

01421
207



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

VALORACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR
ANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ADYUVANTES

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

EDGAR RAMIRO MÉNDEZ SÁNCHEZ

DIRECTORA: DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA

ASESOR: C.D. DANIEL QUEZADA RIVERA
ASESOR: M.V.Z. M.S.P. JULIO GONZÁLEZ CÓMEZ

U.S.B.
[Handwritten signature]



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Abrazo con amor:
a Mamá, Mavi y Bibi...**

**con gratitud:
a tía Bertha y tío Francisco...**

**con lealtad:
a Omar....**

**con admiración y el corazón en los brazos:
a Héctor.**

Mi reconocimiento :

a la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta
por alentar este trabajo, pero por sobretodo... su confianza.

a mis asesores C.D. Daniel Quezada y M.V.Z. Julio González
y con ellos a mis Profesores y Maestros
por su guía.

al Dr. José Morales y C.D. Ailleen Bueno
por todo su apoyo.

al C.D. Juan Salazar
por su ayuda.

a la
Universidad Nacional Autónoma de México
...mi orgullo.

RESUMEN

OBJETIVOS: Comparar la respuesta celular y la reacción tisular local posterior a la inoculación de tres diferentes adyuvantes inmunológicos. Describiendo la respuesta inflamatoria y estimando el alcance de la respuesta inmune local en términos cualitativos.

Describir y comparar el grado específico de reacción local que genera el gel de Fe dextrano con respecto al control.

METODOLOGÍA: Se emplearon 20 ratas de la cepa Wistar SPF, con peso de 300 gr. (+/-10). El acondicionamiento fue el propio del Bioterio de la Unidad de Posgrado de la FO, UNAM. Se formaron 4 grupos de forma aleatoria (un control y tres experimentales). Administrando por vía IM (región inguinal), solución salina 5% al grupo control, adyuvante completo de Freund (FCA) al grupo experimental 2, suspensión de hidróxido de aluminio $[Al(OH)_3]$ y magnesio $[Mg(OH)_2]$ al grupo 3, y gel de Fe dextrano al grupo experimental 4. Se hicieron registros continuos de las condiciones clínicas locales de las zonas infiltradas; se sacrificaron los animales en cuatro etapas, diseccionando tejido muscular y piel. Los tejidos se procesaron para inclusión en parafina. La tinción para su observación al microscopio de luz fue la de rutina con H y E.

RESULTADOS: Los especímenes tomados de piel no reportaron cambios significativos, presentando una estandarización (en términos cualitativos) de la respuesta inflamatoria con respecto al control en las primeras 72 hrs. Las posteriores biopsias mostraron una reacción nula a nivel de este tejido. Durante la cirugía dirigida, el tejido muscular indicó una reacción importante en el grupo del FCA en un lapso corto de tiempo (72hrs.), dicha reacción se extendía sobre la fascia y penetraba el músculo, encontrándose bien delimitada; la cual decreció a lo largo del estudio. Asimismo, el grupo experimental al que se administró el $Al(OH)_3$ desarrolló una lesión en un periodo de 7 a 14 días, semejante a la del grupo experimental donde se inoculó el FCA. Vistos al microscopio de luz, ambos casos presentaban un incremento importante en la población de neutrófilos polimorfonucleares, linfocitos, fibroblastos y células plasmáticas a medida que

avanzaba el estudio. El grupo experimental del gel de Fe dextrano mantuvo una reacción inflamatoria de leve a moderada, con presencia importante de linfocitos y macrófagos (fagocitando el hierro).

INTRODUCCIÓN

*No es sólo un paso más sobre la tierra:
es el giro que funda en su armonía
el sentido del mundo y de los cuerpos...*

Roberto Vallarino

No obstante vivir en un medio altamente contaminado por agentes agresores reales o potenciales, el hombre y los animales normalmente no sufrimos sus impactos. Ello se debe a que poseemos una serie de mecanismos defensivos y protectores que nos aseguran cierta integridad; cuando alguno de estos mecanismos falla o presenta deficiencias se producen agresiones al organismo.

Es innegable que a diario nuestro organismo libra batallas contra un sinfín de infecciones, sin embargo, nuestra conciencia de este hecho está muy por debajo de la importancia real que tiene para nuestra integridad el buen funcionamiento del sistema inmunológico.

Las mismas condiciones y exigencias de la profesión hacen que buena parte de nuestra labor consista en tratar con procesos infecciosos constantemente, incluso recurrentes y crónicos. Pero no somos nosotros quienes generamos las condiciones que llevarán al organismo a la homeostasis. Por sí mismo, nuestro cuerpo es capaz de resolver satisfactoriamente la mayoría de los eventos agresivos que amenazan la continuidad del estado de salud.

La "inmunidad" es, ciertamente, un proceso que se va definiendo con el tiempo pero que desgraciadamente no es totalmente definitivo, aunque sí altamente efectivo a medida que el sistema obtiene "memoria". Es esta búsqueda de "memoria", la que hace al hombre indagar, explorar, investigar los medios más eficaces y seguros que lo conduzcan a obtenerla. Y entonces existen observaciones primero, experimentos y luego estudios más elaborados, en busca de las condiciones y/o factores necesarios para lograrlo. Por tales motivos tenemos hoy en día una herramienta de esencial importancia en cuanto a salud pública se refiere, las vacunas o inmunizaciones.

Regresemos a nuestros primeros días, por ejemplo, cuando la forma más eficiente de obtener protección ante infecciones era la suministrada por la madre, primeramente por el cordón umbilical y poco más tarde a través de la leche materna (calostro). Aunque no es duradera la protección que nos confiere, los antecedentes inmunológicos que se registran son de gran valor. Igualmente es en los primeros meses y años de nuestra vida, se nos concede una protección extra al ser inmunizados.

No hay más que voltear hacia las investigaciones que se realizan hoy en día para darnos cuenta de que los retos que se nos presentan requieren de estudios serios y profesionales. Está el ejemplo más claro, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el que en este momento no sólo ocupa un lugar importantísimo en cuanto tiempo y recursos destinados a su solución, sino también a sus cuestiones sociales y legales.

El elevado costo de los tratamientos en la actualidad hacen necesaria la búsqueda de alternativas que resulten más económicas, procesos prácticos, menos onerosos y de resultados fiables.

También están otras investigaciones, incluso algunas que en el papel parecerían un tanto idílicas, por así decirlo, como la vacuna contra la caries dental; o tan desafiantes como resulta el transplante de órganos, y que decir de las enfermedades autoinmunes: diabetes insulino dependiente, lupus eritematoso, etc. En cuyos casos siempre estarán involucrados procesos inmunológicos, fundamentales en la continuidad y procuración de nuestro estado de la salud.

ANTECEDENTES

El término inmunidad proviene del latín *immunitas*, que significa exención o privilegio, pero el concepto seguramente es muy antiguo. Tucídides, durante la peste que asoló Atenas, ya había comprobado cómo las personas que habían pasado la enfermedad quedaban "protegidas", siendo por ello muy útiles para atender a los enfermos.¹

La inmunología se ocupa del estudio de los mecanismos por los cuales los seres vivos se defienden contra aquello que les es extraño (antígeno-inmunógeno). El sistema encargado de la defensa se conoce como sistema inmunitario y comprende una serie de órganos, células y componentes moleculares repartidos en todo el organismo.²

INMUNÓGENO – ANTÍGENO

Se define como inmunógeno aquella molécula capaz de inducir una respuesta inmune, siendo un antígeno aquella competente para reaccionar con un anticuerpo. Aunque muchas veces son usados como sinónimos, existen rasgos de cada uno que los diferencian y hacen particulares a cada caso. Si una molécula es inmunogénica, también es antigénica; sin embargo, a la inversa no siempre funciona así; como por ejemplo, el caso de los haptenos, que son moléculas de peso molecular determinado, algunas de complejidad estructural, que pueden ligarse a anticuerpos preformados; y sin embargo, por sí mismos no desencadenan respuesta inmune, es decir, no son inmunógenos.

Los antígenos exhiben una serie de propiedades inmunológicas:

- **Inmunogenicidad:** capacidad de inducir una respuesta inmune específica, humoral y/o celular (en este sentido, antígeno sería sinónimo de inmunógeno).
- **Antigenicidad:** capacidad de combinarse con anticuerpos y/o con receptores de células T (TCR).

- **Alergenicidad:** capacidad de inducir algún tipo de respuesta alérgica. Los alérgenos son inmunógenos que tienden a activar ciertos tipos de respuestas humorales o celulares que dan síntomas de alergia.
- **Tolerancia:** capacidad de inducir una falta de respuesta específica en la rama celular o en la humoral.³

En las definiciones anteriores de antígeno e inmunógeno, se explica "*lo que hace*", mas no "*lo que es*". En términos fisicoquímicos los inmunógenos son macromoléculas, de alto grado de complejidad estructural, que son solubles o pueden ser fragmentados por los macrófagos y que por último, son extraños al organismo. Por tanto, las características de un antígeno son:

- **Tamaño macromolecular:** debe tener un peso molecular mínimo de 10 000 daltons. Las moléculas de menor tamaño son poco antigénicas (Insulina P.M. 5 700, por ejemplo); cuanto mayor es el peso molecular de una sustancia, más elevada será la posibilidad de que funcione como antígeno.
- **Complejidad molecular:** el alto peso molecular no es suficiente para conferir antigenicidad. La composición y secuencia de las unidades estructurales de la molécula constituyen su unidad primaria. Ahora bien, el tamaño de la cadena o unidad primaria puede ser muy grande y aún así no poseer características antigénicas, por ejemplo, el Teflón® carece de complejidad molecular a pesar de ser una molécula de gran tamaño.
- **Solubilidad:** otro argumento para explicar la falta de antigenicidad de polímeros sintéticos es su insolubilidad en líquidos del cuerpo y la imposibilidad de que enzimas tisulares los conviertan en formas solubles.
- **Carácter de extraño:** para que sea antigénica, la macromolécula debe provenir de una fuente extraña, sea distinta o de la misma especie del organismo inmunizado. Cuanto más distante y/o extraña sea la fuente del antígeno, mayores serán sus propiedades antigénicas.⁴

MECANISMOS DE DEFENSA

Existen medios que permiten la integridad del huésped antes de que se produzca una infección, estos son de tipo inespecífico y específico.¹

INESPECÍFICOS

- Barreras físicas (piel y mucosas)
- Barreras químicas (antienzimas, p. e. hialuronidasa)
- Fagocitosis
- Interferón
- Respuesta inflamatoria
- Sistema de Complemento

ESPECÍFICOS

- Inmunidad
 - o Activa
 - Espontánea
 - Artificial
 - o Pasiva
 - Congénita
 - Artificial

MECANISMOS INESPECÍFICOS

La piel y las mucosas proveen de una barrera física fundamental ante la invasión de microorganismos, siendo la integridad de estas su mejor argumento de defensa. Es bien sabido que la falta de continuidad de alguna de estas barreras es una entrada directa que facilita la infección.¹

Otro importante mecanismo de defensa inespecífico son las enzimas. Una de las más importantes, la lisozima, es capaz de romper azúcares de aminopolisacáridos con la consecuente despolimerización de los mucopolisacáridos de la membrana celular, destruyendo la integridad bacteriana. En el ser humano las concentraciones máximas de enzimas se pueden encontrar en lágrimas, moco, saliva y calostro.

