



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

EFFECTOS DE RIBOVAC® (RIBOSOMAS BACTERIANOS Y PROTEOGLICANOS DE LA MEMBRANA DE *Klebsiella Pneumoniae*) SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

P.O.F.B. JESSICA VILLA AMBRIZ

ASESOR:

D. en C. ALAIN RAIMUNDO RODRIGUEZ OROZCO

CO-ASESORA:

D. en C. ROCÍO DEL CARMEN MONTOYA PÉREZ

MORELIA, MICHOACAN, MÉXICO, DICIEMBRE DE 2010

ÍNDICE

	Página
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
1. Sistema inmunológico	7
1.1. Inmunidad innata	8
1.2. Neutrófilos en la inmunidad innata	9
1.2.1. Procesos mediante los cuales los PMN llegan a su destino y cumplen su función.	11
2. Moléculas de adhesión	12
2.1. Integrinas	17
2.2. Moléculas de diferenciación	19
3. Citometría de flujo	21
4. Tracto respiratorio	23
4.1. Infecciones recurrentes de las vías respiratorias	24
4.2. Neutrófilos en las infecciones respiratorias	25
5. Inmunoterapia	26
5.1. Adyuvantes	27
5.2. Ribosomas bacterianos	28
5.3. Ribovac	30
Justificación	32
Planteamiento del problema	33
Hipótesis	34

Objetivo general	35
Objetivo específico	35
Material y métodos	36
Procedimiento estadístico	37
Cultivo celular	38
Resultados	39
Discusión	45
Conclusiones	47
Perspectivas	48

ANEXOS

Reactivos	49
Glosario de términos	51
Lista de abreviaciones	57
Lista de tablas	59
Lista de cuadros	59
Lista de figuras	60
Bibliografía	61

RESUMEN

ANTECEDENTES. La inmunoestimulación ribosomal es una opción de inmunoterapia anti-infecciosa basada en la activación de células inmunocompetentes que aumentan la respuesta inmune específica y la no específica (en particular el sistema de defensa de las mucosas). **OBJETIVO.** En el presente trabajo nos planteamos el objetivo de evaluar el efecto inmunoestimulante de Ribovac® (Preparado ribosomal) sobre la expresión de moléculas de adhesión CD11c y CD103 en neutrófilos de sangre periférica. **MATERIAL Y MÉTODOS.** Para observar el efecto de Ribovac® medimos por citometría de flujo la expresión de moléculas de adhesión CD11c y CD103 en neutrófilos humanos de sangre periférica. **RESULTADOS.** En este estudio encontramos un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión CD11c y CD103 en la membrana de neutrófilos tratados con Ribovac® y se observó que el tiempo de tratamiento fue importante en la expresión de las moléculas de adhesión. **CONCLUSIONES.** Ribovac® potencia la expresión de moléculas de adhesión de los polimorfonucleares, favoreciendo la migración de los neutrófilos al sitio del daño, el cual es un proceso significativo en la defensa anti-infecciosa del huésped.

ABSTRACT

BACKGROUND. The ribosomal immunostimulation is an option of anti-infectious immunotherapy based on the activation of immune cells that increase the specific immune response and nonspecific (particularly the defense system of the mucous membranes). **OBJECTIVE.** In the present work we present the objective to evaluate the immunostimulant effect of Ribovac[®] (prepared ribosomal) on the expression of adhesion molecules CD11c and CD103 in human neutrophils of peripheral blood. **MATERIAL AND METHODS.** To observe the effect of Ribovac[®] we measured by flow cytometry the expression of adhesion molecules CD11c and CD103 in human neutrophils of peripheral blood. **RESULTS.** In this study we found an increase in the expression of adhesion molecules CD11c and CD103 in the membrane of neutrophils treated with Ribovac[®] and it was observed that the time in the treatment was important in the expression of adhesion molecules. **CONCLUSIONS.** Ribovac[®] enhances the expression of adhesion molecules in the PMNs, favoring the migration of the neutrophils to the site of damage, which is a significant process in the anti-infectious defense of the host.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de las vías respiratorias son un problema de salud pública, debido a que estas son frecuentes y se asocian con morbilidad y mortalidad significativas. Una encuesta realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS, AÑO) reveló que las infecciones respiratorias agudas son una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años a nivel mundial. El origen de estas infecciones de las vías respiratorias es predominantemente bacteriano. (Ribosomal symposium 2004) Una gran cantidad de gérmenes que invaden al cuerpo entran mediante el tracto respiratorio superior, por lo que las infecciones recurrentes del tracto respiratorio causan una morbilidad sustancial. Debido a que la incidencia de estas infecciones es elevada, su impacto sobre los individuos y la sociedad es enorme. Las infecciones respiratorias recurrentes, tienden a ocurrir más frecuentemente en personas ancianas, en personas con enfermedades concomitantes como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o en personas cuyo sistema inmune es inmaduro (niños). Lugares como guarderías, casas cuna y escuelas, están asociados con el incremento en el riesgo de infecciones respiratorias recurrentes (Banz, 1994).

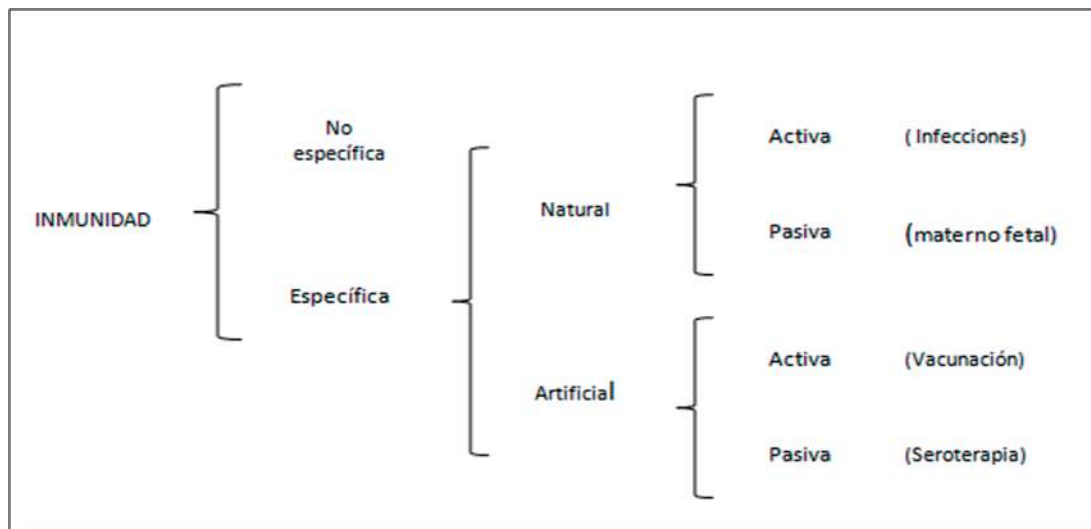
El manejo actual de las infecciones del tracto respiratorio se centra en medidas preventivas más que curativas. El tratamiento con medicamentos, principalmente antibacterianos, ha sido el abordaje clásico, sin embargo, este tipo de tratamiento tiene varias desventajas ya que no previene la recurrencia de las infecciones bacterianas y tampoco es efectivo en contra de las infecciones virales. El tratamiento con antibacterianos no incrementa las defensas del huésped, además el uso frecuente de estos agentes puede ocasionar el desarrollo de mecanismos de resistencia de las bacterias (Banz, 1994). Las estrategias tradicionales de vacunación generalmente no han tenido éxito en el control de los patógenos respiratorios más comunes debido a la multiplicidad de los posibles agentes patógenos y las cepas. (Ribosomal symposium, 2004) A diferencia del tratamiento antimicrobiano, Ribovac[®] es un tratamiento preventivo, diseñado para estimular la inmunidad específica en contra de bacterias, que son los patógenos más comunes de las infecciones recurrentes del tracto respiratorio, y para incrementar la inmunidad no específica y suministrar con ello una protección general contra los virus y otros gérmenes. Ribovac[®] ha demostrado que reduce drásticamente la recurrencia de infecciones del tracto respiratorio (27-68% de reducción), y redujo la duración de la infección (28-66% de reducción) y el requisito de antibacterianos (29-60% de reducción) por lo que Ribovac[®] puede contribuir significativamente a la salud de la comunidad (Bellanti, 2003).

1. SISTEMA INMUNOLÓGICO

La palabra inmunidad se deriva de la palabra latina “immunis” que significa “libre de” y se refiere a la capacidad de un organismo de protegerse así mismo en contra de bacterias, virus y hongos, parásitos y sustancias extrañas (veneno, contaminantes químicos, etc) (Clot, 1994)

La inmunidad es definida como la resistencia a la enfermedad, específicamente a enfermedades infecciosas. El grupo de células, tejidos y moléculas que median la resistencia a infecciones es llamado sistema inmunológico y la reacción coordinada de estas células y moléculas frente a los agentes infecciosos es la respuesta inmune. La función fisiológica del sistema inmune es prevenir las infecciones identificando y eliminando células patógenas y tumorales así como erradicar las infecciones ya establecidas (Abbas, 2006). La capacidad de un individuo para mantenerse libre de infección depende tanto de su resistencia natural, como de la resistencia que pueda desarrollar o adquirir durante su vida (Rojas, 2001). La inmunidad innata no requiere del contacto previo con el agente infectante y funciona de manera no específica, por lo que este tipo de defensa del huésped está siempre presente en los individuos sanos y está habilitada para bloquear la entrada de agentes patógenos y elimina rápidamente los microbios que logran entrar en los tejidos del huésped, mientras que la inmunidad adquirida es la defensa del huésped que se genera después del contacto con el agente y es específica para el mismo, no es inmediata y requiere de algunos días para ponerse de manifiesto e incluye la producción de anticuerpos, las células y los anticuerpos resultantes tienen la capacidad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su producción (Abbas, 2006; Rojas, 2001). La inmunidad específica puede adquirirse en forma activa o en forma pasiva.

Véase Cuadro 1.



CUADRO 1. Tipos de inmunidad (Tomado de Rojas, 2001).

1.1 INMUNIDAD INNATA

Todos los seres vivos poseen mecanismos intrínsecos de defensa en contra de agentes infecciosos. Las determinantes de la inmunidad innata incluyen factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales, además de otros factores como la edad y las barreras de protección mecánica (la piel intacta representa una barrera física en contra de los microorganismos, la cual es potenciada por barreras químicas como la grasa y el sudor. Las membranas mucosas están protegidas por cilios, mucosidad, enzimas y fluidos bilógicos. Además, la presencia de una flora bacteriana normal, ayuda a resistir la invasión por bacterias patógenas).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa, mediada por células y moléculas que están siempre listas para eliminar patógenos como bacterias, virus y hongos. La principal característica de los mecanismos de la inmunidad innata es reconocer y responder ante las estructuras que son compartidas por diversas clases de microbios. El sistema inmune innato consiste de epitelios, células del torrente sanguíneo y varias proteínas plasmáticas los cuales proporcionan barreras para la infección. Estos componentes desempeñan funciones diferentes pero complementarias en el bloqueo de la entrada de los patógenos y en la eliminación de los patógenos que entran en los tejidos del huésped (Abbas, 2006; Clot, 1994; Centner, 1987).

1.2 NEUTRÓFILOS EN LA INMUNIDAD INNATA

Los neutrófilos, denominados también polimorfonucleares (PMN), son glóbulos blancos con gránulos en su citoplasma. Miden de 12 a 18 μm y es el tipo de leucocito más abundante de la sangre en el ser humano, representan entre el 60% y el 70% de los leucocitos circulantes y más del 90% de los fagocitos circulantes. La medida de neutrófilos en sangre periférica es de $2.0 - 7.5 \times 10^9/\text{L}$, en la circulación sanguínea tienen una vida media de entre 6 hr Y 10 hr, la médula ósea es requerida para producir y liberar entre $5-10 \times 10^{10}$ neutrófilos por día, con la capacidad de aumentar la producción aun más si es necesario (Cowburn et al. 2008; Seely, 2003). En la inmunidad innata los neutrófilos son la primera línea de defensa en contra de infecciones bacterianas, virales y fúngicas (Spöri, 2008). Los neutrófilos se originan en la médula ósea, durante una etapa proliferativa que dura aproximadamente 6.5 días, el mieloblasto se transforma en promielocito y después en mielocito, durante una etapa de maduración que dura 7.5 días el mielocito se transforma en metamielocito, después en polimorfonuclear juvenil o “en banda” y finalmente en polimorfonuclear maduro o segmentado. La mayoría de los polimorfonucleares maduros se mueren en la médula ósea por apoptosis para luego ser eliminados por los macrófagos presentes en ese tejido. Los polimorfonucleares maduros que pasan a la circulación permanecen de 6-10 h antes de ser atrapados por los órganos con sistema retículo endotelial donde sobreviven de 1-2 días, luego mueren por apoptosis y son eliminados por macrófagos tisulares (Rojas, 2003; Bjerregaard, 2003).

Véase figura 1

Los microorganismos que logran pasar las barreras fisicoquímicas naturales y entrar al cuerpo inician un proceso de inflamación, (condición o estado en la cual entran a los tejidos como respuesta a una lesión, que se manifiesta clínicamente con rubor, calor, tumor y dolor). Los neutrófilos son las células más importantes involucradas en la respuesta inflamatoria ya que son fundamentales en la eliminación de bacterias (Seely, 2003). Los neutrófilos son reclutados a los sitios de infección o inflamación para ingerir microbios mediante un proceso llamado fagocitosis, la capacidad de los neutrófilos para ingerir y destruir microbios es esencial para la defensa innata del huésped (Burlak, 2006).

La fagocitosis es un proceso activo, en el cual el patógeno unido al receptor es inicialmente rodeado por la membrana celular y posteriormente internalizado en el fagosoma, este se funde con los lisosomas generando un fagolisosoma, dentro de los fagolisosomas los microorganismos quedan

a merced de los mecanismos bactericidas oxidativos y no oxidativos de las células y son finalmente destruidos Véase figura 2. Los neutrófilos producen una gran variedad de productos tóxicos que ayudan a matar a los microorganismos fagocitados, los más importantes son los derivados del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico (NO) que ejercen toxicidad directa contra bacterias (Rodríguez, 2005).

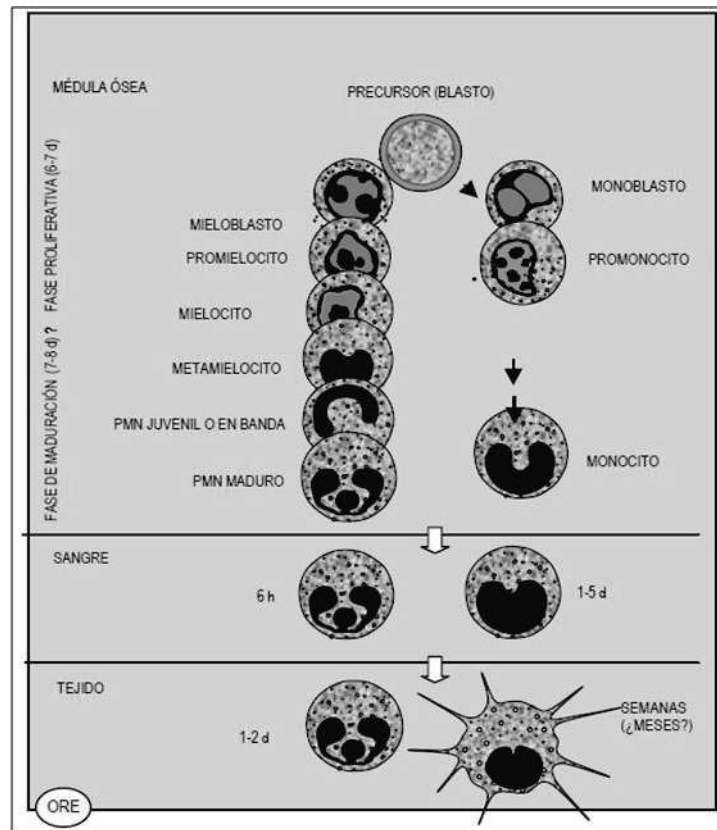


FIGURA 1. Origen, maduración y vida media de los PMN (Tomado de Rojas, 2003).

