccines and for immunisation: current trends. *Expert Opin Biol Ther.* 2007 7(10):1551-62.
22. Chirigos, M. A., (1992). Immunomodulators: current and future development and application. *Thymus* 19, 1:S7-20
23. Chong KT (1987). Prophylactic administration of interleukin-2 protects mice from lethal challenge with Gram-negative bacteria. *Infect Immun*, 55:568.
24. Chuan-Yuan L, Qian H, Hsiang-Fu K (2005). Cytokine and Immuno-Gene Therapy for Solid Tumors. *Cellular & Molecular Immunology*; 2(2):81-91.
25. Cohen, L. Y., Bahr, G. M., Darcissac, E. C., Parant, M. A. (1996) Modulation of expression of class II MHC and CD40 molecules in murine B cells by various muramyl dipeptides. *Cell. Immunol.* 169, 75–84.
26. Corral LG, Kaplan G (1999). Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann Rheum Dis*; 58(1): 1107-13.
27. Cox, W.I (1988). Examining the immunologic and haematopoietic properties of an immunostimulant. *Veterinary Medicine* 6, 424-28.
28. Cummings, N. P., Pabst, M. J., Johnston, R. J. (1980) Activation of macrophages for enhanced release of superoxide anion and greater killing of *Candida albicans* by injection of muramyl dipeptide. *J. Exp. Med.* 152, 1659–1669.
29. Cutler A & Brombacher F (2005). Cytokine therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1056:16-29.

30. de Boer EC, de Jong WH, Steerenberg PA, et al. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumor necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 34:306-10.
31. de Boer EC, Somogyi L, de Ruiter GJ (1997). Role of interleukin-8 in onset of the immune response in intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. *Urol Res* 1997; 25:31-6.
32. Denis M (1991). Cytokine modulation of *Mycobacteria lepraemurium* infection in mice; important involvement of tumor necrosis factor, interleukin-2 and dissociation from macrophage activation. *Int J Immunopharma*, 13:889.
33. Dutcher J (2002). Current status of interleukin 2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. *Oncology* (Huntingt) 16:4-10.
34. Dvoroznakova E, Boroskova Z, Dubinsky P, Velebny S, Tomasovicova O and Machicka B (1998). Changes in cellular immunity in mice treated for larval toxocariasis with fenbendazole. *Helminthologia* 35:4, 189-95.
35. Dziarski, R. (1988) Enhancement of B cell stimulation by muramyl dipeptide through a mechanism not involving interleukin-1 or increased Ca²⁺ mobilization or protein kinase C activation. *Cell. Immunol.* 111, 10–27.
36. Ellouz, F, Adam A, Ciorbaru R., Lederer E (1974). Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 59:1317-25.
37. Emmendörffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, and Roesler J (1990). A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *Journal of Immunological Methods* 131: 269-275.

38. Emmendörffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Matthes ML and Roesler J (1994). Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometric)* 18:147-55.
39. Escalante E y Valdivia L (2003). Tratamiento de escabiosis humana con ivermectina vía oral dosis única. *Dermatología Perú*.13(1):17-29.
40. Fallon PG, Richardson EJ, Mckenzie GJ, and Mckenzie AN: Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J. Immunol* (2000) 164:2585-91.
41. Fernández-Vozmediano JM y Franco-Fernández R (2000). La Ivermectina en el tratamiento de la sarna. *Piel* 15: 48-51.
42. Flipo D, Bernier J, Girard D, Krzystyniak K and Fournier M (1992). Combined effect of selected insecticide on humoral immune response in mice. *International Journal of Immunopharmacology* 14, 747-52.
43. Freund J, Casals J, Hismar, EP (1937). Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Prec. Soc. Exp. Biol.Med.* 37: 509
44. George J, Elias S (1999). Thalidomide and the Titanic: Reconstructing the technology tragedies of the Twentieth Century. *Am J Public Health*; 89(1): 98-101.
45. Gery, I., Kruger, J., Spiesel, S. 1972. Stimulation of B lymphocytes by endotoxin. Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T₆T₆ thymusgrafts. *J. Immunol.* 108: 108