En el plasma normal se encuentran diferentes antienzimas, que antagonizan con productos enzimáticos de bacterias, como ejemplos tenemos la anti-hialuronidasa, que actúa contra la hialuronidasa bacteriana y las anti-proteasas que inhiben la acción proteolítica de enzimas bacterianas.⁵

Un mecanismo inespecífico de gran relevancia: la fagocitosis, se lleva a cabo, preferentemente, por los macrófagos. Los monocitos emigran a los tejidos periféricos, donde asumen la función de macrófagos, lo que ha llevado a plantear el concepto de una única unidad funcional, el sistema monocito-macrófago (sistema mononuclear fagocitario) compuesto por los monocitos circulantes, sus precursores de la médula ósea y los macrófagos de los tejidos tanto libres como fijos (histiocitos). Dentro de este sistema se incluyen también las células de Kupffer del hígado, la microglia del SNC, las células de Langerhans de la piel, células presentadoras de antígeno de órganos linfoides y los osteoblastos del hueso. Ni las células endoteliales de los vasos ni las células reticulares y los fibroblastos de los órganos linfoides, que pueden poseer cierta capacidad fagocitaria, no forman parte de este sistema, aunque si se incluían en el concepto, hoy obsoleto, de sistema reticuloendotelial.⁶

La fagocitosis consiste en la incorporación intracelular de material extraño, el cual es desorganizado en varias partículas (mayores de 500 Angstroms). Las células más activas en este proceso son los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos. La fagocitosis es el medio más importante de inactivación y/o remoción de bacterias y partículas extrañas. Pero los fagocitos no sólo tienen la capacidad de "ingerir" bacterias, moléculas y partículas, sino también de absorber, incorporar y degradar sustancias solubles.

Un mecanismo más de defensa lo constituye el interferón. El descubrimiento de este factor comienza con la observación en 1937, de que la presencia de una infección

viral en monos "interfería" con el desarrollo de un segundo virus en el mismo animal. En 1956 se logra la identificación de una sustancia soluble que ocasionaba este fenómeno; se demostró que era una proteína con peso molecular de 30 000 daltons. Su estructura varía con la especie y su producción no está ligada únicamente a una infección viral como se pensaba anteriormente, sino que una gran cantidad de agentes no virales como bacterias, rickettsias, endotoxinas, etc., pueden inducir la producción de interferón.⁷

Considerado inicialmente como una globulina única, el complemento representa un complejo sistema de factores, de los cuales 4 fracciones (C₁, C₂, C₃ y C₄), fueron separadas como proteínas séricas individuales en base a sus propiedades inmunoquímicas y fisicoquímicas. Después se encontró que la fracción C₁ está formada por 3 componentes y la fracción C₃ por 6. La presencia del complemento en el suero no está determinada por la acción de agentes inmunizantes, se le ha encontrado en todos los animales, pero su concentración varía de una especie a otra, por edad, sexo y estado fisiológico. Durante la gestación y la lactancia el título del complemento en suero es muy bajo. En el recién nacido su concentración es la mitad que en el adulto y se iguala hasta los dos o tres meses de vida. Su función es la misma en todas las especies. El complemento se fija inespecíficamente a complejos de Ag-Ac, llevando a la lisis celular, evento que no ocurre en su ausencia.⁸

Y por último, el proceso inespecífico por excelencia: la inflamación. Incluye los cambios tisulares que se producen en respuesta a una agresión. Cuando existe lesión (física, química, bacteriana o de cualquier tipo), las células afectadas liberan sustancias (histamina principalmente) que pasa a los líquidos vecinos, con las siguientes consecuencias:

1. Cambios vasculares.- cambios en la permeabilidad vascular, aumento del riego capilar en la zona lesionada.
2. Respuesta de neutrófilos.- arribo de células de defensa por "atracción" al sitio de lesión.
3. Estimulación de leucocitos.- durante una agresión, los tejidos liberan una globulina denominada *factor de estimulación de leucocitos*.

4. Activación del sistema mononuclear fagocítico.- entran en funciones monocitos, macrófagos y linfocitos para defender al organismo de agresiones. Estas células constituyen la primera línea de defensa.²⁰

A grandes rasgos, estos son los acontecimientos en la respuesta inflamatoria; aunque la respuesta genera una cascada de eventos, no necesariamente suceden en este orden.

MECANISMOS ESPECÍFICOS

Los mecanismos de inmunidad específicos se valen de elementos celulares y moléculas de naturaleza proteica, principalmente, para llevar a cabo la respuesta inmunológica. Existen dos líneas celulares: una mieloide y otra linfoide, que son responsables de los mecanismos de defensa del organismo.

La línea mieloide lleva la formación de macrófagos, células NK (por sus siglas en inglés, *natural killer*) y neutrófilos polimorfonucleares. Elementos que participan en la respuesta inmune de tipo inespecífico. La segunda, es la línea linfoide que da lugar a linfocitos T (dependientes del Timo), y B (dependientes de la médula ósea).²

LINFOCITOS T

- Inmunidad celular
- Funciones: coadyuvantes, citotóxicas y supresoras
- Reconocen antígeno

LINFOCITOS B

- Inmunidad humoral
- Formadores de anticuerpos (Inmunoglobulinas)
- Células de memoria

RESPUESTA INMUNE CELULAR

Linfocitos T (células T)

Se originan en la médula ósea, pero desarrollan sus características específicas por un proceso de maduración en el timo. Circulan por la sangre y los tejidos del organismo, además pueblan zonas específicas de órganos linfoides especializados.

Se dividen en tres subpoblaciones funcionales básicas:

- **Linfocitos T cooperadores o *helper* (Th).** Las células Th secretan linfocinas y, por tanto, ayudan a otros linfocitos a desempeñar sus funciones efectoras. Su participación es necesaria para estimular a los linfocitos B con el fin de que produzcan anticuerpos, así como activar los sistemas de defensa dependientes de los macrófagos. El principal marcador utilizado para identificar los linfocitos Th es la molécula CD4.
- **Linfocitos T citotóxicos (Tc).** Las células Tc destruyen las células infectadas por virus y las células malignas. Para activarse y llevar a cabo sus funciones citotóxicas deben interactuar con los linfocitos Th, que modulan la respuesta inmunitaria. Las células Tc expresan el marcador de superficie CD8.
- **Linfocitos T supresores (Ts).** Las células Ts inhiben la respuesta de los linfocitos Th y, por tanto, modulan la respuesta inmunitaria. Dado que los linfocitos Ts también expresan el marcador CD8, las células Tc y Ts suelen agruparse en una sola subpoblación de linfocitos T: supresores/citotóxicos (Ts/Tc).

Los linfocitos T que han sido estimulados para proliferar en el contexto de una respuesta inmunitaria son de mayor tamaño que las células inactivas y contienen una cantidad moderada de citoplasma basófilo. Su núcleo es grande y tiene un aspecto tortuoso (que contrasta con el de los linfocitos B) con la cromatina dispuesta según un patrón vesicular abierto y un nucléolo visible, lo cual refleja la transcripción genética activa.

Los linfocitos T que secretan linfocinas (ante estimulación antigénica) presentan un citoplasma basófilo debido a que contienen gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso y un núcleo grande con un contorno irregular.⁹

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Linfocitos B (células B)

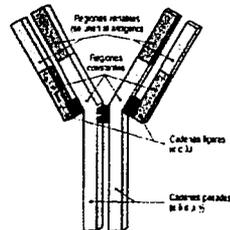
Las células B se originan a partir de precursores que se encuentran en la médula ósea. Circulan por la sangre y los tejidos del organismo y también se localizan en órganos linfoides especializados. Cuando son estimulados por el antígeno adecuado, se transforman en células plasmáticas, que son las células que secretan las Inmunoglobulinas específicas, esto es, anticuerpos (Fig.1).

Las células B, las células plasmáticas y los anticuerpos de la sangre y de los líquidos corporales son los elementos básicos de la respuesta humoral. Durante la fase en que se denominan células B de línea germinal, poseen genes comunes que codifican la producción de inmunoglobulinas. Durante el proceso de maduración, estos genes sufren un reordenamiento cuya finalidad es que las células adquieran la capacidad de producir moléculas de inmunoglobulina únicas que puedan interactuar específicamente con los antígenos. Así se genera la diversidad de la respuesta inmunitaria humoral. Se cree que las células capaces de producir una inmunoglobulina que reconozca un antígeno normal del organismo (auto-antígeno) son eliminadas durante el desarrollo.⁹

Fig. 1. Anticuerpo

Tomada del Libro *Atlas de Histología*, Stevens

Las células B se caracterizan por su capacidad para sintetizar anticuerpos, que son glucoproteínas diseñadas para unirse a antígenos específicos. A los anticuerpos también se los denomina inmunoglobulinas. Existen cinco clases estructurales diferentes de Inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgD, IgM e IgE. Un anticuerpo tiene dos componentes principales, las cadenas ligeras Inmunoglobulínicas, que pueden ser del tipo κ o λ y las cadenas pesadas Inmunoglobulínicas, que pueden ser del tipo α , γ , δ , μ o ϵ . Las cadenas pesadas y ligeras contienen regiones altamente variables, que constituyen la zona de unión con el antígeno y regiones constantes, que forman la parte principal de la molécula. Los anticuerpos pueden circular por la sangre, los líquidos corporales o permanecer unidos a la superficie de los linfocitos B, donde se comportan como receptores antagénicos activando la célula B cuando entran en contacto con el antígeno apropiado.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los linfocitos B que participan en la respuesta inmunitaria sufren un proceso de maduración por el que pasan de ser pequeñas células inactivas a convertirse en grandes células secretoras de inmunoglobulinas. Por esta razón, su aspecto citológico depende de su nivel de actividad.

Tras originarse en la médula ósea, las células B desarrollan sus características específicas por un proceso de maduración en algún punto de los tejidos periféricos que, en el hombre, todavía no se ha conseguido determinar con exactitud. En las aves, este proceso se lleva a cabo en una estructura denominada *bursa* de Fabricio, que es la que dio origen al término de células B (de *bursa* o bolsa).

Los linfocitos B inactivos son células pequeñas provistas de un citoplasma apenas discernible. El núcleo es redondeado con una cromatina compacta que refleja la ausencia de transcripción de ADN. Los linfocitos B que han sido estimulados para proliferar en el contexto de una respuesta inmunitaria son de mayor tamaño que los linfocitos B inactivos y contienen una moderada cantidad de citoplasma basófilo. El núcleo es grande, con cromatina vesicular y se puede observar el nucléolo, todo lo cual refleja una transcripción génica activa.

Las células plasmáticas son células B secretoras de anticuerpos y, por tanto, sus características citológicas reflejan su actividad como células secretoras de proteínas. Así, su citoplasma es levemente basófilo, debido a que contiene gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso y cerca del núcleo se observa una región clara que corresponde al aparato de Golgi. El núcleo presenta una cromatina estructurada según un patrón que se ha comparado con la esfera de un reloj (o rueda de carro) excéntrico con un nucléolo grande ubicado en posición central.¹¹

ADYUVANTES

Aparte de las variaciones intrínsecas de la respuesta inmune dependientes del organismo inmunizado y del antígeno, esta respuesta también puede ser modificada con tratamientos específicos. Algunos de estos tratamientos aumentan la respuesta inmune.