El proceso de fagocitosis inicia con la infección del individuo una vez que los microorganismos proliferan y liberan pequeños péptidos con actividad quimiotáctica, los neutrófilos presentes en el torrente sanguíneo por medio de señales quimiotácticas en el cuerpo, actúan rápidamente llegando al sitio de la infección en un tiempo aproximado de 1h.

1.2.1 PROCESOS MEDIANTE LOS CUALES LOS PMN LLEGAN A SU DESTINO Y CUMPLEN SU FUNCIÓN

Diapédesis y quimiotaxis: Los neutrófilos acuden a los sitios de infección porque los factores quimiotácticos producidos por los microorganismos los atraen, los neutrófilos migran a los sitios de infección, al unirse a moléculas de adhesión endoteliales; en respuesta a los factores quimiotácticos, las células fagocíticas incrementan la síntesis de proteínas de adhesión, se vuelven más “pegajosas” entre sí, esto propicia que los neutrófilos se adhieran a la superficie del endotelio y rueden hasta encontrar una salida entre las uniones de las células endoteliales mediante un proceso llamado diapédesis. Ya fuera de los vasos sanguíneos, los neutrófilos se desplazan hasta los focos de infección donde hacen contacto con los microorganismos (Rojas, 2001). En el proceso de diapédesis participan de manera muy importante las moléculas de adhesión tanto de los neutrófilos (integrinas y selectinas) como de las células endoteliales tales como selectinas y adhesinas Ig CAM (moléculas de adhesión celular de la familia de inmunoglobulinas) (Rojas, 2003).

Endocitosis: Las células responden al contacto con los microorganismos extendiendo su membrana y emitiendo prolongaciones que terminan por rodear y englobar a los microorganismos. Fusión fagosoma-lisosoma: Los neutrófilos una vez formado el fagosoma segregan sustancias microbidas dependientes de oxígeno y las independientes como enzimas hidrolíticas. La actividad conjunta de las sustancias dependientes de oxígeno y los componentes lisosomales son factores que inducen la muerte de los microorganismos ingeridos.

Digestión y exocitosis: Los microorganismos ingeridos se mueren por el efecto tóxico de los metabolitos de oxígeno y el nitrógeno. Las hidrolasas degradan a los componentes microbianos hasta fragmentos de tamaño variable (lípidos, polipéptidos, oligosacáridos), que pueden ser reutilizados por la célula mientras que otros son desechados por exocitosis, un proceso inverso a la endocitosis (Rojas, 2001).

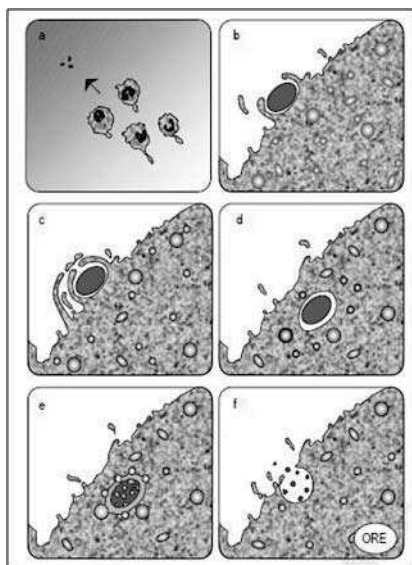


FIGURA 2. Etapas del proceso de la fagocitosis: a) quimiotaxis, b) adherencia de las células con los microorganismos, c) endocitosis, d) formación del fagosoma, e) formación del fagolisosoma con la consecuente destrucción del microorganismo, f) exocitosis (Tomado de rojas, 2003).

2. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La respuesta inflamatoria suscitada tras la invasión de microorganismos, o sobre tejido dañado está asociada con la liberación de mediadores proinflamatorios por macrófagos, mastocitos, incluso otras células del tejido como los fibroblastos. Mediadores solubles como la histamina, interleucina-1 (IL-1), y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) activan al endotelio, es decir, inducen la expresión de moléculas de adhesión (Walzog, 2000). La migración de los neutrófilos del torrente sanguíneo hacia sitios de acción extravasculares en respuesta a la liberación de quimioatrayentes por patógenos y células del hospedero, requiere de una reorganización continua del citoesqueleto de los neutrófilos, así como del aparato de adhesión (Sanjeev, 2006). Las moléculas de adhesión hacen que los neutrófilos se adhieran a la pared endotelial y promuevan la migración de los neutrófilos al sitio de inflamación, las interacciones adhesivas entre neutrófilos y células endoteliales son esenciales para los eventos tempranos en la defensa del huésped que se regulan a distintos niveles, uno de los cuales es la expresión y función de proteínas de superficie adhesivas en los neutrófilos y en las células endoteliales, los antígenos de superficie de neutrófilos implicados en estas interacciones son las $\beta 2$ -integrinas que median la adherencia fuerte entre los

neutrófilos y las células endoteliales y su posterior extravasación (Naccache, 1994). El recubrimiento de neutrófilos dentro de las áreas de inflamación comienza con la unión de los neutrófilos al endotelio seguido por su trasmigración dentro del tejido, debido a la desaceleración del flujo sanguíneo, los leucocitos son suficientemente expuestos a los mediadores inflamatorios secretados por las células endoteliales, y al ser activados se adhieren firmemente al endotelio a través de las moléculas de adhesión. Este es un requisito previo para la trasmigración endotelial, que se produce a través de las uniones intercelulares de las células endoteliales. Esto permite la regulación temporal y espacial de la distribución de las distintas poblaciones leucocitarias en los distintos destinos del cuerpo. Dependiendo del estímulo inflamatorio la población de leucocitos reclutados, el tejido, y el contexto de activación, distintas moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios están involucrados (Virchow, 1871; Ley, 1991). Tres familias de moléculas de adhesión juegan un papel central dentro de las interacciones endoteliales con los neutrófilos: Las selectinas, las integrinas y la superfamilia de inmunoglobulinas, y otras moléculas, que son expresadas en la superficie celular, como glucoproteínas transmembranales (Albelda, 1994). Véase

Tabla 1

Moléculas de adhesión	Sinónimos	Mayor incidencia	Principales ligandos
SELECTINAS			
L -Selectina	CD62L	Leucocitos	CD34, Glycam-1, MAdCam-1,PSGL-1.
P-Selectina	CD62P	Células endoteliales, plaquetas	PSGL-1.
E-Selectina	CD62E	Células endoteliales	ESL-1, PSGL-1.
INTEGRINAS			
β 1-Integrinas α 4 β 1	CD49d, CD29, VLA-4	Linfocitos y monocitos	VCAM-1, fibronectina.
β 2-Integrinas α L β 2 α M β 2	CD11a/CD18, LFA-1 CD11b/CD18,Mac-1	Leucocitos Neutrófilos y monocitos	ICAM-1,-2,-3. ICAM-1, fibrinógeno, C3bi, factor x.
α x β 2 α D β 2	CD11c/CD18, Gp150,95 CD11d/CD18	Neutrófilos y monocitos Linfocitos	ICAM, fibrinógeno, C3bi. VCAM, ICAM-3
β 3-Integrinas α V β 3	CD51/CD61	Leucocitos	Vitronectin, CD31
β 7-Integrinas α 4 β 7 α E β 7	CD49d/ β 7 CD103/ β 7	Linfocitos Linfocitos	VCAM-1, MAdCam-1 E-caderina
MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS			
ICAMs ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3 VCAM-1 PECAM-1	CD54 CD102 CD50 CD106 CD31	Células endoteliales Células endoteliales Leucocitos Células endoteliales Neutrófilos, monocitos, plaquetas, células endoteliales	LFA-1, gp150/95 LFA-1, Mac-1 LFA-1, α D β 2 α 4 β 1, α 4 β 7 CD31
OTRAS			
CD44 VAP-1		Leucocitos Células endoteliales	

Tabla 1. Moléculas de adhesión involucradas en el tráfico leucocitario. (Modificada de Walzog, 2000).

Selectinas. La familia de las selectinas consiste de tres moléculas diferentes: L-selectinas, P-selectinas, y E-selectinas, las cuales tienen una importante función en la captura y rodamiento leucocitario sobre las células endoteliales. La expresión de L-selectina está restringida a los leucocitos, la P-selectina está constitutivamente expresada sobre plaquetas y las E-selectinas son expresadas sobre las células endoteliales activadas. Una función importante de las selectinas está definida por su habilidad para unir ligandos de carbohidratos en milisegundos, por lo que captura leucocitos del torrente sanguíneo. Esto permite un subsecuente rodamiento leucocitario, lo cual reduce notablemente la velocidad de desplazamiento de $>2000 \mu\text{m/s}$ a $<50 \mu\text{m/s}$. Esta especializada función requiere de una rápida asociación y disociación de la interacción selectina-ligando, y está bien definida por la L-selectina, las P-selectinas y E-selectinas también contribuyen al rodamiento leucocitario, en la activación de células endoteliales. La P-selectina es rápidamente reclutada a la superficie celular, mientras que la expresión de la E-selectina requiere de síntesis *de novo*, la cual es inducida por varios mediadores inflamatorios. Las P-selectinas y E-selectinas que unen Hidratos de carbono sobre leucocitos y por lo tanto median el rodamiento leucocitario sobre el endotelio activado.

Integrinas: Median la firme adhesión leucocitaria por la unión a miembros de la familia de inmunoglobulinas, familia de moléculas de adhesión expresada sobre células endoteliales. Las integrinas representan una amplia familia de proteínas que es clasificada por subunidades β . Las $\beta 1$ (CD29), $\beta 2$ (CD18), $\beta 3$ (CD61), y $\beta 7$ -integrina son altamente expresadas en el recubrimiento leucocitario. Concretamente las $\beta 2$ -integrinas median la firme adhesión de los polimorfonucleares por la unión a moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas.

Miembros de la superfamilia de las Inmunoglobulinas: Las moléculas de adhesión más importantes de la superfamilia de inmunoglobulinas que sirven como ligando por las integrinas durante las interacciones leucocitos-endotelio son las ICAMs. Otras moléculas de adhesión son las caderinas, las cuales son expresadas por las células endoteliales, la disociación de las E-caderinas ocurre durante la migración transendotelial de leucocitos (Walzog, 2000). La migración de los neutrófilos del torrente sanguíneo hacia los tejidos es un proceso de múltiples pasos que consiste en un apego inicial de los neutrófilos a las células endoteliales, seguida de una firme adhesión y finalmente la migración a través del endotelio (Abbas, 2006). Bajo condiciones “normales”, los neutrófilos no se adhieren a las paredes de los vasos. El primer paso de la migración de los

neutrófilos es su desaceleración y el rodamiento de los neutrófilos dentro de la circulación, este proceso es mediado por las selectinas. Después de un periodo variable de rodamiento, un evento de activación se produce una vez que los neutrófilos quedan firmemente adheridos a la superficie de las células endoteliales. Para que se lleve a cabo esta adhesión es necesaria la activación de las β_2 integrinas Véase **fig.3**. El siguiente paso es cuando los neutrófilos comienzan a cambiar de su conformación esférica a una aplanada, este proceso requiere de la interacción de integrinas activadas sobre neutrófilos con miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, moléculas de adhesión celular tipo 1(CAM-1) sobre el endotelio. Por último los neutrófilos comienzan a migrar a través de las uniones de las células endoteliales, este evento requiere de un gradiente quimiotáctico y la participación de moléculas de adhesión celular endotelial plaquetaria-1 (PECAM-1) (Albelda, 1994), que también forman parte de la familia de inmunoglobulinas Véase **figura 4**. El objetivo principal de este proceso es conducir a los neutrófilos del torrente sanguíneo al sitio extravascular de las infecciones en cuestión de minutos. La acumulación de leucocitos en el sitio de la infección, con una concomitante dilatación vascular y una creciente fuga de fluidos y proteínas en el tejido, son parte de la respuesta inflamatoria (Abbas, 2006).

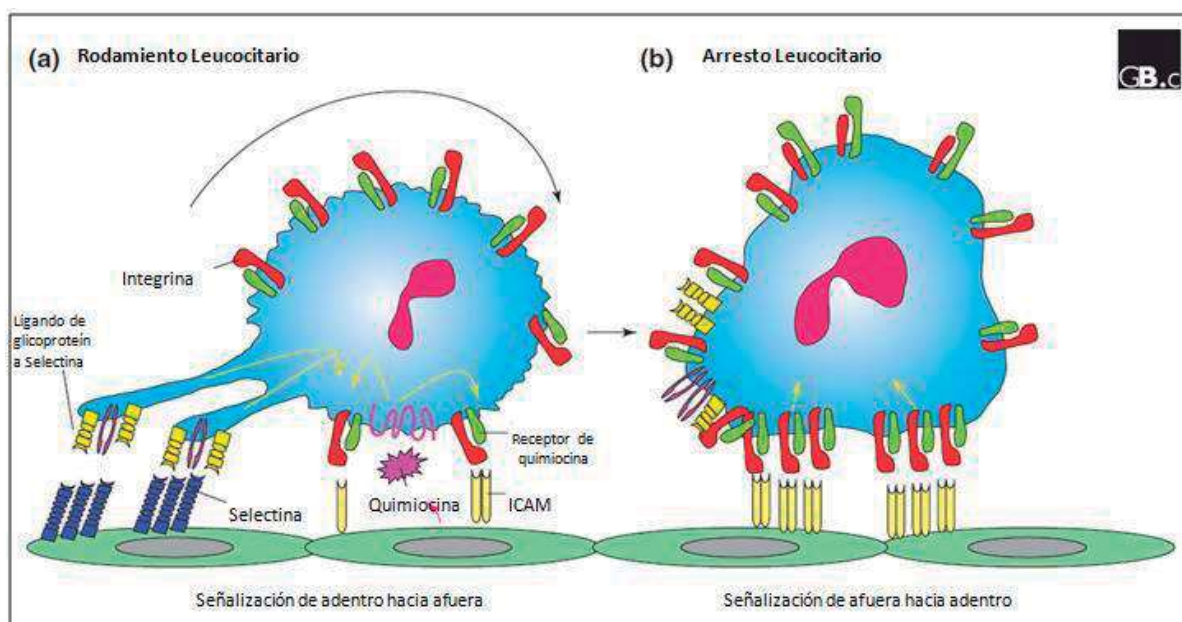


FIGURA 3. Activación de integrinas sobre neutrófilos. En (a) se muestra la unión de ligandos de la glicoproteína selectina (amarillo y morado) leucocitaria a las selectinas (azul) de la superficie endotelial, y la unión covalente de las integrinas de baja afinidad(verde) de los leucocitos al ICAM