46. Giampietri A, Grohmann U, Vacca C, Fioretti MC, Puccetti P, Campanile F : Dual Effect of IL-4 on resistance to systemic Gram negative infection and production of TNF-alpha. *Cytokine* (2000) 12:417-21.
47. Girardin SE, Boneca IC, Viala J., Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Bio Chem.* 278:8869-72.
48. González-Ochoa A (1962). Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. *Inst. Salubr. Enferm. Trop.* 22:15-24
49. Gordon M, Bihari B, Goosby E (1998): A placebo-controlled trial of the immune modulator, lentinan, in HIV-positive patients: a Phase I/II trial. *J Med* 29:305-30.
50. Guerrero J (1977). Immunological modulating influence of levamisole. Proceedings of the Heartworm Symposium, Atlanta Georgia, 18-20 March 1977. American Heartworm Society, Veterinary Medicine Publishing Co., Bonner Springs, Kansas USA 1978 pp104-8.
51. Guerrero-Ramírez, Salinas-Carmona MC, Torres-López E, Medina-De la Garza CE (2003). Tesis de maestría “Efecto Inmunomodulador de la Dietilcarbamacina sobre la respuesta inmune humoral, celular y fagocítica del ratón BALB/c”.
52. Haaff EO, Catalona WJ and Ratliff TL (1986). Detection of interleukin 2 in the urine of patients with superficial bladder tumors after treatment with intravesical BCG. *J Urol*; 136:970-4.
53. Hadden JW (1994). T-cell adjuvants. *International Journal of Immunopharmacology.* 16:703-10.
54. Hawking F, Sewell P and Thurston J P (1950). The mode of action of Hetrazan on filarial worms. *British Journal of Pharmacology* 5, 217-38.

55. Heinzelmann, M., Mercer, J. M., Gardner, S. A., Wilson, M. A., Polk, H. C. (1997) Bacterial cell wall products increase monocyte HLA-DR and ICAM-1 without affecting lymphocyte CD18 expression. *Cell. Immunol.* 176, 127–134.
56. Heldwein KA, Fenton MJ (2002). The role of toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect* 4:937-944.
57. Hersey O, Ho K and Werkmeister J (1981). Inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures of T and B cells by levamisole *in vitro* and *in vivo*. *Clinical Experimental Immunology* 46:340-49.
58. Hewitt RI, White E, Wallace WS, Stewart HW, Kushner S. and Subbarow Y (1947). Experimental chemotherapy of filariasis. II. Effect of piperazine derivatives against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 32, 1304-13.
59. Hewlett EL, Hamid OY, Ruffier J and Mahmoud AA (1981). *In vivo* suppression of delayed hypersensitivity by thiabendazole and diethylcarbamazine. *Immunopharmacology* 3, 325-32.
60. Hillman Hillman, J.R., Westerfield, L., Ewert, A & Wang, Y. X. (1983). Serum levels of ivermectin, diethylcarbamazine citrate, in cats following different routes of administration. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 14, 171-175.
61. Hume DA (1990). Macrophage colony stimulating factor. *Life Sci.* 2:20.
62. Iglesias LE, Saumell CA, Fernández AS, Fusé LA, Lifstchitz AL, Rodríguez EM, Steffan PE, Fiel CA (2006). Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitol Res.* 100:93-102.