Los adyuvantes (del latín *adjuvare*, ayudar), son agentes empleados para potenciar la respuesta inmune. Aunque en general se considera que la “ayuda” sólo ocurre en términos de respuesta de inmunoglobulinas, está comprobado que algunos adyuvantes también estimulan la actividad de linfocitos T (inmunidad celular).^{5, 12}

La palabra “adyuvante” es muy usada en medicina y biología, pero se emplea comúnmente para referirse a compuestos que actúan de manera no específica, aumentando la respuesta inmune a un antígeno. Una serie de experimentos en 1925 hechos por Gastón Ramon fueron los primeros en indicar que compuestos adicionados a la fórmula de una vacuna producían una exitosa respuesta biológica. Ramon encontró que estas sustancias iban desde sales metálicas, aceites y tapioca hasta bacterias piógenas; dichas sustancias incrementaban la respuesta contra las toxinas del tétanos y la difteria. Este sencillo experimento dio pauta al estudio de adyuvantes en vacunas.¹¹

Por razones prácticas y de economía la inmunización profiláctica debería involucrar la mínima cantidad de inyecciones y la menor cantidad de antígeno posible, por lo que los adyuvantes surgen como opciones viables de tratamiento.

El mecanismo de acción de estas sustancias ha sido objeto de numerosos estudios y al parecer, existen diversos factores que explican su modo de acción. El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación y una de sus funciones importantes es crear un reservorio o depósito del antígeno de larga vida. Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos; estos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y por la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos. Por otro lado, algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar

específicamente sobre los linfocitos; pero en general, éstos funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias antigénicas (contenidas en la fórmula del mismo adyuvante).⁹

Los adyuvantes pueden entonces considerarse según su mecanismo de acción:

- Efecto de depósito ("*depot*"). Por lo general, el antígeno se dispersa rápidamente del sitio de la inyección; el objetivo de los adyuvantes de este tipo es contrarrestar este efecto mediante la provisión de un reservorio de vida prolongada del antígeno, ya sea extracelular o en el interior de un macrófago.
- Activación de macrófagos. Bajo la influencia de los adyuvantes de reposición, los macrófagos forman granulomas que proporcionan sitios de interacción de células formadoras de anticuerpos.
- Efectos sobre linfocitos. En ratones el aluminio tiende a estimular los linfocitos Th2, mientras que el adyuvante completo de Freund favorece el subtipo Th1.
- Acción antitumoral. Este efecto es mediado por acciones citotóxicas y citostáticas de macrófagos activados sobre tumores.¹⁰

Los adyuvantes se añaden a las vacunas con el fin de prolongar o de intensificar la respuesta inmunitaria del organismo frente al antígeno específico. A diferencia de lo que ocurre con las vacunas conjugadas, estos adyuvantes no forman uniones estables con las moléculas antigénicas. De este modo la producción de anticuerpos o las reacciones de inmunidad celular son más energéticas de lo que serían si se inyectara el antígeno sin adyuvante.¹⁴

El mecanismo de acción de los diferentes adyuvantes varía mucho, dependiendo del tipo utilizado. El más común es el efecto "depot", propio de las sales de aluminio, que consiste en retener el antígeno en el lugar de inoculación durante el mayor tiempo posible, evitando su desaparición en la circulación sanguínea, y en permitir una reacción inflamatoria local que facilite la llegada a esa área de células presentadoras del antígeno y macrófagos. Hay adyuvantes, como los liposomas, que activan la función de las células

presentadoras y otros como las saponinas, que incrementan la liberación de determinadas citocinas.

Algunas sustancias adyuvantes estimulan la respuesta inmune aún cuando no sean administradas en el mismo momento o junto con el antígeno, son llamados adyuvantes de acción central. Probablemente tienen un efecto estimulante directo sobre las células del sistema mononuclear fagocitario.¹⁴

La mayoría de los adyuvantes históricamente empleados, como las sales de aluminio, estimulan de forma muy preferente la respuesta linfocitaria de tipo Th2, incrementando la producción de anticuerpos. Por esta razón, se ha valorado la posibilidad de que las vacunas alteren el equilibrio Th1/Th2 en el organismo infantil. Sin embargo, también hay otras, como la vacuna de la BCG y los adyuvantes que incorporan compuestos oleosos, que estimulan la respuesta Th1. La elección del adyuvante de una vacuna deberá sopesarse cuidadosamente en el futuro y no sólo en función de la cantidad de respuesta, sino de dirigirla cualitativamente.

En estos momentos se están haciendo ensayos con vacunas que llevan añadidas interleucinas, con el fin de activar el tipo de respuesta inmunitario más deseable, aunque, debido al elevado costo, las perspectivas parecen estar más indicadas en otras formas de inmunoterapia.¹⁵

Adyuvante Completo de Freund

Uno de los adyuvantes más conocidos es el adyuvante completo de Freund (FCA, por sus siglas en inglés). El FCA es una emulsión que contiene aceite mineral, lanolina y bacilos tuberculosos muertos. Una inyección subcutánea o intramuscular de esta mezcla provoca una reacción local inflamatoria y granulomatosa. El FCA tiene tanta potencia como inmunoestimulante que, en algunos casos, puede facilitar la aparición de reacciones autoinmunitarias.

El uso de emulsiones comienza alrededor de 1930 con los experimentos de Freund, quien mezcló aceite de parafina con una solución de micobacterias muertas. Sin

embargo resultaba muy tóxico para ser empleado en humanos, pues inducía abscesos estériles y en algunos casos resultaba carcinogénico en ratones. La emulsión sin la bacteria, es llamada adyuvante incompleto de Freund, la cual es menos tóxica y anteriormente se empleaba en vacunas contra la influenza y poliomielitis.¹³

Después del uso exitoso del FCA en animales de laboratorio y de comprobar los inconvenientes que tendría su administración en humanos, se han realizado numerosos estudios con la intención de identificar y purificar el o los componentes de la emulsión que son los responsables del efecto adyuvante. De este modo se ha tratado de hacer más simple su preparación y de evitar la formación del granuloma. Los resultados no han sido completamente satisfactorios, pero de todas formas se han obtenido varios componentes de la bacteria que tienen una actividad adyuvante, sin la toxicidad del FCA.¹⁴

Hasta ahora, sólo se han logrado producir varios adyuvantes que están formados por pequeñas porciones de la pared celular del *Mycobacterium bovis*. Estos componentes de la pared celular también han sido encontrados en otros microorganismos como *Nocardia*, *Bordetella*, etc. Uno de los más conocidos es el muramil dipéptido (MDP) que ya ha sido sintetizado en el laboratorio y ha servido de modelo para producir análogos sintéticos. Casi todos ellos tienen la propiedad de estimular la inmunogenicidad de los antígenos y/o la intensidad de la respuesta inmunológica contra los determinantes de los mismos.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la estimulación de la respuesta inmunitaria de un paciente inmunocomprometido que, por ejemplo, padece cáncer, solamente provoca la mejoría de su inmunocompetencia con la consiguiente reducción en la incidencia de algunas complicaciones y no necesariamente la curación de la enfermedad primaria.

El bacilo de Calmette Guérin (BCG), es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* que también puede actuar como adyuvante. Tiene la capacidad de estimular a los macrófagos y ha sido utilizado en pacientes con diferentes tipos de neoplasias. El *Corynebacterium parvum* es otra cepa que ha sido utilizada como adyuvante porque

aumenta la resistencia a los tumores en ciertas cepas de ratones, probablemente porque también estimula los macrófagos y aumentan la actividad de las células NK.¹⁶

Hidróxido de Aluminio y Magnesio

A principios del siglo pasado se observó que diferentes sales unidas al material antigénico, inducían un aumento de la producción de anticuerpos y de la memoria de la respuesta inmune en animales que eran vacunados con esas mezclas. Estas sales actúan fundamentalmente favoreciendo la presentación de los antígenos al sistema inmune, mediante el secuestro del antígeno y su posterior liberación de manera lenta y prolongada, así como produciendo una ligera inflamación que activa la atracción de las células presentadoras y por tanto favoreciendo la quimiotaxis.

El aluminio fue usado como adyuvante a principios de 1926 por Glenn. Los resultados positivos que obtuvo en sus estudios condujeron a su amplio uso en vacunas veterinarias y algún tiempo después en humanos. Hoy en día su uso continúa principalmente debido a su alto margen de seguridad.¹³

A lo largo de la historia de las vacunas, y desde el adyuvante de Freund, son muchos los preparados que se han ensayado como adyuvantes con más o menos éxito. El más utilizado es el aluminio,^{*} en sales de hidróxido o de fosfato. Otros adyuvantes consisten en componentes bacterianos como: endotoxinas, partículas como liposomas, emulsiones oleosas y otras moléculas.

El hidróxido de aluminio es empleado preferentemente como adyuvante en vacunas (virales) del ramo veterinario (aves, equinos, etc.), aunque existen igualmente vacunas que incorporan el hidróxido de aluminio en su fórmula y se administran a niños (mayores de 2 años) y a adultos, como por ejemplo, vacunas contra la hepatitis A, tétanos y difteria; en donde el antígeno se absorbe completamente en el hidróxido de

* El aluminio es de los metales más abundantes de la Tierra., constituye aproximadamente el 8% de su corteza. Es el tercer elemento que existe en mayor cantidad, sólo superado por el silicio y el oxígeno. Los grandes yacimientos de bauxita rica en aluminio se encuentran en Venezuela y Canadá.

aluminio, que se utiliza como adyuvante y como adsorbente específico del antígeno de hepatitis A (en este caso particular).¹⁷

Por su parte el hidróxido de magnesio es frecuentemente empleado en combinación con el de aluminio.

El objetivo de realizar estudios comparativos es evaluar el efecto de los dos como adyuvantes, los que por razones prácticas y económicas constituirían buenos sustitutos del adyuvante de Freund.

El hierro como adyuvante

En el ámbito internacional, la lista de productos naturales y derivados de la síntesis química, con propiedades adyuvantes inmunopotenciadoras, es cada vez mayor, sin embargo, sólo un reducido número se utiliza en la formulación de vacunas veterinarias y humanas, existiendo una tendencia relacionada con la evaluación de nuevas sustancias con esta finalidad. En función del campo de aplicación y de la relación eficiencia/seguridad se pueden reconocer diferentes categorías de adyuvantes, como se muestra en la Tabla 1.¹²

Tabla 1. Relación entre aplicaciones de los adyuvantes y la relación eficiencia/seguridad

ADYUVANTE	LA EFICIENCIA ES	MÁS IMPORTANTE	LA SEGURIDAD ES	MÁS IMPORTANTE
	QUE LA	SEGURIDAD	QUE LA	EFICIENCIA
	ANIMALES DE	ANIMALES PARA	ANIMALES	HUMANOS
	LABORATORIO	ALIMENTACIÓN	DOMÉSTICOS	
FCA	+	-	-	-
Emulsiones aceite/agua	+	+	(-)	-
Emulsiones agua/aceite	+	+	-	-
Materiales inertes	+	(+)	(+)	-
Compuestos de Al	+	+	+	+
Liposomas	+	+	(+)	-
DDA	+	(+)	(+)	(-)
NBP	+	(+)	(+)	(-)

Legenda + aplicado de rutina en productos comerciales, (+): no aplicados, pero se considera aplicable en función de su seguridad,
 - no aplicado y considerado no aplicable por problemas de seguridad, (-): no aplicado y considerado no aplicable, excepto para fines
 muy específicos

Con esto, se advierte que el aluminio es el único de los adyuvantes inmunológicos con uso en todos los rubros, ya sea en aplicaciones animales o en productos de uso humano; a pesar de ello, su cualidad potenciadora se encuentra por debajo de las expectativas actualmente requeridas para ser un producto de elección.