(amarillo pálido) en el endotelio facilita la movilización y rodamiento de células. Esta unión junto con las señales de quimiocinas (rosa) generan señales de adentro hacia afuera (flechas amarillas) que cambian la unión de integrinas para una alta afinidad de unión al ligando. En **(b)** se muestra el arresto leucocitario que esta mediado por las agrupaciones de las integrinas de alta afinidad (rojo) unidas a ICAMs sobre el endotelio celular. (Tomada de Takada, 2007)

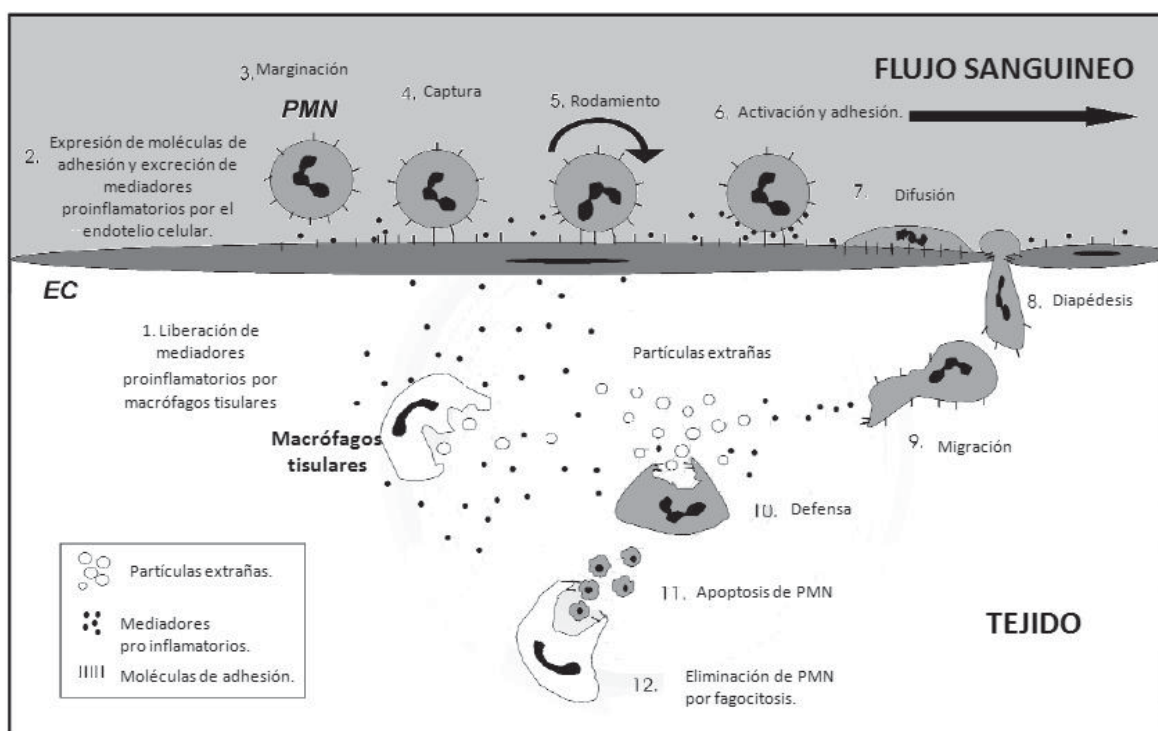


FIGURA 4. Interacciones adhesivas entre los neutrófilos y el endotelio. (Tomada de Walzog, 2000).

2.1 INTEGRINAS

El patrón de moléculas de adhesión expresadas resulta crítico para la extravasación de leucocitos en la inflamación determinando la cantidad y calidad de las interacciones leucocito-endotelio así como su evolución en el tiempo (Walgog, 2000).

Las integrinas forman parte de una superfamilia de receptores transmembranales de adhesión celular que participan en las interacciones célula-célula y célula-matriz, debido a que se unen a las proteínas del citoesqueleto, reconocen ligandos de la matriz extracelular, principalmente a los ligandos de la superficie celular. Cada integrina mantiene uniones no covalentes entre cadenas

heterodiméricas α y β (Carlos, 1994; Higgins, 1998). Cada subunidad tiene un gran dominio extracelular que contiene el N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto con el C-terminal (Bowen, 2000). En el ser humano se conocen por lo menos 18 subunidades α y 8 β , las cuales son capaces de generar 24 integrinas diferentes. Cada una tiene una especificidad distinta de unión al ligando y distribución propias en tejidos y células. Las integrinas funcionan como receptores de tracción que pueden transmitir y detectar cambios en la fuerza mecánica que actúa sobre la matriz extracelular, al unirse a un ligando extracelular las integrinas generan una señal intracelular y, por lo que el funcionamiento de las integrinas puede ser regulado por las señales del interior de la célula. La adhesión mediada por las integrinas extracelulares provoca una gran variedad de eventos de transducción de señales que modulan conductas tales como la adhesión celular, la proliferación, la supervivencia o la apoptosis, la forma, la polaridad, la motilidad, la haptotaxis, la expresión génica y la diferenciación celular (Takada, 2007).

Las integrinas desempeñan un importante papel en la migración o retención de los linfocitos en determinados sitios dentro de un tejido. Las integrinas de las subfamilias $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 7$ son críticas en la migración leucocitaria (Higgins, 2000). Aunque varias moléculas de adhesión específicas median la adhesión de linfocitos al endotelio vascular, pocas interacciones moleculares han sido identificadas que estén involucradas en la retención específica de los linfocitos en los tejidos. La mejor interacción específica al tejido es mediada por las integrinas $\alpha E\beta 7$ (CD103) expresadas en los leucocitos y las E-caderinas que se expresan en las células epiteliales (Taraszka, 2000).

La mayoría de los linfocitos maduros recirculan continuamente pasando del torrente sanguíneo a los tejidos y de nuevo al torrente sanguíneo. Esta recirculación se guía por el reconocimiento de linfocitos endoteliales y una posterior diapédesis. Por lo tanto, la interacción linfocito-endotelio es un punto central regulado por el sistema inmunológico, esta controla el acceso de los subgrupos especializados de linfocitos a los tejidos e influye en las respuestas locales inmunes e inflamatorias. A nivel molecular, este proceso está regulado por receptores de adhesión en la membrana celular de los linfocitos y de las células endoteliales. La especialización de los subgrupos de linfocitos y células endoteliales en la expresión de receptores de adhesión permite a los linfocitos moverse de forma selectiva a compartimientos específicos y funcionales del sistema inmunológico. Los receptores de adhesión juegan un papel clave en muchos procesos biológicos tales como la embriogénesis, la hemostasia y la inflamación. Su función es la de organizar interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Drillenburg, 2000). La integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) es un receptor

capaz de mediar la retención de linfocitos en los tejidos epiteliales. Está implicado en la retención de células T epiteliales a través de la unión a E-caderina (Schlickum, 2008).

2.2 MOLÉCULAS DE DIFERENCIACIÓN

Las moléculas de diferenciación llamadas CD (cluster de diferenciación) son biomarcadores altamente específicos que reaccionan frente a distintas estructuras en la superficie celular y permiten la identificación de las células. Estas moléculas ejercen diversas funciones en la superficie celular, actúan como enzimas o como receptores para virus, para proteínas del complemento o para moléculas de adhesión, participan en las interacciones de las células del sistema inmune, definen poblaciones y subpoblaciones celulares, se comportan como receptores hormonales o se expresan en las diversas fases del ciclo de activación celular (Sampalo-Lainz, 1992).

Antígenos de activación: Estas moléculas permiten establecer grados de diferenciación y actividad funcional que permiten clasificar a la célula en: célula virgen (no estimulada), células de memoria y células activadas.

Algunas de las moléculas CD son particulares de ciertas líneas celulares, mientras que otras son compartidas por varias células; algunas moléculas CD se expresan sólo en las células activadas y a muchas de ellas se les reconoce alguna función como moléculas de reconocimiento ligadas a mecanismos de transducción de señales (Rojas, 2001; Sung, 2006). Algunos de los biomarcadores de activación reconocidos en los neutrófilos se muestran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Moléculas CD para neutrófilos (Modificada de rojas, 2001)

CD Denominación	Sinónimos	Estructura molecular, familia	Principales células de expresión	Función
CD11_c	integrina $\alpha x \beta_2$; p150/95 (CD11c/CD18)	Ligada nocovalentemente a CD18 para formar p150,95 integrina	Monocitos Macrófagos Granulocitos NK	Adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio

CD 103	integrina $\alpha_E\beta_7$	Familia de integrinas	Es encontrado en un 95% de los linfocitos intraepiteliales del intestino, células T macrófagos y mastocitos. En un 2 % en linfocitos de sangre periférica.	Molécula de adhesión
---------------	-----------------------------	-----------------------	--	----------------------

La CD103 ($\alpha_E\beta_7$) es una integrina presente en las células T, las células dendríticas y los mastocitos localizados en las mucosas. Esta tiene como su principal ligando a la E-caderina presente en las células endoteliales. La expresión de la subunidad β_7 se ha asociado a diferencias importantes en la función del sistema inmune de mucosas asociado al tracto respiratorio y gastrointestinal (Wagner, 1996). Un defecto de la subunidad α_E se ha asociado a la inflamación en la piel (Bader, 1998; Stephens, 1995). El antígeno CD103 es un heterodímero conocido como el antígeno de la mucosa humana 1(HML-1) o $\alpha_E\beta_7$ integrina. Este anticuerpo monoclonal (AcM) marca todos los subconjuntos de linfocitos intraepiteliales humanos, así como subpoblaciones de las células T de lámina propia y linfoblastos mesentéricos y también reacciona con algunos linfocitos en otras mucosas (Cerf-Bensussan, 1987; Cerf-Bensussan, 1992). Este AcM ha sido asignado como clouster de diferenciación CD103 durante el 5^{to} International workshop on human Leucocyte differentiation Antigens (HLDA), EN Boston, U.S.A, EN 1993 (Cepek, 1995).

CD11c ($\alpha_x\beta_2$, gp 150/95) es una integrina presente en los leucocitos de mamíferos. La ausencia de la subunidad β_2 se ha asociado a deficiencias en la adhesión leucocitaria (Wilson, 1993). la molecula de diferenciación $\alpha_x\beta_2$ está presente en los neutrófilos y los monocitos y tiene como ligandos más importantes a ICAM-1, fibrinógeno y la proteína C_3b_i del sistema de complemento (Walzog, 2000).

Los leucocitos CD11/CD18 forman parte de una familia de glucoproteínas de superficie celular, consta de 4 heterodímeros que comparten una subunidad β en común (CD18) con una distinta subunidad α (CD11a, CD11b, CD11c y CD11d), llamadas integrinas. CD11c/CD18 SON expresadas en monocitos, macrófagos y subpoblaciones de células citotóxicas, es importante en la medición de varios tipos de interacciones adhesivas (Mazzone, 1995). Las integrinas CD11/CD18 se unen a ligandos específicos, los cuales permiten a las células polimorfonucleares localizar la superficie de su blanco mediante una firme adhesión, después de una fase reversible de rodamiento de polimorfonucleares mediado por selectinas a lo largo del endotelio activado, los polimorfonucleares son activados por mediadores solubles derivados del endotelio como el factor activador de plaquetas o IL-8 los cuales pueden regular la actividad de unión del ligando a la β_2 integrina (Diamond, 1994). En polimorfonucleares humanos la técnica de ELISA mostró que la activación de genes que requiere la tirosina cinasa dió como resultado un aumento en la producción y secreción de IL-8 y la IL-1 β biológicamente activa. Por el contrario induce producción del factor de necrosis tumoral α (TNF α) o IL-6, revelando que las β_2 integrinas median la expresión diferencial de citocinas proinflamatorias. En general los resultados que proporcionan evidencia de un vínculo funcional entre la coagulación y las respuestas inflamatorias pueden contribuir al reclutamiento y activación de polimorfonucleares y otras células en los sitios de la lesión (Walzog, 1999). El antígeno CD11c (integrina α_x /antígeno de superficie linfocitaria P150), es una integrina transmembranaria expresada principalmente por monocitos, macrófagos y Células Natural Killer (NK), y en menor medida por granulocitos, células dendríticas y algunos subgrupos de células T y B. Este AcM fue designado clouster de diferenciación durante la 3^{ra} International HLDA workshop en Oxford, INGLATERRA EN 1986. (Cobbold, 1987).

3. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica de análisis cuantitativo de células individuales. El citómetro de flujo fue desarrollado en los años de 1970, y rápidamente se convirtió en un instrumento esencial para las ciencias biológicas (Scheffold, 2000). El citómetro de flujo es un instrumento que evalúa las características físicas y químicas de células individuales y otras partículas en el mismo rango de tamaño, a medida que pasan individualmente en una corriente de fluidos a través de un dispositivo de medición y el punto de detección iluminado por una luz incidente (Kaleem, 2006). La técnica de análisis de las células individuales de un canal de fluidos fue descrito por Wallace Coulter en los

años de 1950 y aplicado al recuento automático de células sanguíneas, la evolución posterior en los campos de la informática, la tecnología laser, la producción de anticuerpos monoclonales, la citoquímica, y la química de fluorocromos condujo al desarrollo del citómetro de flujo dos décadas después. Las suspensiones de células individuales o partículas son necesarias para el análisis de citómetro de flujo, diversas tinturas inmunofluorescentes o anticuerpos se pueden unir al antígeno o proteína de interés, la suspensión de células o partículas se aspira dentro de una celda donde rodeados por un pequeño flujo de líquidos, las células pasan de una en una a través de un rayo laser. Cuando la luz absorbida impacta a la célula, esta es absorbida a la longitud de onda adecuada puede ser re-emitida como fluorescencia si la célula contiene una sustancia fluorescente natural o uno o más anticuerpos marcados con fluorocromos que se unen a la superficie o interior de las estructuras celulares, la dispersión de la luz depende de la estructura interna de la célula y su tamaño y forma, las sustancias fluorescentes absorben la luz a determinadas longitudes de onda y re-emiten luz a diferente longitud de onda (Riley, 1993). En el citómetro de flujo las células se interceptan individualmente con un rayo láser y a través de tres tipos de detectores que proporcionan información sobre sus características físicas y sobre la fluorescencia que emiten cuando se han conjugado con anticuerpos monoclonales marcados. Estos tres detectores son: 1) forward scatter, dispersión delantera que informa del tamaño de la célula; 2) side scatter, dispersión lateral que se relaciona con los gránulos y la complejidad celular, y 3) detectores para fluorescencia, generalmente tres, que captan longitudes de onda correspondientes al verde, fluoresceína al rojo, ficoeritrina y a un tercer fluorocromo rojo-texas, rodamina, etc (Sampalo-Lainz.1992). La señal producida como consecuencia de la excitación del fluorocromo, permite conocer el porcentaje de células reconocido por el anticuerpo monoclonal empleado. Como consecuencia se observan imágenes en dos dimensiones, Dot-plot, o en una dimensión, Histograma, en las que se distinguen las diferentes poblaciones celulares marcadas, los impulsos eléctricos resultantes están digitalizados y los datos se almacenan, analizan y muestran a través de un sistema informático (Riley, 1993). El estudio de agregación de neutrófilos estuvo predominantemente limitado a la medición de la transmisión de luz a través de suspensiones de neutrófilos, hasta que fue generalmente aceptado que los aumentos en la transmisión de la luz era una medida de la agregación de neutrófilos y la subsecuente disminución implica una desagregación de neutrófilos. Hoy en día la transmisión de la luz continua siendo la técnica más comúnmente usada para estudiar la agregación de los neutrófilos, sin embargo, se ha demostrado que los cambios en la transmisión de luz pueden ocurrir

en ausencia de cambios en la agregación celular y se ha sugerido que la respuesta de transmisión de luz se debe a fenómenos celulares asociados con la activación celular en lugar de la agregación (Rochon, 1991).