63. Isaacs C (1997). Randomized placebo-controlled study of recombinant human interleukin 11 to prevent chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with breast cancer receiving dose-intensive cyclophosphamide and doxorubicin. *J Clin Oncol.* 15:3368-77.
64. Ivermectina (Revectina) (08/1999). Monografía Laboratorio Sintofarma Brasil. 1-44.
65. Johnson AJ, Gaines S, Landy M (1956). Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa* V. Enhancement of the antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J.Exp. Med.* 103:225.
66. Kaplan G, Kiesling R, Terlemariam S, Hancock G, Sheftel G, Job CK, Converse P, Ottenhoff THM, Becx-Bleumink M, Dietz M, Cohn ZA. The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin-2. *J Exp Med*, 169:893.
67. Katzung B (2005). Farmacología Básica y Clínica. 9a Edición en español. Manual Moderno. Cap 54 Antiprotozoarios. 876-7.
68. Kaufmman SH (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Ann Rev Immunol.* 11:129-63.
69. Kayatas M (2002). Levamisole treatment enhances protective antibody response to hepatitis B vaccination in haemodialysis patients. *Artificial Organs* 26:492-96.
70. Kehrli ME Jr, Roth JA (1990). Chemically induced immunomodulation in domestic food animals. *Adv Vet Sci Comp Med.* 35:103-19.
71. Kephart GM, Gleich GJ, Connor DH, Gibson DW and Ackerman S J (1984). Deposition of eosinophil granule major basic protein onto microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin of patients treated with diethylcarbamazine. *Laboratory Investigation* 50, 51-61.
72. Kephart GM, Gleich GJ, Connor DH, Gibson DW and Ackerman SJ (1984). Deposition of eosinophil granule major basic protein onto microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin of patients treated with diethylcarbamazine. *Laboratory Investigation* 50, 51-61.

73. King CHn Greene B & Spagnuolo PJ (1983). Diethylcarbamazine-citrate, an antifilarial drug, stimulates human granulocyte adherence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 24:453-56.
74. King CL and Nutman TB (1991). Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Immunology Today* 12, A54-8.
75. Kitchen LW (1987). Effect of diethylcarbamazine on cats given feline leukemia virus vaccine. *Vaccine* 5, 266-7.
76. Kitchen LW and Cotter SM (1988). Effect of diethylcarbamazine on serum antibody to feline oncornavirus-associated cell membrane antigen in feline leukemia virus cats. *Journal Clinical Laboratory Immunological* 25, 101-3.
77. Kitchen LW, Mather FJ and Cotter SM (1988). Effect of continuous oral diethylcarbamazine treatment on lymphocyte counts of feline leukemia virus-infected cats. *Journal Clinical Laboratory Immunological* 27, 179-181.
78. Kitchen LW, Mather FJ, Chapple FE and Bilello JA (1990). Effect of administration of diethylcarbamazine on murine leukemia virus (Cas-Br-M) infected mice. *Journal Clinical Laboratory Immunological* 33, 97-105.
79. Kitchen LW, Ross JA, Hernández JE, Zarraga AL and Mather FJ (1992). Effect of administration of diethylcarbamazine on experimental bacterial and fungal infections in mice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1, 259-68.
80. Kitchen LW, Ross JA, Hernández JE, Zarraga AL and Mather FJ (1993). Effect of administration of diethylcarbamazine with and without fluconazole on experimental fungal infections in mice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2, 237-46.