Entre los distintos elementos, uno que puede, potencialmente, funcionar como adyuvante es el hierro, ya que presenta propiedades físicas y químicas que lo harían apto para este uso.

Es probable que el descubrimiento del hierro se hiciera por el calentamiento fortuito de rocas que eran meteoritos de ferroniquel. Hay pruebas de que hoces empleadas en Egipto eran de hierro, hace casi cinco mil años. Anteriormente el hierro era muy valioso para ser usado ampliamente, en el mismo Egipto se utilizó en joyería y armaduras. Actualmente se obtiene de grandes yacimientos minerales: los *hematites*, que contienen Fe_2O_3 , y la *magnetita negra*, que contiene Fe_3O_4 ; ambos depósitos proveen el 52% de la extracción del hierro elemental.¹⁸

El hierro es un elemento de transición dentro de la tabla periódica, con símbolo Fe, número atómico de 26 y 55.847 uma; sus características físicas y químicas se presentan en la tabla 2.¹⁹

Tabla 2. Tomada del Libro *Química*, Seese W.

	Color	Densidad (g/mL, 20°C)	Calor cal/g °C	Específico J (kg.k)	Punto de Fusión(°C)	Punto de Ebullición	
Hierro	Cris blanquecino	7.874	0.108	4052x10 ²	1 535	3 000	Se oxida, reacciona con el O ₂ para formar óxido de hierro (III) u óxido férrico
FÍSICA							QUÍMICA

El hierro dentro del cuerpo se encuentra en íntima relación con los eritrocitos, en específico formando el complejo llamado hemoglobina. Como el hierro es muy importante para la formación de hemoglobina, mioglobina y otras sustancias como citocromos, oxidasa del citocromo, peroxidasa y catalasa, es relevante comprender los medios por los cuales el hierro es utilizado en la economía corporal.

La cantidad total de hierro en el cuerpo es de 4 g. Aproximadamente el 65% de este hierro se encuentra formando hemoglobina. Alrededor del 4%, se encuentra en forma de mioglobina; mientras que el 1% en forma de diversas enzimas (heme) que controlan la oxidación intracelular; el 0.1% en forma de transferrina en el plasma sanguíneo. Del 15 al 30% aproximadamente, se almacena en forma de ferritina (*hierro de depósito*).²⁰

Cuando el hierro es absorbido por el intestino delgado se combina inmediatamente con una β -globulina para formar la transferrina, la cual es transportada por la sangre. El hierro de este compuesto está unido de forma laxa con la globulina, de modo que puede ser liberado en cualquier parte de organismo. El exceso de hierro es depositado en cualquier célula, pero principalmente en el hígado, donde se almacena alrededor del 60% de este exceso. Es aquí donde el hierro se combina con una proteína llamada *apoferritina* para formar ferritina. Cuando la cantidad de hierro en el cuerpo es mayor que la que se puede acomodar en el depósito de apoferritina, parte del mismo se acumula en forma menos soluble, la *hemosiderina*. (Fig.2).

Se eliminan diariamente unos 0.6 mg de hierro, principalmente por las heces. Se pierden cantidades de hierro adicionales siempre que ocurren hemorragias, después de un trauma por ejemplo. Así, la mujer lleva una pérdida promedio de 2.1 mg de hierro al día durante su periodo menstrual.²⁰

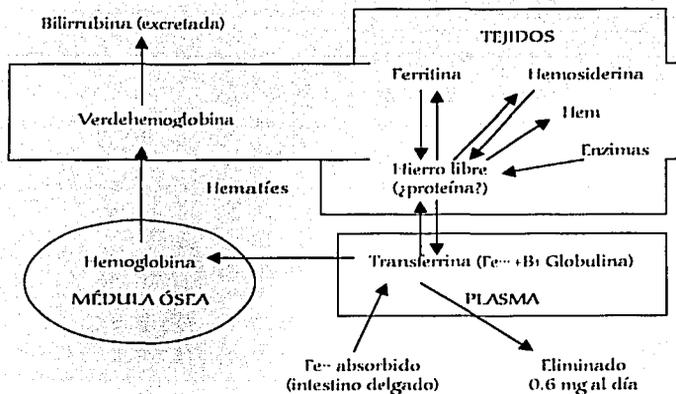


Fig. 2. Transporte y Metabolismo del Hierro
Tomada del Libro *Tratado de Fisiología Médica*, Guyton A.

Cuando el cuerpo está saturado de hierro, de manera que la apoferritina en zonas de reserva está combinada totalmente, la intensidad de absorción por el tubo digestivo disminuye considerablemente. Mientras que en caso contrario, la absorción intestinal se ve aumentada hasta 20 veces o más. Así pues, el hierro corporal está regulado básicamente por alteraciones en la intensidad de absorción.²⁰

Después de la administración intramuscular, el hierro se absorbe del sitio primario a través del sistema linfático, esta absorción se realiza en 2 fases, la primera que dura aproximadamente 3 días y es apoyada por la inflamación local; la segunda fase que es más lenta y consiste en la ingestión de partículas por los macrófagos que la envían al sistema linfático y de ahí nuevamente al torrente circulatorio, esta última fase puede durar semanas y hasta meses en completarse. Después de una administración intramuscular o intravenosa, el hierro se elimina gradualmente del plasma por el sistema mononuclear fagocitario en bazo, hígado y médula ósea.

En dosis de 500 mg o menos, las concentraciones del hierro plasmático disminuyen exponencialmente, teniendo una vida media de 6 horas. Algunas trazas de hierro no metabolizado se excretan por orina, bilis, heces.²¹

GELES

El término *gelatina* (sustancia transparente que se obtiene hirviendo tejido conjuntivo, piel y huesos de animales...) se deriva del italiano *gelatina* (caldo espeso), a su vez diminutivo de *gelata* (helada), del latín *gelare*, del indoeuropeo *gel-a* (helar), de *gel* (frio).²²

Un gel es un sólido elástico que envuelve y atrapa agua en una red tridimensional, la cual se forma por las mismas partículas en suspensión.

Son formas farmacéuticas de consistencia especial, que van desde fluida hasta semirrígida, con las características de buena adhesividad a piel y membranas y ausencia de grasas. Por ser miscibles con agua son fáciles de remover, muy bien toleradas y por lo general transparentes ó traslúcidas. Los geles medicamentosos son llamados también jaleas.²³

Como agentes de gelificación se usaban gomas como la arábica y la de tragacanto, metilcelulosa, polietilenglicoles y mezclas glicerogelatinadas. En tiempos más recientes, éstos ingredientes han sido desplazados en la elaboración de geles por otros mucho más prácticos y compatibles, los cuales se obtienen por síntesis y son polímeros de alto peso molecular. Los dos comúnmente usados son las marcas registradas Carbopol® y Natrosol®. Los geles preparados con Carbopol® son transparentes y según la concentración empleada se pueden obtener geles fluidos o bien semisólidos. Debido a que la base de Carbopol® debe ser estabilizada con trietanolamina, no es compatible con principios activos ácidos.

Los geles elaborados con Natrosol® son traslúcidos, de distinta consistencia y propiedades de flujo, dependiendo de la proporción utilizada. La de base gel obtenida con

Natrosol® es compatible con gran cantidad de principios activos tanto de naturaleza ácida como de naturaleza alcalina.²⁴

Las resinas Carbopol® son homopolímeros y copolímeros reticulados del ácido acrílico de alto peso molecular.

Las principales características funcionales de los polímeros Carbopol® son:

- Espesante.
- Suspensión.
- Modificación de fluidez.
- Estabilidad del producto.
- Emulsificación.²⁵

Otro agente gelificante de uso relativamente generalizado y de empleo en estudios de investigación es el Carbomer,²⁶ cuya estructura química (Fig. 3) es muy semejante a la del Carbopol®. **

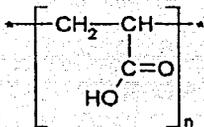


Fig. 3. Estructura química del Carbomer (polímero de ácido acrílico entrecruzado con alicil éteres de pentaeritritol y alicil éteres de sucrosa).²³

** La estructura química del Carbopol no se muestra por ser este un producto de uso comercial protegido por una Marca Registrada.

El Carbomer y el Carbopol® comparten propiedades importantes como agentes espesantes y gelificantes, además de actuar como estabilizadores de emulsiones y suspensiones. Se trata de sustancias muy hidrofílicas, solubles en agua, alcohol y disolventes polares.

Sus propiedades como espesantes son eficaces en un rango de pH que va desde cinco a diez.²³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta inmune es potenciada cuando un antígeno es inoculado simultáneamente con un adyuvante. El adyuvante más empleado es el de Freund pero es sabido que este produce con frecuencia abscesos estériles y tumores en ratones,¹⁸ de manera que se hace necesario reemplazar este adyuvante con otros que no se almacenen en los tejidos del animal de experimentación, pero que al mismo tiempo posean características muy similares al adyuvante completo de Freund, es decir, que permitan el efecto que potencialice la respuesta inmune pero sin riesgo de complicaciones.

JUSTIFICACIÓN

Con la propuesta de un adyuvante compuesto (gel de Fe) y haciendo la comparación entre diferentes adyuvantes, en este caso particular, frente al adyuvante completo de Freund y una suspensión de hidróxido de aluminio y magnesio; se puede establecer una relación costo-beneficio en el empleo de estos reactivos. Dando la posibilidad de optar por el medio que mejor se ajuste a las propias cuestiones técnicas y de economía del estudio por llevar a cabo.

Con base en lo anteriormente expuesto y lo que de la literatura se rescata, se observa que no existen estudios que aprueben o descarten al hierro como adyuvante inmunológico, ya que el grueso de la investigación ubica al hierro como principio terapéutico en estudios sobre trastornos metabólicos y anemias, y no en el campo de la inmunología.

Por otra parte, el hecho de elegir un vehículo como el gel no es fortuito de ninguna forma. El gel representa un factor importante, no sólo como vehículo para el hierro administrado, sino como determinante en el mantenimiento de niveles del mismo; así también, el propio gel posee características que lo convertirían en un buen inmunógeno *per se*.

La relevancia de llevar a cabo este estudio radica en la posibilidad de abrir una nueva línea de investigación sobre adyuvantes inmunológicos. Proponiendo como factor central al hierro (sin dejar de lado el papel del gel). Enfatizando lo poco explorado que se encuentra el hierro en el campo de la inmunología, concretamente como adyuvante.

HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

El gel mantendrá atrapado al Fe, disminuyendo la velocidad de difusión y manteniéndolo en el sitio de la inoculación, pero sin generar en los tejidos una reacción crónica que derive en un granuloma o absceso.