4. TRACTO RESPIRATORIO

El aparato respiratorio es el sistema de nuestro cuerpo que lleva el aire que respiramos hacia nuestro interior para hacer posible el crecimiento y la actividad. El aparato respiratorio está constituido por los pulmones y los conductos que transportan el aire desde el exterior hacia ellos, es decir, las vías respiratorias y estas se dividen en altas o superiores y en bajas o inferiores, las vías superiores son aquellas situadas por encima de la tráquea: nariz, faringe y laringe, las vías respiratorias inferiores están por debajo de dicho nivel y comprenden: la tráquea, los bronquios y los alvéolos (Lépori, 2009). Las vías aéreas superiores juegan un papel crucial en la fisiología respiratoria, ellas filtran las partículas inhaladas en función de su tamaño, densidad y características físicas. Se ha planteado, que las partículas menores a 10 μm , como la mayoría de los gérmenes patógenos, pueden pasar esta defensa física, lo cual no suele ocurrir en condiciones fisiológicas adecuadas. La nasofaringe presenta formaciones, como las amígdalas y adenoides, con capacidad para activar mecanismos inmunológicos de defensa. Ellas son parte del sistema linfático defensivo del organismo. Existen otros mecanismos reflejos como el estornudo y la tos, que permiten la eliminación de gran cantidad de secreciones y microorganismos que se depositan en la nasofaringe. Otro mecanismo de defensa importante lo constituye el sistema mucociliar, formado por el epitelio ciliar, que tapiza la vía aérea desde la nariz hasta los bronquiolos; y por el moco, que recubre a los cilios y que es secretado por las células caliciformes y las submucosas del epitelio de la vía aérea. Los cilios transportan al moco que contiene las partículas inertes o biológicas atrapadas hacia la laringe para su deglución, exhalación o expectoración. La disfunción de algún componente del sistema respiratorio, origina una disminución del aclaramiento del moco, y permite que las bacterias que en él se encuentran, prolonguen el tiempo de contacto con el epitelio respiratorio, creándose condiciones favorables para la colonización bacteriana de las vías aéreas que, en condiciones normales, son estériles (Tortora, 2002).

4.1 INFECCIONES RECURRENTE DE LAS VIAS RESPIRATORIAS

Muchos agentes infecciosos son potencialmente capaces de provocar infecciones respiratorias. Los virus representan los microorganismos que más comúnmente participan en las infecciones del tracto respiratorio, afectando tanto las vías respiratorias altas como las bajas. Sin embargo, también las bacterias pueden estar involucradas en infecciones de las vías respiratorias. Las bacterias mas usualmente aisladas en las infecciones respiratorias son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Haemophilus influenzae* (Lépori, 2009). La noción de infección recurrente implica que el niño sufre de infecciones con mayor frecuencia, que se percibe como si tuviera más infecciones que un niño sano. Esto se relaciona con el concepto que tienen los padres de lo que es normal y del número aceptable de infecciones en los niños, lo cual lleva a que las consultas relacionadas con la inmunología y las enfermedades infecciosas sean una parte fundamental del ejercicio médico. En este sentido, por lo general, se espera que los niños sanos presenten de seis a diez episodios separados de infecciones virales del tracto respiratorio durante el transcurso de un año (Reyes, 2007). Los factores de riesgo de infecciones respiratorias frecuentes son: carencia de lactancia materna, exposición a irritantes como el humo del tabaco, edad, vida social activa (guardería o colegio, etc), pobreza, deficiencia o inmadurez del sistema inmunológico, deficiencia de hierro, contaminación ambiental, uso indiscriminado de antibióticos, atopia etc., que suponen una agresión a las defensas de las vías superiores y facilitan la colonización crónica (Broide *et al.* 2008; Spahn *et al.* 2008).

Desde el 1 de Enero hasta el 3 de octubre del 2009, en todo el país se habían reportado 21 538 466 casos de Infecciones Respiratorias. De todos los casos, 9 578 952 se presentan en el sexo masculino (44%) y 11 959 514 en el femenino (56%). El grupo de edad más afectado es el de los menores de un año, incidencia de 98 281.6 por 100, 000 habitantes, y seguido del de niños de 1 a 4 años de edad, incidencia de 57,099.7 por 100, 000 habitantes. Durante el mismo período, en 2008 se registraron 16 754 304 casos, 4 784 162 menos que en 2009, lo que representa un incremento de 22.2 % casos de infecciones respiratorias en comparación con el año anterior (Secretaria de salud 2009). Aunque en las estadísticas de morbilidad según el sector salud, las infecciones de vías respiratorias altas no son la principal causa de mortalidad, sino la primera causa de consultas en la atención primaria de salud. En los umbrales del siglo XXI los niños de América aún mueren en proporciones alarmantes por causas prevenibles con medidas relativamente simples. Más de 140 000 niños menores de 5 años mueren anualmente por neumonía en nuestra región; cada 8 segundos

fallece un niño por infecciones recurrentes de las vías respiratorias altas (IRVRA) y esto constituye la primera causa de consulta y hospitalización en edades pediátricas. Estas cifras por sí solas hacen comprender la necesidad de programas para su control (Álvarez et al. 2008). Estas infecciones, que en su mayoría tienen evolución favorable, ayudan a desarrollar el sistema inmunológico de los niños, aunque para la familia representan motivo de preocupación y ansiedad, sobre todo, cuando son recurrentes. El número de infecciones no establece diferencias entre el desarrollo inmune normal y las causas predisponentes o inmunodeficiencias, de modo que es fundamental la historia clínica y el examen físico completo que orienten el diagnóstico y estudio de cada paciente. En muchos niños, la repetición de estos procesos no es más que una manifestación de la atopia. Para algunos autores, los niños presentan entre 6 y 10 episodios de IRVRA por año, que son en su mayoría, leves y auto limitadas, pero representan un trabajo enorme para los servicios de salud (Álvarez et al. 2008). Dentro de este grupo nosológico de IRVRA tenemos: Otitis media aguda, Amigdalitis y faringoamigdalitis, Rinosinusitis Adenoiditis, Sinusitis. Uno de los representantes de este tipo de enfermedades es el resfriado común o nasofaringitis (rinosinucitis aguda), que se caracteriza por ser una infección viral de la mucosa de las vías respiratorias altas (Spahn *et al.* 2008).

4.2 NEUTRÓFILOS EN LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

El sistema respiratorio está expuesto continuamente a una variedad de bacterias. Para luchar contra los agentes patógenos el sistema inmune proporciona una protección inicial contra los microorganismos y estimula la respuesta de la inmunidad adaptativa, la integridad de las vías respiratorias se basa fundamentalmente en una estricta regulación de los aparatos de defensa del hospedero. En el tracto respiratorio el epitelio de las vías respiratorias es el primer punto de contacto para las sustancias inhaladas tales como contaminantes del medio ambiente, humo de cigarro, alérgenos, microorganismos, etc. Las vías respiratorias no solo proporcionan una función de barrera pasiva, sino que también contribuyen de forma activa al sistema inmune innato. El epitelio de las vías respiratorias tras una exposición bacteriana responde aumentando sus defensas, esta respuesta consiste en un incremento en la liberación de antimicrobianos, liberación de quimiocinas y citoquinas en la submucosa que inician una reacción inflamatoria, esta reacción incluye el reclutamiento de neutrófilos que sirven para eliminar microorganismos, que es uno de los más importantes componentes de la respuesta inmune innata contra las infecciones bacterianas del

tracto respiratorio (Bals, 2004). La acumulación eficiente de neutrófilos en el sitio del daño es de gran importancia para inducir una respuesta inmune adaptativa exitosa en el huésped. El secuestro de neutrófilos en el sitio de infección, es un mecanismo esencial de defensa antibacteriana en los pulmones que consiste en varios pasos, incluida la activación de factores de transcripción, la producción de quimiocinas, el aumento de moléculas de adhesión celular y la mejora de interacciones célula-célula. Los neutrófilos son mediadores celulares por la respuesta inmune innata contra bacterias en los pulmones determinando el resultado de la infección ya que un reclutamiento de neutrófilos insuficiente puede llegar a ser un peligro para la vida del huésped mientras que una acumulación extrema de los neutrófilos puede ocasionar una lesión pulmonar asociado con la inflamación (Craig, 2009).

5. INMUNOTERAPIA

Algunos de los tratamientos o estrategias que han mejorado a las personas que padecen infecciones recurrentes de las vías respiratorias, se han basado en el uso de bacterias y extractos de bacterias para la inmunoterapia (Nelson, 2005; Akdis, 2007). Esta opción terapéutica está teniendo un desarrollo importante gracias a descubrimientos en los cuales moléculas originarias de microorganismos pueden ser reconocidas como receptores muy específicos expresados en diferentes estirpes celulares (Bocaccio *et al.* 2002), así también de las rutas de señalización que son activadas e involucradas en la respuesta celular, lo cual ha generado una nueva era de inmunoterapia, en el que se usan moléculas miméticas de sus originales en bacterias (Bocaccio *et al.* 2002) o se utilizan fracciones inmunogénicas derivadas de los microorganismos. Algunos de los potenciales tratamientos o estrategias que están permitiendo tratar a las personas que padecen infecciones recurrentes de las vías respiratorias, es la inmunoterapia antiinfecciosa de estimulación basada en las propiedades inmunogénicas de los ribosomas bacterianos y las propiedades inmunoestimulantes de las fracciones membranas (Nelson *et al.* 2005; Akdis, 2007). La administración de extractos bacterianos actúa como inmunoestimulantes con el objetivo de incrementar la defensa inmune de las vías aéreas, esto pudiera evitar o retardar el desarrollo de una enfermedad crónica o la exacerbación de algunas enfermedades crónicas como el asma. En condiciones *in vitro* los extractos bacterianos son capaces de estimular funciones efectoras de macrófagos y linfocitos para activar a las células natural killer así como inducir la liberación de citoquinas de células mononucleadas de la sangre periférica (Lusuardi, 1993). En la práctica diaria, por lo general la eficacia de la

inmunoterapia se comprueba por la reducción de los síntomas de la enfermedad que precisó el tratamiento específico y/o por haber disminuido la necesidad de utilizar medicamentos para combatir los síntomas, lo cual representa un ahorro por concepto de reducción del uso de antimicrobianos y antiinflamatorios (Muñoz, 2003).

5.1 ADYUVANTES

En 1976 Edward Jenner dió un salto enorme en la lucha contra las enfermedades infecciosas al demostrar la capacidad que posee el ser humano de desarrollar una respuesta protectora frente a una infección, la vacunación profiláctica es una de las estrategias de salud pública con mayor impacto que ha permitido el control e incluso la erradicación de múltiples enfermedades infectocontagiosas. La inmunización implica el reconocimiento de una parte del antígeno que induce una respuesta inmune efectora y de memoria, para lograrlo se han utilizado diferentes tipos de vacunas, compuestas por microorganismos vivos atenuados, patógenos replicativos y no replicativos, patógenos inactivados o sus subunidades. Las más seguras para ser utilizadas en humanos son aquellas que contienen patógenos inactivados o sus subunidades, debido a que carecen de virulencia. Sin embargo, estas vacunas tienen menos inmunogenicidad que las replicativas por lo cual es necesario el uso de una sustancia adyuvante para inducir una respuesta inmune adecuada (Franco, 2004). Los adyuvantes son sustancias con actividad inmunopotenciadora, constituyen una familia muy heterogénea, y son utilizados para incrementar la respuesta inmune a vacunas no replicativas. A los adyuvantes se les atribuyen dos funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer, y por otra parte la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas. Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos que incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune (Morris, 1999): incrementando la inmunogenicidad de los antígenos, y aumentando la velocidad y duración de la respuesta inmunológica (Franco, 2004). Durante varios años se ha evaluado la actividad adyuvante de cientos de componentes sintéticos y naturales; sin embargo pocos de ellos son aceptados para su uso en humanos, debido a sus efectos tóxicos, al estrecho margen de seguridad y a la inducción de reacciones alérgicas e inflamación. Adicionalmente los adyuvantes deben ser: biodegradables, estables, de fácil fabricación, bajo costo, aplicables a una amplia gama de vacunas, de administración sencilla y seguros para aplicarse a pacientes inmunocomprometidos. Durante décadas se han utilizado fracciones de microorganismos

como adyuvantes inmunológicos sin que se conociera su mecanismo de acción, no obstante ahora se postula que tales fracciones poseen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los peptidoglicanos de bacterias gram positivas y los lipopolisacáridos de bacterias gram negativas son ejemplos de este tipo de moléculas. Los PAMPs se caracterizan por su habilidad de activar células del sistema inmune innato (Franco, 2004). La inmunidad innata se basa en el reconocimiento de estructuras de patógenos conservadas a través de la evolución denominadas PAMPs que interactúan con los receptores de reconocimiento (PPR) que se expresan en las células de los cuales se destacan la familia de receptores tipo Toll (TLRs). A partir del reconocimiento de los PAMPs, los PPR presentes en la superficie celular o intracelular de la señal del sitio de infección, se desencadena una respuesta antimicrobiana mediante la activación de varias vías de señalización intracelular, incluyendo moléculas adaptadoras, quinasas y factores de transcripción. Los PPR inducidos por las vías de transducción de señales dan resultado a la expresión genética y la síntesis de una amplia gama de moléculas, incluyendo citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular e inmunorreceptores que en conjunto orquestan la respuesta del huésped a la infección temprana y a la vez representan un importante vínculo con la respuesta inmune adaptativa (Mogensen, 2009).

5.2 RIBOSOMAS BACTERIANOS

Los Ribosomas son organelos cuya función es “leer” el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para fabricar proteínas, están formados por 55 proteínas ribosomales y 3 tipos de ARN. En los años 50s, los investigadores comenzaron a estudiar el potencial antigénico de los elementos citoplasmáticos de las bacterias. Youmans y Youmans aislaron sistemáticamente diferentes fracciones subcelulares de preparaciones atenuadas de *Mycobacterium tuberculosis* y en 1965 establecieron que en los ratones 1µg de ribosomas protegía al animal tanto como 1mg de bacterias vivas atenuadas (Youmans, 1965).

Los inmunoestimulantes ribosomales son eficaces en la prevención y en la reducción de las infecciones del tracto respiratorio en niños (Bellanti, 2003). Los ribosomas bacterianos, con ayuda de los proteoglicanos de membrana, tienen un efecto inmunoestimulante específico y no específico; actúan en forma simultánea sobre diversos sistemas inmunológicos del cuerpo movilizándolo todas las defensas y combatiendo la infección (Michel et al. 1978), sin embargo, su administración ha sido más empírica ya que sus bases inmunológicas y clínicas no han sido muy difundidas. La prevención es decisiva, sobre todo en microorganismos con altos índices de mutaciones como la influenza, en virtud

de la importancia de romper los ciclos de contagio en las poblaciones (Quezada, 1999). Aunque las infecciones del tracto respiratorio son generalmente leves y autolimitadas, en ocasiones pueden complicarse y terminar en sinusitis, otitis media e infecciones broncopulmonares. Estas infecciones pueden también ser recurrentes o crónicas e incapacitantes ocasionando dificultades terapéuticas. Los agentes etiológicos responsables de estas infecciones no siempre son fácilmente identificables, bacterias (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*) y virus los cuales son los agentes causantes más frecuentes. La mayoría de los episodios de infecciones se tratan con cursos repetidos de antibacterianos, su uso no es eficaz en infecciones virales, por lo que un mal tratamiento de estas infecciones no previene la recurrencia y lleva a la aparición de cepas resistentes a antibacterianos (Bellanti, 2003).