81. Kotani S, Takada H, Tsujimoto M, Ogawa T, Harada K, Moil Y, Kawasaki A, Tanaka A, Nagao S, Tanaka S, Shiba T., Kusurnoto S, Imoto M, Yoshimura H, Yamamoto M, Shimamoto T (1984). Immunologically active lipid A analogues synthesized according to a revised structural model of natural lipid A. *Infect. Immun.*45: 293.
82. Krishna DR, Klotz U (1993). Determination of ivermectin in human plasma by high performance liquid chromatography. *Arzneimittel-Forschung* 43; 609-11.
83. Laemmli, VK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
84. Lamie PJ, Hightower AW, Richards Fo Jr; Bryan RT, Spencer HC, McNeeley DF, McNeeley MB and Eberhard ML (1992). Alterations in filarial antigen specific immunologic reactivity following treatment with ivermectin and diethylcarbamazine. *American Tropical Medicine and Hygiene* 46, 292-95.
85. Lamm DL (1995). BCG in perspective: advances in the treatment of superficial bladder cancer. *Eur Urol* 27 Suppl.1: 2-8.
86. Lamm DL, Stogdill VD, Stogdill BJ, Crispen RG (1986). Complications of Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer. *J Urol*; 135:272-4.
87. Leslie H (1998). Talidomida: Polémica y potencial. *SF AIDS Fdn* 5(98):1-6.
88. Lindblad EB (2000). Freund's adjuvants. In: O'Hagan DT, ed. *Methods in Molecular Medicine: Vaccine Adjuvants—Preparation Methods and Research Protocols*. Totowa NJ: Humana Press. p 49-63.
89. López.Olvera J.R., Hofle U, Vicente J, Fernández-De-Mera IG, Gortazar C (2006). Effects of parasitic helminths and ivermectin treatment on clinical parameters in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Parasitology Research*: 98, 582-87.

90. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Lavalle P, Welsh O, Saúl A, Macote-Ruíz E (1992). Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gac Med Mex.* 128:477-81.
91. Lotzová E (1994). Therapeutic possibilities with cytokines and cytotoxic lymphocytes in infectious diseases, chapter 1, Immunotherapy of Infectious, K Noel Masihi. Marcel Dekker Inc. pag 3-17.
92. Mackenzie CD (1980). Eosinophil leukocytes in filarial infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74 (suppl.), 51-8.
93. Mackenzie CD and Kron, MA (1985). Diethylcarbamazine: a review of its action in onchocerciasis, lymphatic filariasis and inflammation. *Tropical Diseases Bulletin* 82, R1-37.
94. Maisels RM. and Denham, (1992). Diethylcarbamazine (DEC): Immunopharmacological interactions of and anti-filarial drug. *Parasitology*, 105, S49-S60.
95. Marcellin P (2004). Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 352:1206-17.
96. Mariat F, Destombes Pand Segretain G (1977). The mycetomas: clinical features, pathology. etiology and epidemiology. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 4:1-39
97. Martínez Manrique CE (2005). Modulación de la respuesta Inmune. Tendencias vigentes. *Medisan*: 9(3)
98. Martínez-Báez Martínez-Báez, M. (1949). Desintegración de las microfilarias de *Onchocerca volvulus* en la piel de los pacientes onchocercosos tratados con Hetrazan. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* (México). 10, 95-99.
99. Martínez-Pineiro JA, Solsona E, Flores N e Isorsona S (1995). Improving the safety of BCG immunotherapy by dose reduction. Cooperative Group CUETO. *Eur Urol* 27 Suppl. 1:13-8.

100. Masihi K.N. (2001). Fighting infection using immunomodulatory agents. *Expert Opin Biol Ther* 1(4):641-53.
101. Masihi KN, (2000). Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *Int J Antimicrob Agents* 14(3): 181-91.
102. Matthews DJ, Emson CL, Mckenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, Mckenzie AN: IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol* (2000) 164: 1458-62.
103. Mazzotti, L (1948). Posibilidad Posibilidad de utilizar como medio diagnóstico en la oncocercosis, las reacciones alérgicas consecutivas a la administración de Hetrazan. *Revista Instituto Salubridad y Enfermedades Tropicales* (México) 10,95-99.
104. Means TK, Wand S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 163:3920-27.
105. Medina-De la Garza C E, Brattig NW & Salinas-Carmona MC. (2000). Producción *in vitro* de RANTES por Dietilcarbamazina e Ivermectina. *Memorias XIV Congreso Nacional de Inmunología* (Sociedad Mexicana de Inmunología, A. C.) pp. 104.
106. Medina-De la Garza CE, Brattig NW, Tischendorf FW and Jarret JMB (1990). Serum-dependent interaction of granulocytes with *Onchocerca volvulus* microfilariae in generalized and chronic hyper-reactive diethylcarbamazine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 701-6.
107. Medina-De la Garza CE, Sepúlveda-Saavedra J, Ballesteros-Elizondo R. and Navarro-Cervantes AL (1992). *Memorias X Encuentro de Investigación Biomédica* (Facultad de Medicina, U. A. N. L.) pp. 107