HIPÓTESIS NULA

El complejo gel-Fe dextrano es capaz de promover una reacción irritativa en los tejidos adyacentes al sitio de inoculación, favoreciendo el desarrollo de una lesión granulomatosa.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir y comparar cualitativamente las alteraciones celulares y la reacción tisular local ulterior a la inoculación con tres adyuvantes Inmunológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el grado y tipo de respuesta inflamatoria presente con cada uno de los adyuvantes.

Estimar el alcance de la respuesta local en términos cualitativos con cada uno de los adyuvantes.

Determinar la reacción local específica que provoca el gel de Fe dextrano.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se emplearon 20 ratas cepa Wistar SPF donadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, con las características que se enumeran a continuación:

- Ratas hembras.- se optó por seleccionar animales de un mismo sexo para evitar su reproducción durante el tiempo que duraría el estudio.
- Cepa Wistar.- la selección de la cepa fue debido a que sus características se adaptaban al tipo de estudio.
- Peso.- 300 gr (+ - 10).
- Edad.- mayores a 6 semanas de nacimiento.

METODOLOGÍA

1. Preparación de adyuvantes

Adyuvante Completo de Freund ^{2,4, 27,28}

Bayol F o vaselina líquida de alto grado de pureza	90 ml
Arlacel A purificado	10 ml
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> muertos por calor	100 mg

Mezclar el Bayol F y el Arlacel en caliente. En un mortero colocar los bacilos tuberculosos e incorporarlos a la mezcla oleosa mediante el añadido de pequeñas cantidades de ésta en forma sucesiva hasta completar el volumen total. Repartir en ampollas de 2 ml, 5 ml y 10 ml; esterilizar en autoclave a 115°C durante 30 minutos.

Cuando se emplee el adyuvante completo de Freund, debe manejarse con precaución, debido a que es potencialmente dañino. Hay que tener cuidado durante su preparación y en el momento de la inyección. Si se prepara sin bacilos de Koch se lo denomina adyuvante Incompleto de Freund. ²⁹

Hidróxido de aluminio y magnesio en suspensión ³⁰

Se empleó un producto comercial (Gelan[™])

Composición: Gel de Al(OH)₃

Gel de Mg(OH)₂

Vehículo cbp

Hierro Dextrano incluido en gel ⁴⁰

Trietanolamina

Carbopol® 940

Agua desionizada

Hierro dextrano

Se hace pasar el Carbopol® por un colador de maya fina, para eliminar las partículas demasiado grandes y que dificulten que la mezcla resulte más homogénea. En un recipiente de cristal se coloca el Carbopol® "colado", se le adiciona el agua poco a poco hasta conseguir una mezcla clara sin grumos o partículas sin disolver. A continuación se vierte la trietanolamina, igualmente hasta lograr su incorporación. Se añade el hierro dextrano hasta homogeneizar totalmente.

Al no contener conservadores, se recomienda que la preparación sea lo más cercana a la fecha de empleo.

2. Trabajo Experimental

El acondicionamiento de los animales de experimentación fue el normal, es decir, el propio del Bioterio de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología.

⁴⁰ El gel de Fe dextrano es una preparación experimental propuesta por el autor de este trabajo, basada en la técnica empleada en cosmética para la elaboración de geles.

La fase experimental del estudio se diseñó en cuatro etapas (durante un mes). El segundo día de la primera semana se inoculó (por vías IM y SC) a todos los animales empleando un lisado bacteriano (antígeno) junto con el adyuvante seleccionado para cada grupo y la solución salina para el control; no fue necesaria la anestesia previa. Las posteriores inoculaciones solo se hicieron por vía IM (región inguinal). ***

Se formaron cuatro grupos, cada uno con 5 animales de experimentación, los cuales fueron seleccionados de manera aleatoria:

- Al grupo control se le administró el placebo, que consistió en solución salina (5 %).
- En el segundo grupo se administró el adyuvante completo de Freund (FCA).
- El tercer grupo se inoculó con hidróxido de aluminio y magnesio en suspensión.
- El gel de hierro dextrano se administró en el último grupo experimental.

No hubo restricción en cuanto a la cantidad y frecuencia en que se alimentaron los animales, así como tampoco al consumo de agua (*ad libitum*).

El tiempo entre la primera inoculación, el refuerzo y el sacrificio se estableció en el cronograma interno del trabajo experimental.

Se realizaron observaciones clínicas periódicas de las reacciones locales (sitio de la inyección) de los animales durante el tiempo que duró el estudio, tomando fotos y haciendo anotaciones.

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de cloroformo a las 72 hrs, 7, 14 y 21 días según el cronograma del trabajo experimental (Tabla 3).

*** La inyección intraperitoneal es el método comúnmente empleado para inoculación de antígenos en un animal de experimentación (ratones, ratas), sin embargo, el antígeno no debe ser colocado directamente en el torrente sanguíneo. La vía intramuscular (IM) es otra buena opción.

Tabla 3. Cronograma del Trabajo Experimental

Grupo	Semana 1					Semana 2					Semana 3					Semana 4				
	l	m	m	j	v	l	m	m	j	v	l	m	m	j	v	l	m	m	j	v
1. Control																				
Animal 1		X			S															
Animal 2		X			S															
Animal 3		X					S													
Animal 4		X					X					S								
Animal 5		X					X										S			
2. Experimental																				
Animal 1		X			S															
Animal 2		X			S															
Animal 3		X					S													
Animal 4		X					X					S								
Animal 5		X					X										S			
3. Experimental																				
Animal 1		X			S															
Animal 2		X			S															
Animal 3		X					S													
Animal 4		X					X					S								
Animal 5		X					X										S			
4. Experimental																				
Animal 1		X			S															
Animal 2		X			S															
Animal 3		X					S													
Animal 4		X					X					S								
Animal 5		X					X										S			
Total de animales																				

X= inoculación
S= sacrificio y biopsia

FESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Se tomaron biopsias de las zonas donde se aplicaron los adyuvantes y se colocaron en solución fijadora de formol al 10% por un tiempo mínimo de 24 horas. Posteriormente se llevaron al laboratorio de Patología donde se prepararon los especímenes para su estudio histológico.

3. Procesamiento de los especímenes

Se lavan los especímenes por tres horas con agua corriente a fin de eliminar la solución fijadora (formalina al 10%).

Para su deshidratación e inclusión en parafina se empleó el Histokinette cuyo proceso consiste en los siguientes pasos programados automáticamente:

- Deshidratación de los tejidos en alcohol (CH:CH:OH), pasando primero por alcohol de 60°, continuando por alcohol de 70°, 80°, 96°, nuevamente en alcohol de 96°(dos veces), 100° (dos veces).
- Se pasan los tejidos nuevamente por alcohol y xilol, para continuar con xilol (primera vez) y xilol (segunda vez). El tiempo aproximado que los tejidos están en cada uno de los pasos anteriores es de 1 hora 15 minutos.
- Prosigue el paso de los tejidos por parafina (primera vez) por 2 horas y 45 minutos; otro paso por parafina (segunda vez) por 2 horas.
- El tiempo total del proceso es de 17 horas aproximadamente.

La siguiente etapa es la orientación e inclusión en parafina de uso histológico.

- La parafina debe estar a una temperatura de fusión de entre los 56° y 58°C, para poder incluir los tejidos.
- Una vez incluidos los tejidos en parafina se procede a realizar los cortes en el Microtomo. Se pasan los cortes a la tina de flotación donde estarán de 3 a 5 minutos a una temperatura menor a la del punto de fusión de la parafina, para continuar hacia la plancha en donde permanecen entre 10 y 15 minutos a una temperatura mayor que la del punto de fusión de la parafina.

Se continúa con la técnica de tinción. Para ello se emplea el tren de tinción para H y E:

- Primero se procede a desparafinar los tejidos con agua corriente.
- Se tiñen los núcleos con Hematoxilina, y se lava con agua corriente.
- Virar en solución de Scott y se lava con agua corriente.
- Se contrasta con Eosina.
- Se deshidrata, aclara y monta.

4. Revisión microscópica

- Las laminillas fueron analizadas al microscopio óptico.
- Las observaciones anotadas y los resultados agrupados.
- El análisis es descriptivo y cualitativo.

MATERIAL

- 20 ratas cepa Wistar SPF
- Placebo (solución salina)
- Adyuvante completo de Freund (FCA)
- Gel de hidróxido de aluminio en suspensión [$\text{Al}(\text{OH})_3$]
- Gel de hidróxido de magnesio en suspensión [$\text{Mg}(\text{OH})_2$]
- Lisado bacteriano
- Hierro dextrano
- Trietanolamina
- Carbopol 940
- Agua desionizada
- Jeringas de insulina
- Jeringas de vidrio
- Vibrador
- Gasas
- Rasuradora
- Suero
- Etiquetas
- Guantes
- Cubrebocas
- Parafina para uso histológico
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hematoxilina y Eosina
- Microscopio
- Mango de bisturí y hojas #3
- Formalina (10%)

RESULTADOS

Los especímenes que se obtuvieron fueron de piel y tejido muscular.

PIEL

Los grupos experimentales mostraron los mismos hallazgos en comparación con el control en todas las etapas.

Clinicamente no hubo signos de tumefacción, enrojecimiento u otro dato que sugiriera alguna reacción de hipersensibilidad.

Al microscopio no se observó reacción ante la administración de los adyuvantes, (por lo que los resultados de este tejido sólo se encuentran en este apartado). Obsérvese la Fig. 4.

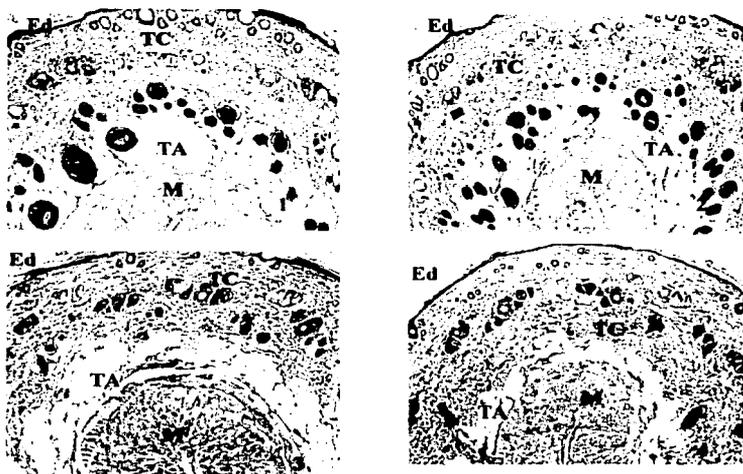


Fig. 4. Imagen a las 72 hrs. Objetivo de rastreo. Control (1), FCA (2), hidróxido de aluminio y magnesio (3) y gel de Fe (4). Los cambios no son representativos y/o significativos en piel. Únicamente se aprecia una ligera coloración parda en el grupo del gel de Fe (4).

Epidermis (Ed), tejido conectivo (TC), tejido adiposo (TA) y músculo (M).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÚSCULO

Reporte a 3 días

Clinicamente

No se apreciaron cambios clínicos sobre la superficie de la piel (inspección y palpación).

Durante la cirugía dirigida: el grupo experimental 2 (FCA) presentaba una reacción bien delimitada, severa sobre el músculo y penetrándolo (Fig.5). El grupo experimental 4 (gel de Fe dextrano) presentaba una ligera coloración parduzca alrededor de la zona donde se infiltró el adyuvante.