En un metaanálisis se documentó una reducción del número de infecciones respiratorias agudas respecto al grupo con placebo, sólo Ribovac y OM-85?? (Paupe, 1991), en forma global y en México, demostraron tener efecto significativo en la reducción del número de infecciones respiratorias agudas (de la Torre *et al.* 2005). Los Ribosomas, son acarreadores naturales de inmunogenicidad celular, y son vectores de epítopes que corresponderían a antígenos encontrados en la superficie de las bacterias (Bellanti *et al.* 2003). La antigenicidad a los sitios antigénicos de los ribosomas es equivalente a los producidos directamente en la superficie bacteriana, protegiendo al cuerpo contra bacterias. Los Ribosomas son altamente conservados a través de las especies de microorganismos y por lo tanto es posible que se presente una protección cruzada entre diferentes serotipos. En base a las aplicaciones del concepto de los ribosomas, partiendo de los trabajos de Youmans sobre la capacidad protectora de los Ribosomas, es entonces que los Laboratorios Pierre Fabre (AÑO) estudiaron estas propiedades por su potencial terapéutico y particularmente por la prevención y el tratamiento de infecciones recurrentes del tracto respiratorio. Es deseable que las preparaciones terapéuticas basadas en ribosomas bacterianos sean acarreadores de epítopes específicos para estimular la producción de anticuerpos específicos, y sean adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad. Se ha considerado también que son adyuvantes naturales los proteoglicanos de membrana, aislados de *Klebsiella pneumoniae*, y que están presentes en Ribovac® porque potencian la inmunogenicidad de las fracciones ribosomales. Estos proteoglicanos incluso tienen muchas propiedades inmunoestimulantes (Donnelly *et al.* 1990).

5.3 RIBOVAC

Las infecciones recurrentes del tracto respiratorio en los niños constituyen un grave problema a nivel mundial, algunos niños experimentan una considerable morbilidad como consecuencia de infecciones del tracto respiratorio y por recibir repetidamente antibacterianos que no son eficaces contra los agentes infecciosos y puede aumentar la resistencia bacteriana (Bousquet, 2006). Las infecciones recurrentes del tracto respiratorio son el resultado de un desequilibrio entre los mecanismos de defensa pulmonar y la carga bacteriana. Los tratamientos antibacteriales temporalmente pueden restaurar el equilibrio entre el hospedero y la carga bacteriana, pero no previenen las infecciones respiratorias (Bousquet Y Oliveri, 2006). Con base en reportes de investigación, el efecto inmunoestimulante en el sistema respiratorio puede resultar favorable a la inmunidad específica e inespecífica de los pacientes con infecciones respiratorias recurrentes (Varela, 2009). En el año de 1965 se inicio el estudio del efecto de las fracciones ribosomales en la estimulación inmunológica, con el trabajo de Youmans y Youmans (Hoops et al.1976; Akdis, 2007). En la década de los noventa se registro el mayor número de estudios sobre extractos de algunas bacterias y su repercusión en la salud de diferentes grupos de población (Varela, 2006). La inmunoestimulación ribosomal es una opción de inmunoterapia antiinfecciosa basada en la activación de células inmunocompetentes que aumenta la respuesta inmune específica y la no específica (en particular del sistema de defensa de las mucosas), en contra de patógenos del tracto respiratorio. La actividad inmunomoduladora del componente ribosomal se atribuye a la presencia de epítopes altamente purificados a partir de fracciones celulares obtenidas por lisis bacteriana. (Pregliasco, 2009).

Ribovac[®] es un inmunoestimulante que fue desarrollado y comercializado en la década de 1980 en Francia y posteriormente ha sido puesto a disposición en un gran número de países (Portalés, 2006) la formulación se compone de proteoglicanos de *Klebsiella pneumoniae* y de los ribosomas de cuatro de las cepas bacterianas más comunes en las infecciones recurrentes del tracto respiratorio: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, contenidos en una membrana de proteoglicanos obtenida de *Klebsiella pneumoniae*. Con la combinación de estos extractos se consigue activar a los macrófagos, polimorfonucleares, células natural killer y elevar las concentraciones de anticuerpos específicos (IgA, IgM e IgG) en contra de bacterias que componen Rybovac[®] (Michael, 1991), generando una respuesta inmunológica específica e inespecífica que refuerza la inmunidad innata para contrarrestar

la aparición de infecciones, teniendo un efecto de inmunidad cruzada; es decir, protección en contra de serotipos de bacterias diferentes a las contenidas en el extracto. A la fecha, se cuenta con reportes de estudios doble ciego en metanálisis que demuestran la reducción en número y gravedad de las infecciones respiratorias en pacientes que reciben inmunoterapia ribosomal (Varela, 2006; Bousquet, 2006). Ribovac[®] es eficaz en la prevención y la reducción de la parte superior e inferior de infecciones del tracto respiratorio, también tiene un impacto en la reducción del desarrollo de resistencia bacteriana, sin embargo, su administración ha sido más bien empírica ya que sus bases inmunológicas y clínicas no han sido muy estudiadas (Bousquet, 2006). Otro efecto en el sistema inmunitario de los antígenos contenidos en este inmunoestimulante, es la inducción directa de las células B maduras, donde las células T participan en la respuesta antigénica. Los antígenos TI-2 favorecen la rápida producción de anticuerpos y la ingestión de bacterias capsuladas, que al recubrir las se favorece su digestión (Varela, 2006), mientras que los proteoglicanos de *Klebsiella pneumoniae* son capaces de inducir varios efectos *in vitro* e *in vivo* sobre la respuesta inmune no específica incluyendo fagocitosis, quimiotaxis, adhesión, e incluso la actividad de células NK (Clot, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Resulta importante desde el punto de vista clínico-farmacológico evaluar los mecanismos de la respuesta inmune celular inducidos luego de la administración de Ribovac[®], puesto que aun no se conoce el impacto de Ribovac[®] sobre la expresión de moléculas de adhesión que son importantes para explicar la estimulación que este ejerce sobre la adhesión de linfocitos humanos. Lo cual es importante para la eliminación de agentes patógenos y la regulación de la respuesta inflamatoria.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones respiratorias son la principal causa de consulta en edades pediátricas. En grupos de niños que no responden al tratamiento con antibióticos y las infecciones recurren en periodos cortos es necesario usar inmunoestimulantes como Ribovac® para: reducir el número de infecciones respiratorias, reducir los costos de la terapia y disminuir el número de visitas a los servicios de urgencias.

HIPOTESIS

Las moléculas CD_{11c} y CD₁₀₃ se sobreexpresan en neutrófilos activados por Ribovac[®].

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta celular inducida por Ribovac® en neutrófilos DE QUE?.

OBJETIVO ESPECIFICO

Evaluar el efecto de Ribovac® sobre la expresión de moléculas de adhesión CD_{11c} y CD₁₀₃ en neutrófilos humano de sangre periférica.

MATERIAL Y MÉTODOS

PRUEBAS DE LABORATORIO

1. Obtención y separación de células polimorfonucleares.

La separación de células polimorfonucleares (PMN) se realizó por el método de selección Ficoll-Paque (Amersham Biosciences), con gradiente de densidad 1,113. Se colocaron todas las soluciones a temperatura ambiente, se obtuvieron 10 ml de sangre periférica de donante sano en tubo con EDTA, anticoagulante, se mezcló cuidadosamente y se pasó a un tubo cónico el cual contenía 10 ml de la solución de medio RPMI 1640 + SFBI al 10% obteniendo una dilución 1:2, esta dilución se colocó cuidadosamente gota a gota en un tubo cónico, el cual ya contenía 10 ml de ficoll-paque con gradiente 1.113. Posteriormente se centrifugó a 500g (1667rpm) durante 30 min a 4°C (centrífuga refrigerante eppendorf-centrifuge 5804 R). Después de la centrifugación se observaron 2 bandas de leucocitos separados por una interfase, la banda superior a la interfase constaba de células mononucleadas mientras que la banda inferior a la interfase estaba compuesta por neutrófilos. Los neutrófilos se separaron con ayuda de una micropipeta de 1ml, extrayendo en primer instancia las fases superiores y desechándolas hasta llegar a la fase de los neutrófilos los cuales fueron colocados en otro tubo cónico donde fueron lavados en 2 ocasiones con 10 ml de solución PBS (amortiguador de fosfato de potasio 0.015 M PH 7.4), en cada lavado fueron centrifugados a 400g (rpm) durante 10 minutos, por último fueron resuspendidos en 4.5 ml de RPMI 1640 + SFBI 10%. Toda la preparación de la obtención y separación de neutrófilos se realizó en campana de Bioseguridad, Clase II (CLASSII BSC, ESCO, EUA).

2. Determinación de la viabilidad de neutrófilos por método de exclusión con azul de tripano al 4%.

Esta prueba de exclusión refleja la integridad de la membrana plasmática, ya que colorantes como el azul de Tripano no pasan a través de la membrana íntegra en las células vivas. Se determinó la viabilidad celular en un hemocitómetro por el porcentaje de células teñidas de azul, muertas contra el porcentaje de células no teñidas, vivas.

En un vial se colocaron 20 μL de la suspensión celular y 20 μL del colorante azul de tripano 4% se mezcló cuidadosamente y se tomó una alícuota de 15 μL y se colocó en un hemocitómetro (cámara de Newbauer) y se observó en microscopio óptico a 10x., Se aceptó una viabilidad celular ≥ 95 para las mediciones propuestas. La suspensión celular se ajustó a una concentración final de 2×10^5 cel/100 μL .

3. Obtención del cultivo de células polimorfonucleares activadas por Ribovac y componentes de la preparación.

Los neutrófilos se sembraron en cajas estériles de 96 pozos de fondo (Sarstedt, Inc. Newton, NC 28658, USA), 2×10^5 células/100 μL por pozo. Las células se trataron con el producto comercial (Ribovac[®]), el volumen que se adicionó de fracciones ribosomales bacterianas fue de 100 μL /pozo en concentraciones finales de 62.5 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$. Las células se incubaron durante 4 y 6 horas a 37°C en una incubadora (CO₂ Incubator – SHEL LAB) con atmósfera de CO₂ al 5%. El control negativo consistió en neutrófilos no tratados con la suspensión de las fracciones ribosomales bacterianas.

4. Detección de la expresión de CD11c y CD103 en neutrófilos.

Los cultivos celulares se detuvieron a las 4 hr y 6hr y se trasladaron en tubos eppendorf de 1 mL para posteriormente leer en un citómetro (Epics xcl) tomando 75 μL de LAS células+15 μL del Anticuerpo monoclonal correspondiente CD11c y CD103 (IOTest[®]3, Beckman Coulter, EUA). Posterior a la incubación durante 30 min se llevó a cabo la lectura.

PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO

Se analizaron los datos en el programa winMDI 2.8 (Software para análisis de citometría de flujo), se organizaron los datos en el programa Microsoft Excel y programa estadístico SPSS versión 18.0. Los procedimientos estadísticos descriptivos e inferenciales que se emplearon incluyeron porcentajes, medias, desviación estándar y error estándar. Se usó una prueba “t” de student para comparar las medias relacionadas y se aceptó un intervalo de confianza $\geq 95\%$ con una significancia de 0.05.

CULTIVO CELULAR

Actualmente se entiende por cultivo celular al **conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas**. En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular). Esto es cierto completamente sólo para algunas líneas celulares para las que se han definido los denominados medios definidos. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman, y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Las células en cultivo de una línea celular, cultivo primario propagado, o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación. Los cultivos celulares suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo. Es diferente el coste de investigación de un nuevo fármaco para la empresa farmacéutica que está desarrollando moléculas si ha de sintetizar de cada una de las que ha de probar en cantidades del orden del gramo, para el estudio en animales, a que baste con pocos miligramos (CITA).

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE CD103

En los experimentos en los cuales se incubo el anticuerpo monoclonal para CD103 observamos un incremento en la expresión en los neutrófilos al ser tratados con Ribovac®. Este aumento fue máximo en células tratadas por 6 horas con 125 µg/mL de Ribovac®.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión de CD103 entre neutrófilos no tratados y los tratados por 6 horas con 500 µg/ml de Ribovac®, $P = 0.034$, entre neutrófilos tratados con 125 µg/ml por 4 horas y 125 µg/ml por 6 horas, $P = .014$ y entre neutrófilos tratados con 62.5 µg/ml por 4 horas y neutrófilos tratados con 125 µg/ml 6 horas, $P = 0.017$. Véase Figura 5.

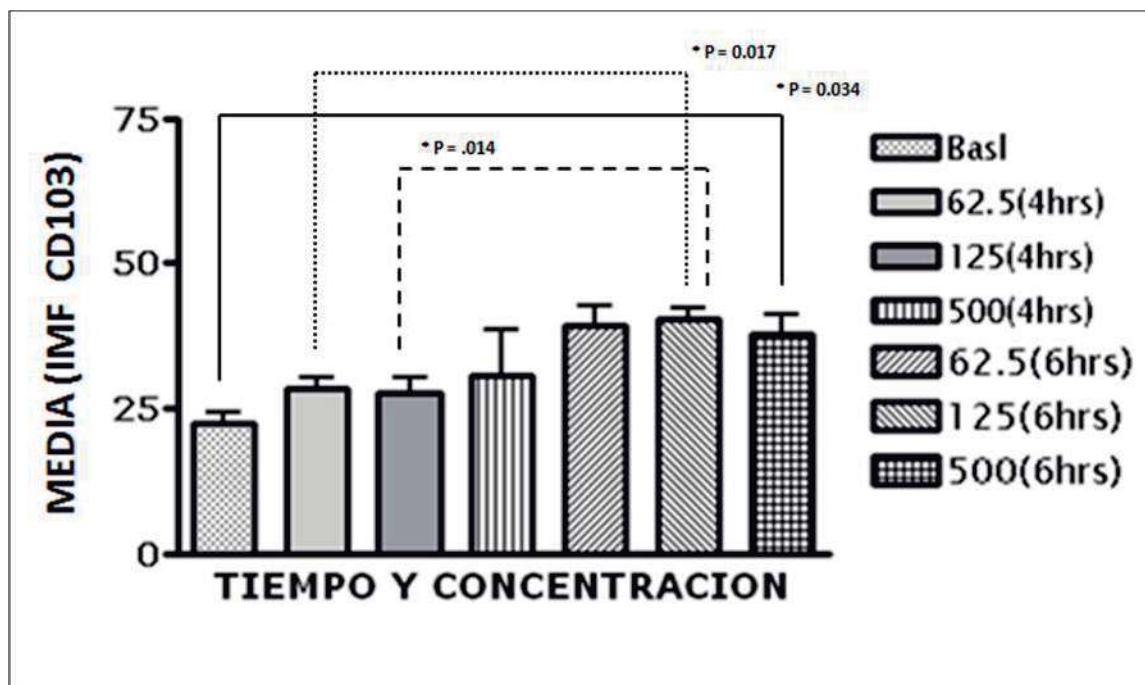


FIGURA 5. Expresión de CD103 en neutrófilos tratados con concentraciones variables de Ribovac® por 4 y 6 horas. La expresión de CD103 se determinó en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF).