108. Medina-De la Garza CE, Sepúlveda-Saavedra J, Ballesteros-Elizondo R. and Navarro-Cervantes AL (1992). *Memorias X Encuentro de Investigación BioMédica* (Facultad de Medicina, U. A. N. L.). pp. 107.
109. Medina-De la Garza CM, García-López HL and Salinas-Carmona MC (1996). Producción de citocinas in vitro por estimulación con antifilariales. XXI Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. III Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia.
110. Medina-De la Garza CM, Guerrero-Ramírez G. & Salinas-Carmona MC. (2002). Producción de RANTES estimulada por DEC *in vivo*. XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica.
111. Meierhofer C, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ (1999). Protein kinase C dependent effects on leukocyte migration of thalidomide. *The J Infect Dis*;180(1): 216-32.
112. Miles A and Misra SS (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hygiene* 38:732-49.
113. Mitwiri G, Gerdt V, Lopez M, Babiuk LA (2007). Innate immunity and new adjuvants. *Rev Sci Tech.*; 26(1):147-56.
114. Mojziso J, Hromada R, Paulik S, Ondrasovic M and Bajova V (2004). Immune response and immunomodulatory effect of levamisole in immunosuppressed dogs vaccinated against Parvovirus. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy* 48, 93-7.
115. Mombelli B, Gismondo M: The use of probiotics in medical practice. *Int J Antimicrob Agents* (2000) 16:531-36.
116. Morales A, Eidenger D and Bruce AW (1976). Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116: 180-83.

117. Mulcahy G, Quinn PJ. (1986). A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*; 9(2):119-39.
118. Nathan CF, Murray HW and Cohn ZA (1980). The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* 303:622–626.
119. Nauciel Ch (1999). Immune defences against intracellular bacterial infections. *Opportunistic Intracellular Bacteria and Immunity*, edited by Lois J. Paradise et al. Plenum Press, New York, 1999.
120. Naylor PH and Hadden JW (2003). T cell-targeted immune enhancement yields effective T cell adjuvants. *International Immunopharmacology* , 1205-15.
121. Nelson P, Sellon R, Novotney C, Devera C, Davidian M, English R and Tompkins W (1995). Therapeutic effects of diethylcarbamazine and 3'-azido-3'-deoxythymidine on feline leukemia virus lymphoma formation. *Immunol immunopathol* 46, 181-194.
122. Nigou J, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M, Puzo G (2002). Mycobacterial lipoarabinomannans: Modulators of dendritic function and the apoptotic response. *Microbes Infect* 4:945-953.
123. O'Hagan O'Hagan DT, MacKichan ML, Singh M (2001). Recent development in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng.* Oct 15;18(3):69-85
124. Otto H, Ulmer AJ, Brade H and Rietschel ET. On the Chemistry and Biology of Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides. Chapter 28. Immunotherapy of Infectios, Edited by K. Noel Masihi. Pag 281-301
125. P.R. Vademécum (2006). Libro que reúne toda la información relacionada con los productos farmacéuticos y está destinado a médicos, odontólogos, farmaceuticos y otros profesionales de la salud.