Al microscopio

En las primeras 72 horas, los grupos experimentales junto con el control mostraban una respuesta inflamatoria. La cual era más evidente en el grupo experimental donde se administró el FCA, presentando una respuesta inflamatoria mixta, con neutrófilos polimorfonucleares, con predominio de linfocitos y una importante presencia de macrófagos (Fig.5). En los grupos experimentales 3 y 4, la respuesta inflamatoria presente se describe como leve, de tipo mixta, con presencia difusa y leve de PMN y macrófagos, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Respuesta inflamatoria en tejido muscular a las 72 hrs.

GRUPO	Grado	Tipo	PMN	Linfocitos	Fibroblastos	Células Plas.	Macrófagos
Control (1)	+	A	+	+	o	o	o
FCA (2)	+++	M	++	+++	++	++	++
Al & Mg (3)	+	M	+	+	+	o	o
Fe (4)	+	M	+	+	+	+	+

o - Nulo
 + - Leve
 ++ - Moderado
 +++ - Severo

A - Aguda
 M - Mixta
 C - Crónica

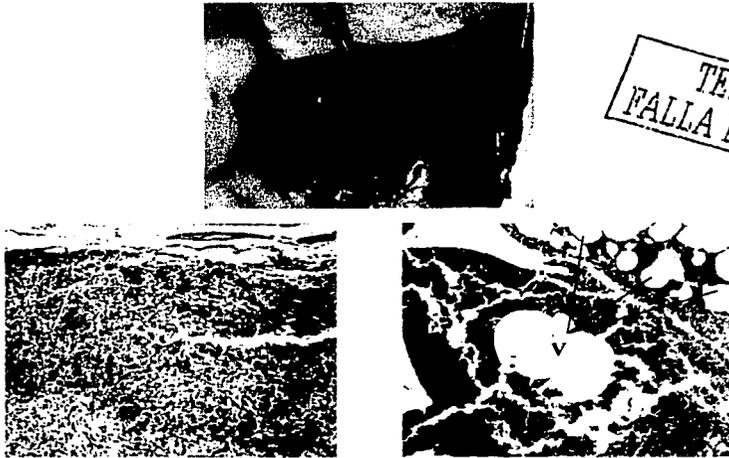


Fig. 5. Durante cirugía dirigida se aprecia la lesión sobre el músculo (1). Al MO se aprecia la importante respuesta celular que está sobre el músculo (2), un acercamiento 400x (3). Linfocitos (L), vacuolas formadas por el encapsulamiento del adyuvante por las células de defensa (V).

Reporte a 7 días

Clínicamente

La piel se encontraba normal a los 7 días (1 semana).

Durante la cirugía dirigida: la lesión que en un principio era claramente observada en el grupo experimental 2 a las 72 hrs. se encontró disminuida a la semana, aunque aún identificable fácilmente sobre la superficie muscular. La coloración existente en el grupo experimental 4 era más notoria en comparación con las 72 hrs. (Fig.6).

Ningún grupo presentó alteraciones visibles de estructuras anexas (vasos sanguíneos, tejido adiposo, etc.) cercanas al sitio de inoculación en el lapso de una semana.

Al microscopio

La reacción presente en el grupo experimental 2 continuaba siendo de carácter severo, de tipo mixto, con abundantes neutrófilos polimorfonucleares, linfocitos y

macrófagos. Por su parte, el grupo experimental 3 presentaba un aumento notable en la presencia de linfocitos, PMN y macrófagos, llegando a exhibir una reacción inflamatoria severa de tipo mixto, muy semejante a la del grupo experimental 2 a las primeras 72 horas (3 días). El grupo experimental 4 se mantenía sin cambios representativos en este lapso, reportando únicamente un aumento en la presencia de macrófagos (Tabla 5), que eran identificables fácilmente por el hierro fagocitado.

Tabla 5. Respuesta inflamatoria en tejido muscular a los 7 días (1 semana).

GRUPO	Grado	Tipo	PMN	Linfocitos	Fibroblastos	Células Plas.	Macrófagos
Control (1)	o	-	+	+	o	o	o
FCA (2)	+++	M	+++	+++	++	++	+++
Al & Mg (3)	++	M	++	+++	++	+	++
Fe (4)	+	M	+	+	+	+	++

o - Nulo
 + - Leve
 ++ - Moderado
 +++ - Severo

A - Aguda
 M - Mixta
 C - Crónica
 - - Nula

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

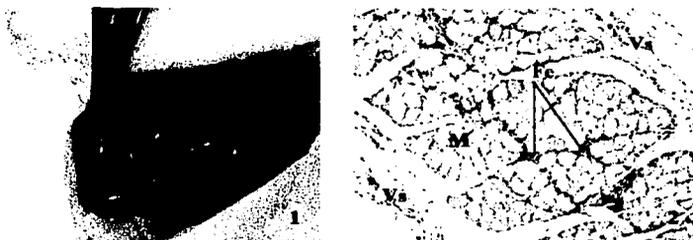


Fig. 6. En la cirugía dirigida: se aprecia el color parduzco a consecuencia del hierro (1). Vista al MO, nótese la disposición del hierro entre las fibras musculares (2). 100x.

Fibras de tejido muscular (M), secuestrados de hierro (Fe), vasos capilares recolectando el hierro (Vs).

Reporte a 14 días

Clinicamente

A las 2 semanas de tratamiento, no observamos lesión o alteración sobre piel.

Durante la cirugía dirigida: la lesión que el grupo experimental 2 había expresado en las primeras 72 hrs. era entonces apenas visible sobre la superficie muscular y mas bien se encontraba hacia el interior del músculo. En cambio, en el grupo experimental 3 se empezaba a gestar una lesión semejante a la del grupo experimental 2 (a las 72 hrs.) sobre la fascia, bien delimitada que emergía de las fibras musculares.

La pigmentación del grupo experimental 4 seguía presente.

Al microscopio

La presencia de macrófagos era severa en el grupo experimental 2, pero con una reacción ya moderada, aunque la presencia de PMN y linfocitos era considerable, el número elevado de fibroblastos era notorio en este periodo de tiempo.

En el grupo experimental 3 prevalecía una reacción aún severa, con importante presencia de macrófagos, así como de PMN y linfocitos (Fig.7). El grupo experimental 4 mostraba un ligero aumento en la actividad de linfocitos, manteniéndose los macrófagos y su actividad fagocítica sobre el hierro. En la Tabla 6 se muestran los resultados a los 14 días.

Tabla 6. Respuesta inflamatoria en tejido muscular a los 14 días.

GRUPO	Grado	Tipo	PMN	Linfocitos	Fibroblastos	Células Plas.	Macrófagos
Control (1)	o	-	o	o	o	o	o
FCA (2)	++	M	+++	+++	++	+	+++
Al & Mg (3)	+++	M	+++	+++	++	+	++
Fe (4)	+	M	+	++	+	+	++

o - Nulo
 + - Leve
 ++ - Moderado
 +++ - Severo

A - Aguda
 M - Mixta
 C - Crónica
 - - Nula

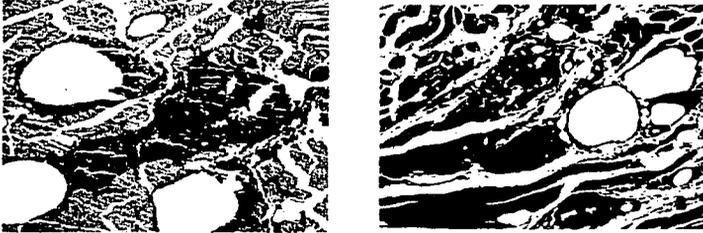


Fig. 7. Respuesta celular en tejido muscular a los 14 días. Nótese la semejanza en la reacción que presenta el grupo 2 (1), con respecto al grupo 3 (2). (100x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Reporte a 21 días

Clinicamente

No existió evidencia de lesión clínicamente detectable que sugiriera reacción de hipersensibilidad retardada a nivel de la piel y sus anexos.

Durante la cirugía dirigida: las lesiones presentes en los grupos experimentales 2 y 3 continuaban; en el grupo 2 era apenas visible, mientras que en el grupo experimental 3 estaba muy definida aunque con una tendencia decreciente con respecto a lo reportado a los 14 días. En el grupo experimental 4 no se encontraron alteraciones en tejido muscular más que de la coloración que daba la presencia del hierro. Sin embargo, la presencia de un ganglio era muy notoria, por su tamaño y por encontrarse igualmente pigmentado por el hierro.

Al microscopio

En general, hubo la tendencia a la disminución de actividad celular. Sin embargo, en el grupo experimental 2 la reacción viraba hacia crónica, al igual que la del grupo 3; presentando en ambos casos gran presencia de macrófagos, linfocitos y fibroblastos; pero con la marcada reacción expresada en el grupo experimental 3 que presentaba incluso algunas zonas de necrosis (Fig.8).

Para el grupo experimental 4, se mantuvo la presencia de macrófagos y de linfocitos; con un infiltrado discreto de células plasmáticas y fibroblastos (Tabla 7). Con respecto al ganglio encontrado, presentaba una gran proliferación de células linfoides con secuestros de hierro. Los macrófagos eran fácilmente identificables por el mismo hierro (Fig.9).

Tabla 7. Respuesta inflamatoria en tejido muscular a los 21 días.

GRUPO	Grado	Tipo	PMN	Linfocitos	Fibroblastos	Células Plas.	Macrófagos
Control (1)	o	-	o	o	o	o	o
FCA (2)	++	C	+++	+++	+++	++	+++
Al & Mg (3)	+++	C	+++	+++	+++	++	+++
Fe (4)	+	M	++	++	+	+	+++

o - Nulo
 + - Leve
 ++ - Moderado
 +++ - Severo

A - Aguda
 M - Mixta
 C - Crónica
 - - Nula

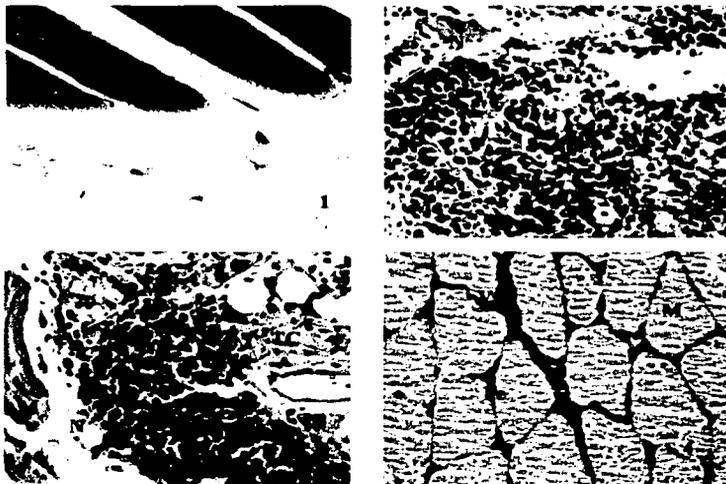


Fig. 8. Vistas microscópicas (400x) de tejido muscular a los 21 días. El estado del tejido en el grupo control (1). Nótese las zonas de necrosis que aparecen en los grupos 2 y 3. (2, 3) y la presencia del hierro entre las fibras musculares (4).

Fibras musculares (M), zonas de necrosis (N), tejido conectivo (TC), macrófagos (Mc), capilares (Vs), hierro (Fe).