TABLA 3. Valores de significancia en la comparación de muestras relacionadas para CD103 en sus diferentes tiempos y concentraciones.

COMPARACIÓN DE MUESTRAS RELACIONADAS	SIGNIFICANCIA (P)
CD103 (basal) VS CD103 (62.5, 4hs)	.111
CD103 (basal) VS CD103 (125, 4hs)	.228
CD103 (basal) VS CD103 (500, 4hs)	.414
CD103 (basal) VS CD103 (62.5, 6hs)	.185
CD103 (basal) VS CD103 (125, 6hs)	.112
CD103 (basal) VS CD103 (500, 6hs)	.034
CD103 (62.5, 4hs) VS CD103 (125, 4hs)	.467
CD103 (62.5, 4hs) VS CD103 (500, 4hs)	.762
CD103 (62.5, 4hs) VS CD103 (62.5, 6hs)	.136
CD103 (62.5, 4hs) VS CD103 (125, 6hs)	.017
CD103 (62.5, 4hs) VS CD103 (500, 6hs)	.283
CD103 (125, 4hs) VS CD103 (500, 4hs)	.607
CD103 (125, 4hs) VS CD103 (62.5, 6hs)	.103
CD103 (125, 4hs) VS CD103 (125, 6hs)	.014
CD103 (125, 4hs) VS CD103 (500, 6hs)	.318
CD103 (500, 4hs) VS CD103 (62.5, 6hs)	.629
CD103 (500, 4hs) VS CD103 (125, 6hs)	.604
CD103 (500, 4hs) VS CD103 (500, 6hs)	.998
CD103 (62.5, 6hs) VS CD103 (125, 6hs)	.573
CD103 (62.5, 6hs) VS CD103 (500, 6hs)	.842
CD103 (125, 6hs) VS CD103 (500, 6hs)	.608

El tiempo de tratamiento fue importante en la expresión de CD103, porque esta fue superior a las 6 horas de tratamiento de los neutrófilos con Ribovac[®] que a las 4 horas. ($P = .002$).

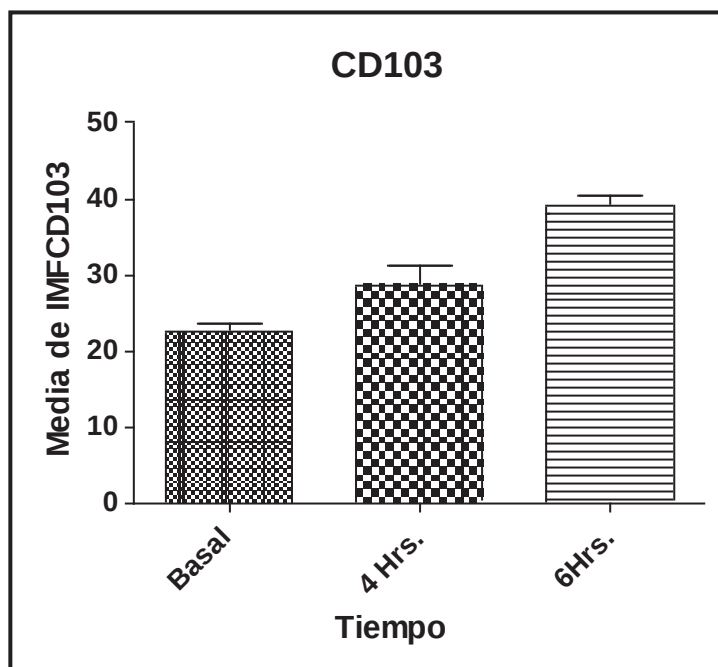


FIGURA 6. Expresión de CD103 en neutrófilos tratados con Rivovac[®] en un tiempo de 4 horas y 6 horas.

EXPRESIÓN DE CD11c

En los experimentos en los cuales se incubo el anticuerpo apara cd11c Ribovac[®] aumentó la expresión de éste. El cambio fue máximo en neutrófilos tratados con 500 µg/ml de Ribovac[®] por 6 horas respecto a células no tratadas, $P = .006$. También se encontró un aumento significativo de la expresión de CD11c respecto a los niveles basales en neutrófilos tratados con 125 µg/ml de Ribovac[®] por 6 horas ($P = .017$).

La expresión de CD11c fue también mayor al comparar neutrófilos tratados con 500 µg/ml de Ribovac[®] a las 6 horas que en neutrófilos tratados con la misma concentración de Ribovac[®] por 4 horas. ($P = 0.030$). Véase Figura 7

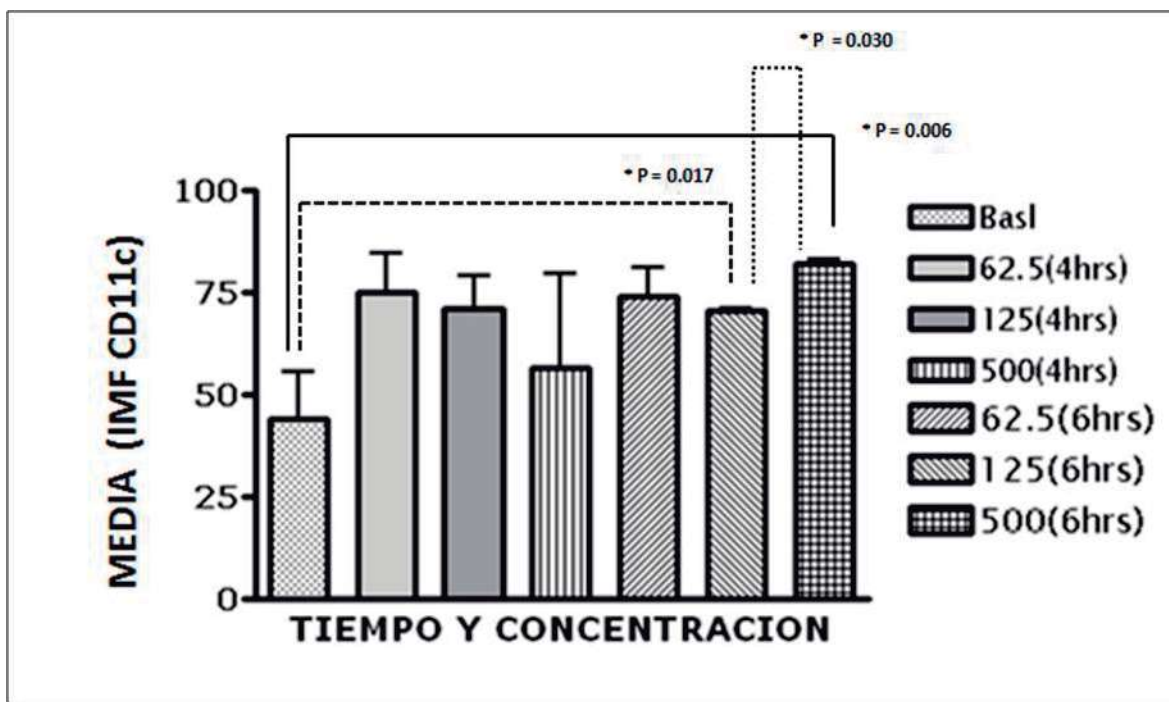


FIGURA 7. Expresión de CD11c en neutrófilos tratados con concentraciones variables de Ribovac[®] por 4 y 6 horas. La expresión de CD11c se determinó en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF).

CD11c (basal) vs CD11c (62.5, 4hs) $P = .282$

TABLA 4. Valores de significancia en la comparación de muestras relacionadas para CD11c en sus diferentes tiempos y concentraciones

COMPARACIÓN DE MUESTRAS RELACIONADAS	SIGNIFICANCIA (P)
CD11c (basal) VS CD11c (62.5, 4hs)	.282
CD11c (basal) VS CD11c (125, 4hs)	.301
CD11c (basal) VS CD11c (500, 4hs)	.746
CD11c (basal) VS CD11c (62.5, 6hs)	.078
CD11c (basal) VS CD11c (125, 6hs)	.017
CD11c (basal) VS CD11c (500, 6hs)	.006
CD11c (62.5, 4hs) VS CD11c (125, 4hs)	.299
CD11c (62.5, 4hs) VS CD11c (500, 4hs)	.303
CD11c (62.5, 4hs) VS CD11c (62.5, 6hs)	.416
CD11c (62.5, 4hs) VS CD11c (125, 6hs)	.080
CD11c (62.5, 4hs) VS CD11c (500, 6hs)	.468
CD11c (125, 4hs) VS CD11c (500, 4hs)	.439
CD11c (125, 4hs) VS CD11c (62.5, 6hs)	.762
CD11c (125, 4hs) VS CD11c (125, 6hs)	.364
CD11c (125, 4hs) VS CD11c (500, 6hs)	.667
CD11c (500, 4hs) VS CD11c (62.5, 6hs)	.775
CD11c (500, 4hs) VS CD11c (125, 6hs)	.451
CD11c (500, 4hs) VS CD11c (500, 6hs)	.786
CD11c (62.5, 6hs) VS CD11c (125, 6hs)	.658
CD11c (62.5, 6hs) VS CD11c (500, 6hs)	.397
CD11c (125, 6hs) VS CD11c (500, 6hs)	.030

El tiempo de tratamiento fue importante en la expresión de CD11c, porque esta fue superior a las 6 horas de tratamiento de los neutrófilos con Ribovac[®] que a las 4 horas. Aunque en este análisis no se obtuvo un cambio estadísticamente significativamente ($P = .101$).

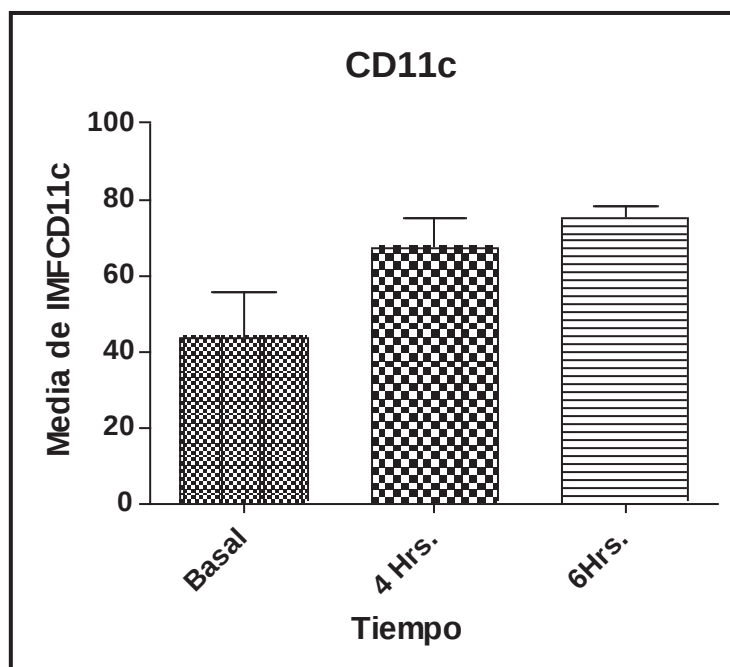


FIGURA. 8 Expresión de CD11c en neutrófilos tratados con Ribovac[®] en un tiempo de 4 horas y 6 horas.

DISCUSIÓN

Las integrinas son moléculas transmembranales esenciales para el desarrollo embrionario y la función inmunológica al unirse a una gran variedad de ligandos, incluyendo moléculas de la matriz extracelular y los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. La capacidad para reconocer específicamente motivos particulares de aminoácidos y regular la afinidad de unión a ellos reside en su estructura heterodimérica. Este diseño molecular incorpora una notable capacidad para dirigir cambios conformacionales que comienzan a darse en la cara citosólica, paralelamente para acoplar ligandos extracelulares a la parte interior de la célula, la forma “doblada” no se une al ligando y no lleva a cabo señalizaciones de afuera hacia adentro, las integrinas activas tienen una forma extendida, aunque en forma doblada pueden unirse a fibronectina. Diferentes conformaciones de las integrinas confieren diferentes grados de activación y de afinidad por los ligandos.

La agregación y/o adhesión de las β_2 integrinas se ha relacionado con la síntesis selectiva de proteínas proinflamatorias, entre ellas la IL-8 (Walzog, 1999). Esta quimioquina es un potente activador del estallido respiratorio y la migración de neutrófilos (Baggiolini, 1992; Cassatella, 1995). Se ha documentado que Ribovac® induce la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos (Luini, 1991; Pujol, 1991) de forma que estas citocinas pueden aumentar la expresión de las β_2 integrinas en neutrófilos *in vivo* cuando existe cooperación celular entre los monocitos y los neutrófilos. En estudios previos se ha constatado la capacidad de los monocitos y las plaquetas, de activar a los neutrófilos. Por otro lado citocinas como la IL-8 pueden ser producidas por los neutrófilos y convertirse en un regulador autocrino y paracrino de la expresión de las β_2 integrinas. En las condiciones de cultivo de neutrófilos activados con Ribovac®, cabe esperar que tanto los contactos entre neutrófilos como a través de factores solubles pueda inducirse la expresión de moléculas de adhesión.

También se ha documentado que Ribovac® aumenta la adhesión, la quimiotaxis y la migración de polimorfonucleares en pacientes que recibieron antimicrobianos. (Roques, 1991; Roques, 1992) Se ha señalado que este efecto puede estar mediado por la sobreexpresión de moléculas de adhesión (Hbabi, 1993) previamente Laurent y cols. (AÑO) reportaron que Ribovac potenciaba la migración leucocitaria en pacientes con alta susceptibilidad a infecciones broncopulmonares recurrentes (Laurent, 1982). En este estudio Ribovac® aumentó la expresión de la integrina CD103 ($\alpha\text{E}\beta_7$) y

este efecto fue dependiente del tiempo, A mayor tiempo de tratamiento mayor expresión en los neutrófilos expuestos a Ribovac[®]. Se ha señalado que se obtiene un aumento significativo de la adhesión de neutrófilos con al menos 4 días de tratamiento con Ribovac[®] a voluntarios sanos (Roques, 1991). De forma, que el tiempo de tratamiento es una variable importante tanto *in vivo* como *in vitro* a la hora de evaluar el impacto de Ribovac[®] sobre la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos.

En el presente estudio reportamos que la integrina CD11c tendió a expresarse más en neutrófilos tratados con Ribovac[®] por un tiempo mayor, lo cual significa que el tiempo de tratamiento fue importante para la expresión de esta molécula. La expresión de CD11c fue también mayor en neutrófilos tratados con 500µg/ml por 6 h que en tratados con 125 µg/ml durante 6 h. de tal forma, no descartamos que la cantidad de Ribovac[®] pudiera incidir sobre la modulación de la expresión de esta molécula en la membrana de neutrófilos. Se conoce que el acoplamiento de las integrinas a sus ligandos puede inducir cambios conformacionales en estas que conduzcan a un aumento o disminución de la actividad de las moléculas de adhesión. Ligado a cambios en conformación y afinidad (Adair, 2005).

CONCLUSIONES

Al termino de este estudio se llegó a la conclusión de que un mayor tiempo de tratamiento con Ribovac[®] tiende a asociarse a mayor expresión de las CD11c y CD103. Este hallazgo puede resultar importante a la hora de pensar en prolongar la terapia con Ribovac[®], puesto que un aumento en la adhesión y migración de neutrófilos inducido por la sobreexpresión de integrinas en neutrófilos está relacionado con la eficacia terapéutica de Ribovac[®].