126. Pascual C., González R. & Romay C. (1991). Drugs effects on superoxide generation and chemiluminescence response of human leukocytes. *Agents and Actions* 32: 277-282
127. Patel A, Hogan P, WeIder B (1999). Crusted scabies in two immunocompromised children successful treatment with oral ivermectin. *Australes J Dermatol* ; 40: 37-40.
128. Paxton WA, Liu, R, Kang S, Wu L, Gingeras T R, Landau NR, Mackay CR and Koup RA (1998). Reduced HIV- 1 infectability of CD4⁺ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology* 25; 244:66-73.
129. Pell, J.M., James, S (1995). Immuno-enhancement and -inhibition of GH-releasing factor by site-directed anti peptide antibodies in vivo and in vitro. *J Endocrinol.* 146(3):535-41
130. Pelletier M, Willoughby DA and Giround JP (1978). Modulating effect of levamisol on DNA synthesis in macrophages in vitro. *Journal of the Reticuloenbdotelial Society* 24:333-38
131. Powell RJ (1996). New Roles for thalidomide: A unique anti-inflammatory, but use it only when no alternatives exist. *BMJ* ; 313(7054):377-78.
132. Prescott S, James K, Hargreave TB (1990). Radio-immunoassay detection of interferon-gamma in urine after intravesical Evans BCG therapy. *J Urol*; 144:1248-53.
133. Quinn, P.J. (1990). Mechanism of actions of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 35, 43-9.
134. Racz P, Tenner-RÁCz K, Büttner DW & Albiez EJ (1982). Ultrastructural evidence for eosinophil-parasite adherence (EPA) reaction in human onchorcecal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. *Tropenmedizin und Parasitologie* 33, 213-18.

135. Racz Rác P, Tenner-Rác K, Büttner DW and Albiez EJ (1982). Ultrastructural evidence for eosinophil-parasite adherence (EPA) reaction in human onchorcecal lymphadenitis in the early period following diethylcarbamazine treatment. *Tropenmedizin und Parasitologie* 33, 213-18.
136. Rao, UR, Chandrashekar, R. and Subrahmanyam D (1987). Effect of ivermectin on serum dependent cellular interactions to *Dipetalonema viteae* microfilariae. *Tropical Medicine and Parasitology* 38, 123-127.
137. Reddy PG, Frey RA (1990). Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. *Adv Vet Sci Com Med*; 35:255-81.
138. Réé, G. H., Hal, A. P., Hutchinson, D. B. A. & Weatherley, B. C. (1979). Plasma levels of diethylcarbamazine in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 542-43.
139. Rietschel, ET; Brade, H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992 (2):54–61.
140. Riveau, G. J., Brunel, R. B., Audibert, F. M., Chedid, L. A. (1991) Influence of a muramyl dipeptide on human blood leukocyte functions and their membrane antigens. *Cell. Immunol.* 134, 147–156.
141. Rosenberg SA, Mule JJ, Spiess PJ, Reichert CM, Schwarz SL (1985). Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin-2. *J Exp Med.* 161:1169-88.
142. Sajid MS (2004). Studies on the immunomodulatory effect of ivermectin in rabbits. M.Sc. Thesis, Department of Veterinary Parasitology, Faculty of Veterinary Science, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.
143. Sajid MS, Iqbal Z, Muhammad G and Iqbal MU (2006). Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. *Parasitology*132:301-13.

144. Sajid SM, Iqbal Z, Muhammad G, Sandhu MA, Khan MN, Saqid M, Iqbal MU (2007). Effect of ivermectin on the cellular and humoral immune responses of rabbits. *Life Sciences*. 80:1966-70.
145. Salinas-Carmona MC, Welsh O, Casillas SM (1993). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and clinical correlation with mycetoma infections. *J Clin Microbiol*. 31(11):2901-6.
146. Salinas-Carmona MS y Torres-López ET (1996). Role of Passive Humoral Immunity in Experimental micetoma by *Nocardia brasiliensis*. Microbial Pathogenesis and Immune Response II. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol 797:263-265.
147. Salinas-Carmona M.C., Torres-López E., Ramos A.I., Licón-Trillo A., Gonzalez-Spencer D. (1999). Immune Response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 67:2428-2432.
148. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor (alpha) production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*. 173:699-703.
149. Sanavanur NH, Honnergowda S, Krishnappa, G, Shastri, KNV. and Narayana KK. (1996). Effect of ivermectin on lymphocyte status in rabbits. *Indian Veterinary Journal* 73, 501-3.
150. Sanders, M.A., Bruce, A., Stephen, B., Nancy, I., Kerkvliet, N.I. and Kaminski, N.E. (1991). Symposium on indirect mechanisms of immune modulation. *Fundamental and Applied Toxicology* 17, 641-50.
151. Savanur NH, Honnegowda G, krishnappa, Shastri KNV, Narayana KK (1996). Effect of ivermectin on lymphocyte status in rabbit. *Indian Veterinary Journal* 73, 501-3.
152. Savanur, N.H. Honnegowda, Shastri, KNV, Krishnappa, G and Narayana, K.K. (1995). Effect of ivermectin on immune response in rabbits inoculated with *Salmonella* antigen. *Indian Veterainary Journal* 72, 221-3.