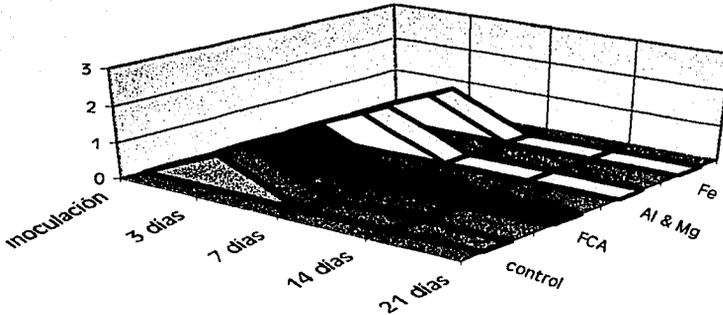


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 9. Fotomicrografías de un ganglio linfático (hallazgo durante la cirugía dirigida). Vista 100x (1) y a 400x. Donde se aprecia el hierro secuestrado por los macrófagos. Linfocitos (L), macrófagos (Mc).

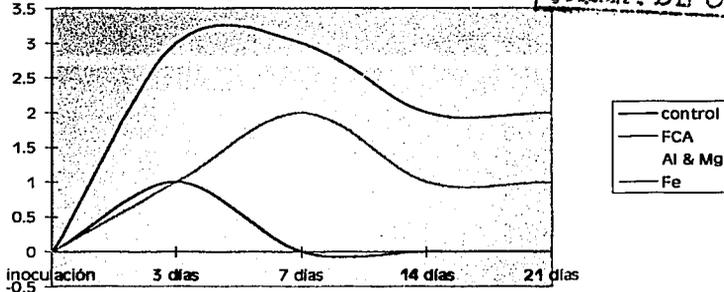
En las siguientes gráficas se observa la tendencia en el comportamiento de los diferentes adyuvantes en piel y tejido muscular a través del tiempo que duró el estudio.

Gráfica 1. Respuesta a nivel de piel



La gráfica muestra la reacción inflamatoria leve al tercer día (72 hrs.) por parte de todos los grupos; sin embargo, con tendencia a disminuir y desaparecer a partir de la primera semana.

Gráfica 2. Reacción a nivel de tejido muscular



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La tendencia del grupo control iba a la baja a partir del 3er. día; el grupo experimental 2 presentó una reacción importante en un periodo corto de tiempo (72 hrs.), que fue decreciendo, pero se mantuvo una reacción marcada. El grupo 3 exhibió una tendencia clara de aumento, llegando a mostrar una reacción semejante a la del grupo del FCA (a las 72 hrs.) a partir de los 14 días. El grupo del hierro presentó una respuesta de leve a moderada, con un pico a los 7 días y que fue disminuyendo.

DISCUSIÓN

La importancia del uso de adyuvantes inmunológicos podría ser puesta en tela de juicio por múltiples argumentos; por ejemplo, el hecho de administrar un antígeno del tipo o variante que sea (atenuado, muerto, fragmentado, etc.), debiera ser suficiente para provocar una reacción inmunológica competente y así cumplir la finalidad última de la respuesta inmune, preservar la integridad del individuo. A pesar de ello, no siempre coinciden las circunstancias para que esto llegue a buen término. Pensemos en pacientes inmunosuprimidos, comprometidos a nivel sistémico, inmaduros inmunológicamente, o en aquellos casos donde el alcance del sistema de defensa es insuficiente para eliminar la totalidad del agente causal. Es entonces que el empleo de sustancias que aunadas al antígeno favorezcan una respuesta inmune de mayores proporciones, abre nuevas posibilidades a una terapéutica exitosa.

De los "preparados" con fines inmunológicos hechos a lo largo del tiempo, son pocos los que han probado ser buenos intensificadores de la respuesta de defensa, aun a pesar de que la lista es extensa (y con la premisa de que casi cualquier elemento o sustancia que se introduzca al cuerpo es potencialmente un "adyuvante"); entre los adyuvantes exitosos podemos citar el ampliamente difundido adyuvante completo de Freund (FCA) y las sales de aluminio. Las características potenciadoras del FCA son las deseables en un adyuvante, pero sus importantes complicaciones lo excluyen de su aplicación en personas. Por su parte, las sales de aluminio (principalmente en forma de hidróxido y fosfato) aunque resultan más tolerables por el organismo, tienen un potencial intensificador no del todo satisfactorio. Aunque hay vacunas, sobre todo en veterinaria, que las incluyen dentro de su formulación con fines reforzadores del proceso inmune. La propuesta del hierro (como componente esencial de un gel potencialmente estimulador de la respuesta inmune) se basa en sus evidencias farmacocinéticas y farmacodinámicas. El ensayo de un adyuvante con hierro dextrano contempla ciertas ventajas:

1. Las dosis tóxicas están muy por arriba de las dosis terapéuticas (ya conocidas en humanos y animales).²¹

2. Es "fácil de rastrear", debido a la pigmentación que deja en tejidos y visto al microscopio se pueden identificar de modo sencillo los macrófagos que han ingerido las partículas del hierro.
3. Produce una reacción inflamatoria que facilita la difusión del hierro a ganglios linfáticos.
4. Activa preferentemente macrófagos.

Resulta lógico pensar que el hierro es incapaz por sí mismo de aumentar la respuesta inmune cuando se suma a un antígeno. Por ende, se hace necesario que el hierro se incorpore a un complejo con propiedades inmunoestimulantes. En este estudio ese complejo es el gel; que no sólo se emplea como vehículo para el hierro sino que a su vez es parte fundamental del adyuvante.

El mecanismo por el cual un adyuvante se le considera como tal, es variado; sin embargo, destaca el efecto de depósito ("*depot*"). Pensando en este mecanismo de acción, se optó por un vehículo que tuviera la capacidad de contener tanto al hierro como al antígeno, que además no fuera dispersable fácilmente y que por supuesto se comportara de forma compatible con el organismo, pero con una característica importante: facilitar la acción de depósito. Estos requisitos del vehículo señalaron al gel, como la forma farmacéutica que se adecuaba a estas necesidades. Las referencias en la literatura (muy pocas por cierto), señalan al Carbomer como un gelificante de uso en investigación; sin embargo, al no ser fácil de adquirir, se decidió emplear un análogo de más fácil acceso: el Carbopol®. Cuyo inconveniente principal era el hecho de ser una marca registrada, por lo que la información acerca de la composición química, modo de elaboración y formulación quedaban restringidos.

En la gráfica 2, inferimos una clara tendencia de aumento en la respuesta celular en el grupo del Al(OH)₃; si ésta expresara los resultados en cuanto a la cantidad de anticuerpos presentes en suero, estaríamos concluyendo la gran eficacia del Al(OH)₃ como adyuvante (superando por mucho al FCA); sin embargo, los resultados apuntan a un comportamiento lesivo de proporciones similares al FCA. El gel de Fe se mostró inocuo, pero aún no podemos colocarlo en el rubro de adyuvante.

CONCLUSIONES

De los hallazgos presentes tras la observación microscópica de las zonas infiltradas con los diferentes adyuvantes se concluye:

- El adyuvante completo de Freund se ubica como prototipo de estimulante inmunológico potenciador.
- Se demostraron sus complicaciones y sus restricciones de uso. Por lo que en definitiva, no es el adyuvante de elección en seres humanos.
- El hidróxido de aluminio y magnesio representa una buena alternativa de intensificador inmune. Sin embargo, se demostró la capacidad para provocar una respuesta de dimensiones no previstas y con resultados semejantes al daño que se obtendría empleando el FCA.
- La conclusión más importante de este trabajo es la prueba de que el gel de Fe dextrano es un elemento que no genera una reacción irritativa en los tejidos cercanos al sitio de aplicación y además estimula la acción de los macrófagos. Esto comprueba la hipótesis planteada respecto a la poca capacidad para propiciar un daño crónico que conduzca a la formación de un granuloma o absceso.

Una conclusión final y a manera de epílogo sería que a partir de este trabajo se abre una posibilidad de investigación; para que ésta sea sustentable y se conduzca a buen término, son necesarios el tiempo, la dedicación y el interés por sacar a la luz las pruebas que amplíen los alcances de esta propuesta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guerin N, Ajan N. *Vaccinations*. Encyclop Med Chir, Pediatrice 1995; 4-002-B-50
2. Amich S., Salve Ma. Luisa, Prieto S. *Laboratorio de Inmunología*. Editorial McGraw-Interamericana. Madrid 1994.
3. Enrique Iáñez Pareja. *Curso de Inmunología General*. Departamento de Microbiología Universidad de Granada, España. 1999.
4. Margni Ricardo A. *Inmunología e Inmunoquímica*. 4ª edición, Editorial Panamericana, Argentina 1989.
5. Barret James T. *Inmunología Médica*. 5ª edición. Editorial Interamericana. México 1990.
6. Young B., Heath J. *Histología Funcional, Atlas y Texto*. 4ª edición. Editorial Harcourt. Madrid 2000
7. Picazo JJ. *Guía práctica de vacunaciones*. Centro de Estudios de Ciencias de la Salud. Madrid 2002.
8. Hospital de Infectología. *Interpretación y Utilización de las Pruebas inmunológicas en el Diagnóstico de las Infecciones más Frecuentes*. IMSS, México 1987.
9. Weir M. *Inmunología*. Editorial El Manual Moderno. México 1990.
10. Roitt Ivan. *Inmunología Fundamentos*. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid 1998.
11. Stevens A. *Atlas y Texto de Histología*. Editorial Mosby/Doyma libros. Madrid 1993
12. *Investigación Biomédica*. Publicación periódica. Cuba, 1999;18(2):130-7
13. Delves Peter. *Encyclopedia of Immunology*. 2ª ed. Ed. Academic Press. UK. 1998
14. Herbert , Wilkinson. *Diccionario de Inmunología*. Editorial JIMS. Barcelona 1998.
15. Berumen J., Villegas N. *Vacunas terapéuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino*. Salud Publica Méx. 1997;39:288-297.
16. <http://www.cdvs.com.ar/>

17. García Valdés, Gómez Carril. *Gel de hidróxido de aluminio: análisis comparativo de métodos de separación sólido-líquido que se utilizan en su producción*. Rev. Cubana Farm. 2000;34(2):87-92
18. Choppin G., Jaffe B., Summerlin L., Jackson L. *Química*. Editorial Publicaciones Cultural. México 1987.
19. Seese W., Daub W. *Química*. 5ª edición, Editorial Prentice Hall. México, 1989.
20. Guyton A. *Tratado de Fisiología Médica*. 4ª edición, Editorial Interamericana. México 1993.
21. *VADEMÉCUM FARMACÉUTICO*. 10ª edición. México. Editorial Reza Editores.
22. *Breve Diccionario Etimológico de la Lengua Española*. Argentina, 1979. Ed. Kapelusz.
23. Del Arco Ortiz de Zárate J. et al. *Formulación Magistral de Medicamentos*. España 2002. Colegio de Farmacéuticos de Bizkala.
24. <http://www.admix.com/carbopol.htm>
25. <http://www.carbopol.com/techdata/pdf/tds242.pdf>.
26. Sandborn W, McLeod R, Jewell D. "Pharmacotherapy for induction and maintenance of remission in pouchitis". The Cochrane Library, Issue 3, 2003. Oxford
27. Alzamora Libertad, Colona, Ticla. "Efecto de diferentes adyuvantes sobre la inmunización de ratones con seroalbúmina bovina Fracción V". México, 1997. Laboratorio de Inmunología Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.
28. Freund J. "The mode of action of immunological adjuvants". Adv. Tuberc. Res. 1956;7:130-48.
29. Harlow Ed, Lane David. *Antibodies. A Laboratory Manual*. 1998 CSHL, Cold Spring Harbor Laboratory.
30. Betancourt Darboys. "Procedimiento para la obtención de una vacuna contra la encefalomiocarditis viral y la vacuna así obtenida". México, 1998. Instituto de Medicina Veterinaria, UNAM; 18(4):130-2.