PERSPECTIVAS

A corto plazo continuar investigando las condiciones o factores que favorecen la sobreexpresión de integrinas en neutrófilos tratados con Ribovac[®] y las vías de señalización involucradas en estas respuestas, y correlacionar estos hallazgos con la variabilidad de la respuesta eferente de estas células (potencia fagocítica, eliminación de patógenos, regulación de la respuesta inflamatoria).

ANEXOS

REACTIVOS

Azul de tripano 4%.

Propiedades fisicoquímicas:

Formula: $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$

PH: 9.8

Estado: Sólido

Color: Azul oscuro

Olor: Característico

Punto de fusión: 300 °C

Solubilidad: Soluble en agua, insoluble en etanol.

Modo de preparación:

Se pesaron 4 g de azul de tripano y se disolvieron en 100 mL PBS (Amortiguador de fosfato de potasio).

MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640

Formulación estándar con D-glucosa y bicarbonato de sodio, puede complementarse individualmente con L-glutamina.

El **medio Roswell Park Memorial Institute**, (RPMI 1640) es un medio celular usado para cultivos celulares. Tradicionalmente, es usado para el cultivo de células humanas o de tejidos aislados como el caso de las arterias mamarias humanas, puede complementarse con suero, vitaminas y/o aminoácidos.

Modo de preparación:

- Mida 5% menos de agua destilada del volumen total deseado de medio, usando un recipiente que pueda contener el volumen deseado.

-
- Agregar el medio en polvo, en agua a una temperatura de 15-30°C mezclando con cuidado.
 - Enjuague dentro y fuera del paquete para remover todos los rastros de polvo que haya.
 - Agregar 2.0 gramos de NaHCO_3 por cada litro de medio.
 - Diluir al volumen deseado con agua destilada hasta disolver.
 - Ajustar el PH del medio a 0.2-0.3 debajo del deseado para trabajar. Se recomienda usar 1N NaOH o 1N HCL (agregar lentamente). Después de ajustar el PH, guardar el medio en un contenedor, hasta que este sea filtrado.
 - Esterilizar inmediatamente por filtración de membrana.
 - Esterilizar por filtración con un filtro milipore de 0.22µm.
- *Unidades de PH generalmente suben a 0.1-0.3 en filtración.

FICOL-HYPAQUE

Densidad de 1.113 g/ml. Líquido, incoloro. Mantenerse a una temperatura de 4° y oscuridad.

SUERO FETAL BOVINO

Inactivar el suero, en baño maría durante 30 min a 55°C. Esterilizar por medio de filtración en un filtro milipore de 0.22µm.

GLOSARIO DE TERMINOS

A

Adenoides: Las adenoides son tejidos situados entre nariz y garganta, cuya función consiste en atrapar a los gérmenes que ingresan al organismo mediante la respiración.

Adenoiditis: Es una inflamación, generalmente producida por una infección de las adenoides.

Adyuvante: Sustancia que, administrada con un antígeno o previamente a este, aumenta la formación de anticuerpos contra ese antígeno que se coadministró con él o previamente a su administración.

Agentes etiológicos: Entidad biológica, física o química capaz de causar enfermedad.

Alérgeno: Sustancia que puede inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) en personas susceptibles, que han estado en contacto previamente con el alérgeno.

Alveolo: Los alvéolos pulmonares son sacos diminutos llenos de aire en los pulmones.

Anticuerpos: Moléculas de la inmunidad específica y una de sus principales funciones fisiológicas es la defensa contra los agentes patógenos.

Antigenicidad: Es la capacidad de una sustancia de interactuar con células efectoras de la respuesta inmune y modificar su comportamiento, sin que por ello haya forzosamente producción de anticuerpos.

Antiinflamatorio: Reduce o suprime la inflamación articular.

Antimicrobiano: Sustancia que inhibe el crecimiento de microbios.

Apoptosis: “Muerte celular programada” es una forma de suicidio celular genéticamente definida.

Atopia:

B

Biodegradable: Son aquellos materiales que pueden ser destruidos por los microorganismos.

Bronquio: Estructura tubular que conduce el aire desde la tráquea a los alveolos pulmonares.

Bronquiolos: Son las pequeñas vías aéreas en que se dividen los bronquios llegando a los alvéolos pulmonares.

C

Caderinas: Grupo de glicoproteínas responsables de los mecanismos de adhesión célula.

Caliciforme: Son células glandulares secretoras de moco presentes en los revestimientos epiteliales de las mucosas de las vías respiratorias y el sistema digestivo.

Célula Natural Killer: “asesina natural” es un tipo de linfocito granular grande pertenecientes al sistema inmunitario.

Citoesqueleto: Responsable de la forma de la célula y del movimiento de la célula en su conjunto y del movimiento de orgánulos en el citoplasma.

Citoquímica: Estudia la composición química de las células y sus procesos biológicos moleculares mediante análisis químicos y fisicoquímicos que permitan su observación.

D

Diapédesis: Al paso de células de la sangre a través de ventanas en los capilares para dirigirse al foco de infección sin que se produzca lesión estructural.

Dilatación: Proceso físico por el cual se producen cambios de volumen como resultado de cambios de temperatura.

E

Endocitosis: Es el movimiento de materiales hacia adentro de la célula, por la vía de vesículas de membrana.

Endotelio: Tipo de epitelio plano simple (de una sola capa), formado por células endoteliales, que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos.

Enzima: Moléculas de proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos.

Enzima hidrolítica:

Epitelio: El tejido formado por una o varias capas de células unidas entre sí que puestas recubren todas las superficies libres del organismo, y constituyen el revestimiento interno de las cavidades, órganos huecos, conductos del cuerpo y la piel y que también forman las mucosas y las glándulas.

Epitelio ciliar: células epiteliales con cilios, que aparecen en los epitelios cuya función es la de transportar líquido o moco a través de órganos tubulares que recubren.

Epítomos: Es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario.

Exocitosis: Es el movimiento de materiales para afuera de la célula, por la vía de vesículas membranosas.

Expectoración: Desprendimiento y expulsión a través de la tos de las flemas y secreciones que se depositan en las vías respiratorias.

Extravasación: (extravascular) Escape de sangre, linfa u otro líquido, desde un vaso sanguíneo o un tubo hacia el tejido que lo rodea.

F

Fagocito: Son células capaces de captar microorganismos y restos celulares e introducirlos en su interior con el fin de eliminarlos.

Fagocitosis: Es el proceso mediante el cual una célula especializada se une a un microorganismo. La unión se realiza mediante la emisión de pseudópodos por parte del macrófago, englobando al microorganismo.

Fagolisosoma: Orgánulo resultante de la fusión de un lisosoma, que contiene los sistemas de digestión, y de una vacuola de fagocitosis, que contienen los elementos fagocitados.

Fagosoma: Vacuola citoplasmática que contiene el material fagocitado por las células (bacterias, detritos celulares etc.)

Faringe: Musculo en forma de tubo que ayuda a respirar y está situado en el cuello y revestido de membrana mucosa; conecta la nariz y la boca con la tráquea y el esófago, respectivamente por lo que hace parte de ambos sistemas tanto respiratorio, como digestivo .

Faringoamigdalitis: La faringoamigdalitis es una infección de la faringe y de las amígdalas, es decir, de la garganta y de las anginas. Se trata de una de las infecciones más comunes durante la infancia, sobre todo en la edad escolar.

Filtro óptico: Es un medio que sólo permite el paso a través de él de luz con ciertas propiedades, suprimiendo o atenuando la luz restante. Los filtros ópticos más comunes son los filtros de color, es decir, aquellos que sólo dejan pasar luz de una determinada longitud de onda.

Fluorescencia: Es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano), son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor al incidente.

Fluorocromo: Son moléculas químicas que absorben la luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente.

Fotoeléctrica: Una célula fotoeléctrica, también llamada célula, fotocélula o celda fotovoltaica, es un dispositivo electrónico que permite transformar la energía luminosa (fotones) en energía eléctrica (electrones).

H

Hidrolasas: Es una enzima capaz de hidrolizar un enlace químico.

Huésped: Es llamado huésped u hospedero al organismo parasitado (que contiene el parásito).

I

Inmunocomprometido: Describe un sistema inmunitario que funciona por debajo del índice de normalidad (Personas con una respuesta inmunológica defectuosa).

Inmunogenicidad: Se dice que es inmunogénica a cualquier sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

Inmunoglobulinas: Son un tipo de proteínas plasmáticas producidas por el sistema inmune en respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas que pueda ser una amenaza para el organismo: como químicos, partículas de virus, esporas o toxinas de las bacterias.

Inmunoterapia: Tratamiento para estimular o reponer el sistema inmunitario frente al cáncer, infecciones u otras enfermedades.

Integrinas: Forman parte de las moléculas de adhesión celular. Son proteínas de membrana formadas por dos cadenas, la alfa y la beta.

L

Laringe: La Laringe, es una estructura móvil, que forma parte de la vía aérea, actuando normalmente como una válvula que impide el paso de los elementos deglutidos y cuerpos extraños hacia el tracto respiratorio inferior.

Leucocito: Son un conjunto de células sanguíneas cuya función principal es la defensa del organismo de sustancias ajenas o agentes infecciosos.

Linfocito: Un linfocito es un tipo de glóbulo blanco.

Lipopolisacárido: Componente de la pared de las bacterias Gram negativas.

Lisosoma: El lisosoma es una vesícula membranosa que contiene enzimas hidrolíticas para la digestión intracelular controlada de macromoléculas.

M

Macrófago: Tipo de glóbulo blanco que rodea los microorganismos y los destruye, extrae las células muertas y estimula la acción de otras células del sistema inmunitario.

Mastocito: Se originan en las células madre de la médula ósea, actuando en la mediación de procesos inflamatorios.

Médula ósea: La médula ósea es un tejido graso y suave que se encuentra dentro de los huesos y produce células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas).

Metaanálisis: Es un estudio basado en la integración estructurada y sistemática de la información obtenida en diferentes estudios clínicos, sobre un problema de salud determinado.

Motilidad: Es un término de la biología para expresar la habilidad de moverse espontáneamente e independientemente.

Mucociliar: Es uno de los mecanismos de defensa más importantes de la vía aérea ayudando a mantener un equilibrio entre el individuo y el medio ambiente que lo rodea.

N

Nasofaringe: Parte de la faringe situada al lado de las fosas nasales.

Neumonía: Es una inflamación del pulmón, causada generalmente por una infección.

O

Oligosacaridos: Se refiere a una cadena corta de moléculas de azúcar

Otitis media: Es una inflamación persistente de la mucosa que recubre el oído medio.

P

Patógenos: Agente biológico capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un huésped (humano, animal, vegetal, etc.)

Peptidoglicano: Es responsable de la rigidez de la pared celular bacteriana y determina la forma de la célula.

Péptidos: Los péptidos son moléculas formadas por aminoácidos unidos por enlace peptídico.

Proteoglicano: Glicoproteína, los proteoglicanos son el componente fundamental de la matriz extracelular animal, constituyen, por así decirlo, la principal sustancia que “rellena” los espacios que existen entre las células del organismo.

Q

Quinasas: Son un grupo de enzimas que catalizan el intercambio de grupos fosfato entre compuestos fosforilados ricos en energía y otros substratos.

Quimiotaxis: Fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o multicelulares dirigen sus movimientos de acuerdo a ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Quimioatrayentes: Son sustancias orgánicas o inorgánicas que poseen efecto inductor de quimiotaxis en células móviles.

R

Receptor: Proteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular.

Retículo endotelial: Parte del del sistema inmune, consiste en las células fagocitarias situadas en el tejido conectivo reticular.

Ribosomas: Son complejos supramoleculares encargados de sintetizar proteínas a partir de la información genética.

Rinosinusitis: La rinosinusitis se define como la inflamación de la mucosa de las fosas nasales y los senos paranasales.

S

Selectinas: Es una familia de moléculas de adhesión celular.

Serotipo: Es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular.

Sinusitis: La sinusitis es una inflamación aguda o crónica de los senos nasales (cavidades dentro de los huesos de la mejilla que se hallan alrededor de los ojos y detrás de la nariz).

T

Transducción: Proceso por el que una célula convierte una determinada señal o estímulo exterior, en otra señal o respuesta específica.

V

Virulencia: Fuerza o violencia con que se produce un ataque, especialmente de una enfermedad.

LISTA DE ABREVIACIONES

CAM-1	Moléculas de adhesión celular tipo-1
CD11c	Integrina $\alpha_x\beta_2$
CD103	Integrina $\alpha_E\beta_7$
IgA	Inmunoglobulina A
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
<i>Ig-CAM</i>	
IRVRA	Infecciones Respiratorias de las Vías Respiratorias Altas.
IMF	Inmunofluorescencia
mAb	Anticuerpo monoclonal
NK	Natural Killer
OMS	Organización mundial de la salud
PECAM-1	
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PPR	
PMN	Polimorfonucleares
PBS	Amortiguador de fosfato de potasio.
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute (medio para cultivo celular)
SFBI	Suero Fetal Bovino Inactivado
TLRS	Receptores tipo Toll

μm	Micrometros
---------------	-------------

μL	Microlitro
---------------	------------

LISTA DE TABLAS

	Pagina
TABLA 1. Moléculas de adhesión involucradas en el tráfico leucocitario.	14
TABLA 2. Moléculas CD para neutrófilos.	19
TABLA 3. Valores de significancia en la comparación de muestras relacionadas para CD103 en sus diferentes tiempos y concentraciones.	40
TABLA 4. Valores de significancia en la comparación de muestras relacionadas para CD11c en sus diferentes tiempos y concentraciones.	43

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Tipos de inmunidad	8
-------------------------------------	----------

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
FIGURA 1. Origen, maduración y vida media de los PMN.	10
FIGURA 2. Etapas del proceso de la fagocitosis: a) quimiotaxis, b) adherencia de las células con los microorganismos, c) endocitosis, d) formación del fagosoma, e) formación del fagolisosoma con la consecuente destrucción del microorganismo, f) exocitosis.	12
FIGURA 3. Activación de integrinas sobre neutrófilos.	16
FIGURA 4. Interacciones adhesivas entre los neutrófilos y el endotelio.	17
FIGURA 5. Expresión de CD103 en neutrófilos tratados con concentraciones variables de Ribovac® por 4 y 6 horas. La expresión de CD103 se determinó en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF).	39
FIGURA 6. Expresión de CD103 en neutrófilos tratados con Ribovac® en un tiempo de 4 horas y 6 horas.	41
FIGURA 7. Expresión de CD11c en neutrófilos tratados con concentraciones variables de Ribovac® por 4 y 6 horas. La expresión de CD11c se determinó en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF).	42
FIGURA 8. Expresión de CD11c en neutrófilos tratados con Ribovac® en un tiempo de 4 horas y 6 horas.	44

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.2006. Mecanismos efectores de las respuestas inmunitarias. *Inmunología*.
2. - Akdis M., Akdis A.C. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy.2007.*Journal Allergy Clin Immunol*, 2007, 115:676-684.
3. - Albelda M.S., Sunit W.C, Ward A.P.Adhesion molecules and inflammatory injury. 1994.*Faseb J*, 8:504-512.
- 4.- Álvarez C.M., Castro A.R., Abdo R.A.,Orta H.S.D., Gómez M.M., Álvarez C.M.Infecciones respiratorias altas recurrentes. Algunas consideraciones.2008. *Rev Cubana med Gen Integr [online]*, 24(1): pp 0-0.
5. - Adair B.D., Xiong J.P., Maddock C., Goodman S.L., Arnaout M.A., Yeager M.Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin α v β 3 in a complex with fibronectin. 2005. *Jcell Bid*, 168:1109-1118.
- 6.- Bader B.L.,Rayburn H., Crowley D., Hynes R.O.Extensive vasulogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all α v integrins.1998.*Cell*,95:507-519.
7. - Baggiolini M., Clark-lewis I.Interleukin-8 a chemotactic and inflammatory cytokine.1992.*FEBS let*, 307:97-101.
8. - Bals R., Hiemstra P.S.Innate immunity in the lung: hoe epithelial cells fight against respiratory pathogens.2004. *Eur Respir J*, 23: 327-333.
9. - Banz K., Schwicker D., Thomas A.M.Economic evaluation of immunoprophylaxis in children whit recurrent ear, nose and throat infections.1994. *Pharmaco Economics*, 6: 464-477.
- 10.- Bellanti J.A. Olivieri., Serrano E.Ribosomal immunostimulation: Assessment of studies evaluating its clinical relevante in the prevention of upper and lower respiratory tract infection in children and adults.2003. *Biodrugs*, 17(5): 355-367.
11. - Bjerregaard D.M., Jurlander J., Klausen P., Borregaard N., Cowland B.J.The in vivo profile of transcription factors during neutrophils differentiation in human bone marrow.2003. *Blood*, 101:4322-4332.
12. - Bocaccio C., Jacod S., Kaiser A., Abastado J.P., Nardin A.Identification of a clinical-grade maturation factor for dendritic cell.2002. *Journal immunotherapy*, 25(1):88-96.
13. - Bousquet J., Fiocchi A.Prevention of recurrent respiratory tract infections in children using a ribosomal immunotherapeutic agent: a clinical review.2006. *Pediatric Drugs*, 8(4): 235-243.