153. Singhal BP, Singhal LK and Chauhan RS (2001). Fenvelerate-induced cell mediated immunological alterations in chicken. *Journal of Immunology and Immunopathology* 3, 59-62.
154. Smith DE, O'Brien ME, Palmer VJ, Sadowski JA(1992). The selection of an adjuvant emulsion for polyclonal antibody production using a low molecular-weight antigen in rabbits. *Lab Anim Sci* 42:599-601.
155. Smith KA (1979). Interleukin-2; inception, impact and implication. *Science*. 240:1169.
156. Soboslay PT, Dreweck CM, Hoffmann WH (1992) Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment. *Clin Exp Immunolo* 89:407-13.
157. Soboslay PT, Luder CG, Hoffmann WH, Michaelis I, Helling G, Heuschkel C, Dreweck CM, Blanke CH, Pritze S, Banla M y Schulz-Key H (1994). Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis; activation of parasite-specific T_h1-type responses with subclinical *Onchocerca volvulus* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 96, 238.
158. Souvannavong, V., Brown, S., Adam, A. (1990) Muramyl dipeptide (MDP) synergizes with interleukin-2 and interleukin-4 to stimulate, respectively, the differentiation and proliferation of B cells. *Cell. Immunol.* 126, 106–116.
159. Stankiewicz M, Cabaj W, Jonas WE, Moore LG, Millar K and Ng Chie W (1995). Influence of ivermectin on cellular and humoral immune responses of lambs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44, 347-58.
160. Stills JF Jr. (2005). Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J* 46:280-293.
161. Stuart WH, Cohan S, Richert JR, Achiron A (2004). Selecting a disease-modifying agent as platform therapy in the long-term management of multiple sclerosis. *Neurology* 63:S19-27

162. Suzuki H, Wang B, Shivji GM, (2000). Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol*; 114 (1): 135–141.
163. Tanamoto K, Zahringer U, McKenzie GR, Galanos C, Rietschel E, Liideritz O, Kusunaoto S, Shiha T (1984). Biological activities of synthetic lipid A analogs: Pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of limulus ameobocytelysate. *Infect. Immun.* 44: 421
164. Thalmann GN, Dewald B, Baggolini M (1997). Interleukin-8 expression in the urine after bacillus Calmette-Guerin therapy: a potential prognostic factor of tumor recurrence and progression. *J Urol* 1997; 158:1340-6.
165. Thanhäuser A, Bohle A, Schneider B, Reiling N, Mattern T, Ernst M, Flad HD, Ulmer AJ (1995). The induction of bacillus-Calmette-Guerin-activated killer cells requires the presence of monocytes and T-helper type-1 cells. *Cancer Immunol Immunother.* Feb;40(2):10
166. Theinpont D, Vanparijs OFJ, raeymaekers AHM, Vanderbek J, Demoen PJA, Allewijn FTN, Marsboom RPH, Niemegeers CJE, Schellekens KHL and Janseen PAJ (1966). Teteramisole (R(2299), a new, potent broad spectrum anthelmintic. *Nature*, London 209: 1084.
167. Tischendorf FW, Brattig NW, Hoyer A, Medina-De la Garza CE amd Geisinger F (1992). Modulatory effects of antifilarial drugs ivermectin, CPG 6140 and CGP 20376 on the oxidative burst of eosinophilic granulocytes. *Acta Tropic*; 53:27-37.
168. Uhlir J, Volf P (1992). Ivermectin: its effect on the immune sytem of rabbits and rats infested with ectoparasites. *Veterinary Immunology and Immunophatology* 34, 325-36.
169. Uyttenhove C, Arendse B, Stroobant V, Brombacher F; Van Snick J (2004). Development of an anti-IL-12 p40 auto-vaccine:protection in experimental autoimmune encephalomyelitis at the expense of increased sensitivity to infection. *Eur J Imunol* 34:3572-81.