APÉNDICE

GLOSARIO GENERAL

ABSCESO: Colección limitada de pus.

ACONDICIONAMIENTO: Término aplicado al examen y preparación de animales para la investigación.

"AD LIVITUM ": (Latín) A voluntad, a libre elección.

ADYUVANTE: Sustancia que incrementa de manera inespecífica la respuesta inmunitaria a un antígeno.

ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND (FCA): Emulsión de un antígeno acuoso en aceite. Contiene *Mycobacterium tuberculosis* muertos, contrariamente al adyuvante incompleto de Freund.

ALOJAMIENTO CON BARRERA: Tipo de alojamiento para animales de investigación que los protege de las contaminaciones externas mediante el diseño de la instalación o por los procedimientos que con ellos se realicen.

ALOJAMIENTO DE CONFINAMIENTO: Tipo de alojamiento para animales de investigación que protege al ambiente de la contaminación del interior, mediante los procedimientos y el diseño de las instalaciones.

ALOJAMIENTO EN MICROAISLAMIENTO: Sistema de alojamiento que protege a los animales de contaminantes provenientes del personal o de otros animales de laboratorio, mediante una barrera colocada al nivel de la jaula y que se puede abrir solamente en un medio protegido de clase 100 por personal con las partes descubiertas de la piel descontaminadas con un esterilizante.

ANALGÉSICO: Sustancia que reduce o elimina la sensación de dolor.

ANESTESIA: Pérdida de sensibilidad de una parte (local) o de todo el cuerpo (general), usualmente producida por la administración de un producto químico o de una droga.

ANTICUERPO: Molécula producida por el organismo en respuesta a un antígeno y que tiene la propiedad particular de combinarse específicamente con el antígeno que indujo su síntesis.

ANTÍGENO: Sustancia o material foráneo que estimula la formación de anticuerpos cuando es introducido en los tejidos y la corriente sanguínea.

ANTISÉPTICO: 1. Prevención del deterioro o de la putrefacción; 2. Sustancia que inhibe el crecimiento y desarrollo de microorganismos.

ASEPTICO: Ausencia de microbios vivos; ausencia de productos sépticos o de productos de putrefacción tóxicos.

BIOPSIA: Toma quirúrgica de células o de muestras de tejidos con fines de diagnóstico.

BIOTECNOLOGÍA: Uso o desarrollo de técnicas que usan organismos o partes de organismos para proveer o mejorar productos o servicios.

CAMA: Se aplica a materiales como paja, heno u otro utilizado para reposo de animales en jaulas o cubículos.

CEPA: Grupo de animales de ascendencia conocida, mantenidos en un sistema de acoplamiento consanguíneo planificado; generalmente con algunas características distintivas.

CIRCADIANO: Se refiere a ritmo cíclico correspondiente estrechamente al intervalo de 24 horas.

CIRUGÍA DIRIGIDA: Procedimiento quirúrgico que tiene como finalidad la extirpación, toma de biopsia o ablación de una estructura anatómica en particular, previamente establecida.

CIRUGÍA MAYOR: Procedimiento quirúrgico en el que hay acceso visual directo a una cavidad importante del cuerpo (cráneo, canal raquídeo, tórax, abdomen, pelvis) y/o exposición de estructuras vasculares, musculares, esqueléticas, nerviosas, linfáticas o glandulares importantes y/o remoción o alteración de una cantidad importante de tejido funcional. No hay un límite claro entre cirugía mayor y menor. Así, los comités de protección de los animales deberían usar estos términos precisos sólo como complementos a las "Categorías de técnicas invasoras en experimentación animal" y hacer consultas adicionales especializadas cuando el nivel de invasión y de daño no es evidente.

CIRUGÍA MENOR: Procedimiento quirúrgico que no resulta en la remoción o alteración de una cantidad funcionalmente importante de tejido. No hay un límite claro entre cirugía

mayor y menor. Así, los comités de protección de los animales deberían usar estos términos precisos solo como complementos a las "Categorías de técnicas invasoras en experimentación animal" y hacer consultas adicionales especializadas cuando el nivel de invasión y de daño no es evidente.

COGNICIÓN: Proceso de percepción, de razonamiento y de desarrollo de expectativas.

COMPORTAMIENTO ANORMAL: Comportamiento que se desvía de una norma comparable y definida. Tal norma puede ser el inventario del comportamiento típico para un genotipo determinado, de tal edad, tal sexo, determinado nivel nutritivo, tales condiciones de alojamiento o sistema de gestión, etc.

COMPORTAMIENTO ESTEREOTIPADO: Comportamiento repetido continuamente. El término se usa generalmente para referirse a un comportamiento que se desarrolla como consecuencia de una situación problemática, tal como el aislamiento social extendido, el bajo nivel de complejidad ambiental, etc.

CONSANGÜINEO: Se dice de crías de animales estrechamente emparentadas.

CONTAGIOSO: Enfermedad o desorden que se transmite fácilmente de un individuo a otro.

CONTENCIÓN: Inmovilización de un animal por varios medios o métodos, para reducir sus actividades, a fin de impedir que se ocasionen heridas a sí mismo o al manipulador.

EDEMA: Presencia de grandes cantidades de fluidos en los espacios del tejido intercelular del organismo; usualmente aplicado a la acumulación de fluido en tejidos subcutáneos.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Prueba rápida, sensible y económica para detección de inmunoglobulinas en muestras de suero. Existen equipos de ELISA disponibles comercialmente.

ESTERILIZACIÓN: Destrucción completa de microorganismos por el calor, compuestos químicos, medios mecánicos o físicos. En reproducción animal, se refiere a cualquier procedimiento que incapacita al animal en reproducirse.

ESTRO: Período durante cual la hembra de los mamíferos puede ser fecundada.

ÉTICA: Sistema de principios morales o de normas que rigen las acciones.

ETOLOGÍA: Estudio científico del comportamiento animal.

ESTRÉS: Tensión sobre los procesos fisiológicos y psicológicos normales o sobre las funciones del organismo, de un órgano o de un tejido. Algunas tensiones pueden provocar patologías o enfermedades, o debilitar las defensas normales del cuerpo.

EXENTO DE ORGANISMOS PATÓGENOS ESPECÍFICOS: Se dice del estado de salud de animales criados libres de organismos específicos de enfermedades (en inglés, SPF por "Specific Pathogen Free").

FENOTIPO: Aspecto externo visible de la constitución hereditaria de un organismo.

HEMATÓCRITO: Porcentaje del volumen de eritrocitos (glóbulos rojos) en la sangre entera. También llamado volumen celular compacto.

HEMOGLOBINA: Pigmento de los eritrocitos compuesto por un complejo de hierro y de proteína que transporta el oxígeno.

HUMEDAD (RELATIVA): La relación entre la cantidad de vapor de agua realmente presente en el aire con la cantidad de vapor de agua que el aire es capaz de sostener a una temperatura determinada.

INFECCIÓN: Proceso de desarrollo de una enfermedad ocasionado por la invasión de microorganismos en tejidos del cuerpo.

INFECCIÓN LATENTE O OCULTA: Infección o condición sin manifestaciones clínicas en un animal pero que puede, en ciertas condiciones o en estado de estrés, desarrollarse como enfermedad identificable.

INFECCIÓN MICÓTICA: Enfermedad ocasionada por un hongo.

INFLAMACIÓN: Condición que presentan los tejidos como reacción a una herida o a un agente infeccioso.

INTRADÉRMICO: Se dice de una inyección en la dermis o en la piel.

INTRAPERITONEAL (IP): Se dice de una inyección en la cavidad peritoneal o abdominal.

INTRAVENOSO (IV): Se dice de una inyección en una vena.

MICROAMBIENTE: Un hábitat aislado pequeño, generalmente dentro de una jaula.

MICROORGANISMO: Agente vivo microscópico, a menudo responsable de enfermedades.

MORBILIDAD: Ocurrencia de una enfermedad.

NECROSIS: Muerte de una porción de tejido u órgano.

ORAL o "PER OS" (PO): Administración de una sustancia por la boca.

PATÓGENO: Organismo que ocasiona una enfermedad.

"PER SE": (Latín) Por sí, por sí mismo.

PLASMA: Parte líquida de la sangre, sin células, en la que anticoagulantes han impedido la coagulación.

PRIVACIÓN: Remoción de sustancias indispensables (privación de alimentación, de agua), aislamiento de cosas deseadas (aislamiento social) o prevención del desempeño de comportamientos necesarios (privación de sueño, de ejercicio). La privación se usa a menudo en investigaciones para inducir una acción identificable.

PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS ("Standard Operating Procedures [SOP]" en inglés): Documentos escritos que especifican los procedimientos que deben seguirse

RAZA: Población de animales dentro de una especie, que difieren de aquellos que pertenecen a otras poblaciones dentro de la misma especie, con respecto a características definidas genéticamente determinadas.

RIESGO: Probabilidad de efectos adversos, su naturaleza y severidad en relación con el grado de exposición.

SALUD: Estado relativo de bienestar físico, psicológico y social.

SÍNDROME: Conjunto de señales (animales) o de síntomas (humanos) que ocurren juntos y que designan un estado o una enfermedad.

SUBCUTÁNEO (SC): Que ocurre bajo de la piel.

SUERO: Componentes no celulares de la sangre que permanecen después de la coagulación.

SUSCEPTIBLE: Que tiene poca resistencia o que tiene predisposición a la infección o a las heridas.

TÉMPERATURA AMBIENTAL: Temperatura del lugar donde se encuentra el animal; en condiciones de alojamiento en jaula, puede referirse a la temperatura en el microambiente de la jaula por oposición a la temperatura afuera de la jaula, en la sala o en el corral.

TOXINA: Producto tóxico para el animal que proviene de una célula vegetal o animal. Puede ser producido por la célula misma y excretado, o puede ser contenido dentro de células, tales como las bacterias, y liberado únicamente luego de la muerte de la célula.

TRANQUILIZANTE: Agente, usualmente una droga, capaz de hacer a un animal tranquilo y dócil.

TRAUMA: Herida.

VACUNA: Sustancia usada para estimular la producción de anticuerpos contra un agente responsable de una enfermedad específica, usualmente como medida preventiva.

VECTOR: Ser vivo capaz transportar y transmitir agentes infecciosos.

VIABILIDAD: 1) Se refiere generalmente a la capacidad del joven para vivir después del nacimiento. 2) Cualidad aplicable a eventos comprobables o realizables.

VIRUS: Cualquiera de un grupo grande de organismos que contienen material genético, pero incapaces de reproducirse fuera una célula huésped.

ZONOSIS: Enfermedades de los animales que pueden, en condiciones naturales, ser transmitidas al humano