-
14. - Bousquet J., Oliveri D. Role of Ribomunyl® in the prevention of recurrent respiratory tract infections in adults: Overview of clinical results.2006. *Treatments in respiratory Medicine*, 5(5): 317-324.
15. - Bowen A. J., Hunt S. J. The role of integrins in reproduction.2000.*P.S.E.M*, 223: 331-343.
16. - Broide D. New perspectives on mechanisms underlying chronic allergic inflammation and asthma in 2007.2008. *J allergy clin immunol*, 122:475-480.
17. - Burlak Ch., Whitney R.A., Mead J.D., Hackstadt T., De Leo R.F. Maturation of human neutrophils phagosomes includes incorporation of molecular chaperones and endoplasmic reticulum quality control machinery.2006. *Molecular & cellular proteomics*, 5:620-634.
18. - Carlos T.M., Harlan J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules.1994.*Blood*, 84:2068-2101.
- 19.- Cassatella M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils.1995. *Today*, 16:21-26.
20. - Cerf-Bensussan N., Begue B., Gagnon J., Meo T. "The human intraepithelial lymphocyte marker HML-1 is an integrin consisting of a $\beta 7$ subunit associated with a distinctive α chain".1992. *Eur. J. Immunol*, 22:885.
- 21.- Cerf-Bensussan N., Jarry A., Brousse N.B., Lisowska-Grospierre B., Guy-Grand D., Griscell C."A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes".1987.*Eur.J.Immunol*, 17:1279-1285.
22. - Centner J. Atlas of immuno-allergology.1987.Brussels: UCB Institute of allergy.
23. - Cepek K.L., Wong D.A., Brenner M.B., Springer T.A.1995."CD103 cluster report".Leucocyte Typing V, white cell differentiation antigens.Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University press, 1666-1667.
- 24.- Clot J. Immunité anti-infectieuse.Mécanismes, facteurs,spécifiques et non spécifiques.1994. *Rev praticien (paris)*, 44:2505-2512.
25. - Clot J. The effects of ribosomal immunotherapy on non-specific immunity.1999. *Pediatric Research*, 45(5):749.
26. - Cobbold S., Hale G., Waldmann H.1987. "Non-lineage, LFA-1 family, and Leukocyte common antigens: New and previously defined cluster". Leukocyte Typing III, white cell differentiation Antigens, McMichael A.J., et al., Eds., Oxford University Press, 788-803.
- 27.- Cowburn S.A., Condliffe M.A., Farahi N., Summers Ch., Chilvers R.E. Advances in neutrophils biology.2008. *Chest*,134:606-612.
- 28.- Craig A., Mai J., Cai S., Jeyaseelan S. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumoniae.2009. *Infection and immunity*, 77(2):568-575.

-
- 29.- De la Torre G.C., Pacheco R. A., Escalante D.A.J., del Rio navarro B.E. Metaanálisis comparativo de los inmunoestimulantes utilizados em pediatria en México. 2005. *Revista alergia México*, 52(1): 25-38.
- 30.- Donnelly J.J., Deck R.R, Liu M.A. Immunogenicity of a Haemophilus influenza polysaccharide-neisseria meningitides outer membrane protein complex conjugate vaccine. 1990. *J immunol*, 145: 3071-3079.
31. - Drilenburg O., Pals t.S. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. 2000. *Blood*, 95:1900-1910.
32. - Diamond M.S., Springen T.A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. 1994. *Curr.Biol*, 4:506-507.
- 33.- Franco A.D., Giraldo L.M., Patiño J.P. Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune. 2004. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 17(3): 280-289.
34. - Hbabi L., Roques C., Michel G. et al. In vitro stimulation of polymorphonuclear cell adhesion by Ribomunyl and antibiotic + Ribomunyl combinations: effects on CD18, Cd35 and CD16 expression. 1993. *Int J immunopharmacol*, 15:163-173.
35. - Higgins M.G.J., Cernadas M., Tan K., Irie A., Wan J., Takada Y., Blenner B.M. Terole of α and β chains in ligand recognition by $\beta 7$ integrins. 2000. *The Journal of biological chemistry*, 275(33): 25652-25664.
- 36.- Higgins M.G.J., Mandlebrot A.D., Shaw K.S., Russell J.G., Murphy A.E., Chen Y. Nelson J.W., Parker M.C., Brenner B.M. Direct and regulated interaction of integrin $\alpha E \beta 7$ with E-cadherin. 1998. *The Journal of cell Biology*, 140(1):197-210.
- 37.- Hoops P., Prather N.E., Berry L.J., Ravel J.M. Evidence for an extrinsic immunogen in effective ribosomal vaccines from salmonella typhimurium. 1976. *Infect.immun*, 13:1184-1192.
38. - Kaleem M.D.Z. Clinical applications of flow cytometry for nonneoplastic disorders. 2006. *Am J Clin Pathol*, 126 (1): 86-103.
- 39.- Laurent P.H., Montain Y., Pachecho Y. et al. Étude in vivo de la leucocytaire au cours d'infections bronchopulmonaires récidivants á pyogènes. A propos d' un essay d'immunotherapie avec Ribomunyl. 1982. *Gaz Méd France*, 89:1277-1280.
- 40.- Lépori R.L. 2009. Atlas del sistema respiratorio. 2a ed. Buenos Aires.

-
41. - Ley K.P., Gaetgens F., Cristopher M.S., Singer L.A., Laski S.D. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. 1999. *Blood*, 12:2553-2555.
- 42.- Luini W., De Rossi M., Licciardello L. et al. Chemotactic cytokine gene expression and production induced in human monocytes by membrane proteoglycans from *klebsiella pneumoniae*. 1991. *Int J immunopharmacol*, 13:631-637.
- 43.- Lusuardi M., Capella A., Carli S., Spada E.L., Spinazzi A., Donner C.F. Local airways immune induced by oral bacterial extracto in chronic bronchitis. 1993. *Chest*, 103:1783-1791.
44. - Mazzone A., Ricevuti G., Leukocyte CD11/CD18 integrins: Biological and clinical relevance. 1995. *Haematologica*, 80(2): 161-175.
45. - Michel F.B., D'Hinterland L., Bousquet J., Pinel A.M., Normier G. Immunostimulation by a ribosomal vaccine associated with a bacterial cell wall adjuvant in humans. 1978. *Infection and immunity*, 20(3): 760-769.
- 46.- Mogensen H.T. Pathogen and inflammatory signaling in innate immune defenses. 2009. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2): 240-273.
- 47.- Morris Q.J.H., Martínez M.C., Abdala D.R., Campos O.D. Adyuvantes inmunológicos. 1999. *Rev Cubana Invest Biomed*, 18(2): 130-137.
- 48.- Muñoz L.F., Pedemonte C.M. Inmunoterapia: mecanismos de acción, indicaciones y beneficios. 2003. *Protocolos de Inmunología clínica y Alergología [online]*, pp 127-136.
49. - Naccache P.H., Jean N., Liao N.W., Bator J.M., Mc coll S.R., Kubes P. Regulation of stimulated integrin surface expresión in human neutrophils by tyrosine phosphorylation. 1994. *Blood*, 84: 616-624.
- 50.- Nelson H.S. Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy. 2005. *Journal Allergy Clin Immunol*, 115:676-684.
51. - Paupe J. Immunotherapy with an oral bacterial extract (OM-85 BV) for upper respiratory infection. 1991. *Respiration*, 58:150-154.
-

-
- 52.- Portalés P., Clot J. Immunostimulants Revisited: Focus on the pharmacology of Ribomunyl®.2006. *BioDrugs*, 20(2):81-84.
- 53.- Pregliasco F., Terracciano L., Marcassa S., Zava D., Anselmi G.2009. *Allergy and asthma proceedings*, 30(1): 5-12.
- 54.- Pujol J.L., Klein B., Godard P., Michel F.B. Bacterial ribosomal immunostimulant prime alveolar macrophages in vivo to produce interleukin 1 in vitro.1991. *Chest*,100:644-648.
- 55.- Quezada L.A. Uso de inmunoestimulantes en pediatría.1999. *Rev. Chilena Ped*, 70: 1239-129.
- 56.- Reyes G.U., Reyes H.U., Quero H.A., Reyes H.D., Ortiz M.M., Hernández P.M. González S.N. Seguridad y efectividad de la vía subcutánea con fracciones ribosomales y proteoglicanos de membrana en niños con infección respiratoria recurrente.2007. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*, 21(81): 6-12.
- 57.- Ribosomal Symposium. Pr Fiocchi; J.Bystron. September 11th 2004.
- 58.- Riley R.S. The flow cytometer:Historical developments and present applications. In: Ross W,ed.Clinical applications of flow cytometry.1993. *New York:Igaku-Shoin Medical Publishers*, 1993:3-13.
- 59.- Rochon P.Y., Frojmovic M.M.Dynamics of human neutrophil aggregation evaluated by flow cytometry.1991. *Journal of leukocyte Biology*, 50:434-443.
- 60.- Rodríguez Z.M., Álvarez M. Respuesta immune frente a la infección.2005. *Medicine*, 9(34): 2239-2248.
- 61.- Rojas E.O.2001.Inmunología.2ª.ed.Panamericana.
- 62.- Rojas E.O., Arce P.P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias.2003. *Bioquimia*, 28(4):19-30.
- 63.- Roques C., Frayret M.N., Luc J. et al. Effect of an in vivo immunostimulant treatment on PMN functions interaction with antibiotics in vitro. 1991. *Int J Immunopharmacol*, 13:1051-1057.
- 64.- Roques C., Frarey M.N.,Luc J.et al. Immunostimulant effects on granulocyte functions during an acute respiratory infection.1992. *Dev Biol Stand*, 77:13-17.

-
- 65.- Sampalo-Lainz A., López G.M. Anticuerpos monoclonales y grupos de diferenciación antigénicos: métodos de estudio y aplicaciones al diagnóstico clínico.1992. *Med clin (Barc)*, 99:30-36.
66. - Sanjeev A., Xun Shen B.J., Young P., Lerner J.D. Rho GEF Lsc is required for normal polarization, migration, and adhesion of formyl-peptide-stimulated neutrophils. 2005.*Blood*,107(4): 1627-1635.
- 67.- Scheffold A., Kem F. Recent developments in flow cytometry.2000. *J clin immunol*, 20:400-407.
- 68.- Schlickum S., Sennefelder H., Friedrich M., Harms G., Lohse J.M., Kilshaw P., Schön P.M. Integrin α E(CD103)B7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion.2008. *Blood*, 112:619-625.
- 69.- Seely J.A., Pascual J.L., Christou V.N. Science review: cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance.2003. *Critical care*, 7: 291-307.
- 70.- Spahn J.D., Covar R. Clinical assessment of asthma progression in children and adults.2008. *J Allergy clin Immunol*, 121:548-557.
- 71.- Spöri R., Joller N., Hilbi H., Oxenius A. A novel role for neutrophils as critical activator of NK cells. 2008. *Journal Immunology*, 181: 7121-7130.
- 72.- Stephens L.E., Sutherland A.E., Klimanskaya I.V., Andrieux A., Meneses J., Pedersen R.A., Damsky Ch. Deletion of beta 1 Integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality.1995. *Genes Dev*,9:1883-1895.
- 73.- Sung J.S., Shu Man Fu C., Gaskin F., Beaty R.S. A major lung CD103 (alpha E)beta 7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing langerin and tight junction proteins.2006. *J. Immunol*, 176:2161-2172.
- 74.- Takada Y., Ye X., Simon S. The integrins.2007. *Genome Biology*, 8:215.

-
- 75.- Taraszka S.K., Higgins M.G.J., Tan K., Mandelbrot A.D., Wang J., Brenner B.M. Molecular Basis for leukocyte integrin $\alpha E\beta 7$ adhesion to epithelial (E)-cadherin.2000. *J.exp.Med*, 191(9):1555-1567.
- 76.- Tortora G.J., Grabowski S.R.2002.Anatomía del desarrollo del aparato respiratorio. Principios de Anatomía y fisiología.9ª ed.Oxford University Press. Pp 817-818.
- 77.- Varela C.M.,Lara A.V., Martínez B.A., Romero B.M., Pérez V.N., Cruz P.M.F., Salcedo B.C. Eficacia de un inmunoestimulante ribosomal en la prevención de infecciones respiratorias en población preescolar de la ciudad de Orizaba Veracruz.2006. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*, 20(77): 17-23.
- 78.- Virchow R. Die cellularpathologie in ihrer Begründung auf die physiologische and pathologische Gewebelehre.Berlin: August Hirschwald Verlag; 1871. pag.563
- 79.- Walzog B., Gaehtgen P. Adhesion Molecules: the path to a new understanding of acute inflammation.2000. *News in physiological sciences*, 15:107-113.
- 80.- Walzog B., Weinmann P., Jeblonski F., Scharffetter-Kochanek K., Bommert K., Gaehtgens P. Arole for $\beta 2$ integrins (CD11/CD18) in the regulation of cytokine gene expression of polymorphonuclear neutrophils during the inflammatory response.1999. *FASE J*, 13:1855-1865.
- 81.- Wagner N., Lohler J., Kunkel E.J., Ley K., Leung E., Krissan Sen G., Rajewsky K., Muller W. Critical role for beta 7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue.1996. *Nature*, 382: 366-370.
- 82.- Wilson R.W., Ballantyne C.M., Smith C.W., Montgomery C., Bardley A., O'Brien W.E., Beaudet A.L. Gene targeting yields a CD18-mutant forstudy of imflammation.1993. *J.Immunol*, 151:1571-1578.
- 83.- Youmans S.A., Youmans P.G.1966.Preparation of highly immunogenic ribosomal fractions of mycobacterium tuberculosis by use of sodium dodecyl sulfate.