170. Van der Meijden PM, Debruyne FMJ, Steerenberg PA, de Jong WH (1989). Aspects of non-specific immunotherapy with BCG in superficial bladder cancer: an overview. En: Debruyne FMJ, Denis L, van der Meijden PM, ed. EORTC GU Group, Monograph 6. BCG in superficial bladder cancer. Nueva York: Alan R. Liss, Inc 1989; 11-33.
171. Vanchieri C (1997). Preparing for thalidomide's comeback. *Ann Int Med*; 127(10): 951-952.
172. Vázquez-Lavista LG, Flores-Balcázar CH y Lorente L (2007). El bacilo de Calmette-Guerin como inmunomodulador en neoplasias de vejiga. *Revista de investigación clínica El Rincón del Residente* Vol:59; 2: 146-52.
173. Vera-Cabrera L., Salinas-Carmona M.C., Welsh, O (1992). Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol* 30(5):1183-88.
174. Wallace RJ, Brown Jr BA, Blacklock Z, Ulrich R, Jost K, Brown JM, McNeil MM, Onyi G, Steingrube VA and Gibson J (1995). New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J Clin Microbiol* 33:1528-33.
175. Warren HS, Vogel SR, and Chedid LA (1986). Current Status of Immunological Adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.* 4:369-88.
176. Webster, L.T (1985). Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis. In the *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Edn (ed. Gilman, A.G., Goodman LS), 1007-1028. MacMillan, New York.
177. Welsh O, Salinas MC and Rodriguez MA (1994). Mycetoma. In P.D: Hoeprich, MC Jordan and AR Ronald ed., *Infectious Diseases*, 5th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa.
178. Weyand C, Goronzy J, Fathman CG, Hanley PO (1978). Administration in vivo of recombinant IL-2 protects mice against septic death. *J Clin Invest*, 79:1756.

179. Ximénez C, Melendro EI, González-Mendoza A, García AM, Ortiz-Ortiz L (1980). Resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice immunized with either *Nocardia* or BCG. *Mycopathologia* 70:117-22.
180. Yasui H, Shida K, Matsuzaki T, Yokokura T: Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* (1999) 76: 383-89.
181. Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury J F, Bizzini B, Gringeri A, Santagostino E, Rappaport J, Feldman M, O'Brien SJ, Burny A and Gallo RC (1998). C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 3857-61.
182. Zanher H, Soulsby E JL, Weidner E and Lämmler G (1978). Effect of diethylcarbamazine on the microfilariae of *Litomosoides carinii* in *Mastomys natalensis*: dynamics of cell adhesion, immobilization and elimination of microfilariae. *Tropenmedizin und Parasitologie* 29, 15-26.
183. Zheng HJ, Tao ZH, Cheng WF, Wang SH, Cheng SH, Ye YM, Luo LF, Chen XR, Gan GB y Piessens WF (1991). Efficacy of ivermectin for the control of microfilaremia recurring after treatment with diethylcarbamazine. II. Immunological changes following treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45, 175-81.