

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Administración de Isoprinosine (IP) como inmunomodulador en
un modelo de ratones vacunados con BCG**

David Mateo Aguilar Cruz

Ing. Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 04 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**Administración de Isoprinosine (IP) como inmunomodulador en un modelo
de ratones vacunado con BCG**

David Mateo Aguilar Cruz

Nombre del profesor, Título académico

Enrique Terán, MD, PhD

Quito, 29 de abril de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: David Mateo Aguilar Cruz

Código: 00130721

Cédula de identidad: 1723205215

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El descubrimiento de nuevas aplicaciones, distintas al objetivo predestinado de los fármacos ya establecidos cada vez es más frecuente. En este sentido, el isoprinosine (IP) es un agente inmunomodulador con actividad antiviral y en el presente estudio se analizó su posible actividad antibacteriana. Para ello, se suministró isoprinosine en dosis equivalentes a 1500 mg, 2000 mg y 3000 mg al día por vía intragástrica durante 21 días a 3 grupos (B, A, M) de ratones y luego se los sometió a un reto inmunológico mediante la administración de 1 mg de bacilo atenuado de Calmette-Guerin (vacuna BCG) al igual que un grupo 4 (C) sin ningún tratamiento previo. Luego de 15 días se realizó por punción cardíaca la extracción de sangre a cada ratón para una biometría hemática, incluido un grupo 5 (CS) como control normal. Adicionalmente a todos los ratones se extrajo los órganos para análisis histopatológico. Se encontró una diferencia en la respuesta inmunológica de leucocitos, basófilos, monocitos, neutrófilos y macrófagos, además de cambios tisulares entre los roedores que fueron suministrados con IP y los controles, sugiriendo que el IP tiene una actividad inmunoestimulante contra las infecciones bacterianas.

Palabras clave: Isoprinosine (IP), inmunomodulador, BCG, ratones, biometría, histopatología.

ABSTRACT

The discovery of new applications, different from the predestined objective of the drugs already established, is increasingly. In this sense, isoprinosine (IP) is an immunomodulatory agent with antiviral activity and in the present study we analyzed if it could have a possible antibacterial activity. For this, isoprinosine was administered in equivalent doses of 1500 mg, 2000 mg and 3000 mg daily intragastrical for 21 days to 3 groups (B, A, M) of mice and then they were subjected to an immunological challenge by administration 1 mg of attenuated *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG vaccine) as well as group 4 (C) without any prior treatment. After 15 days, blood was extracted from each mouse by cardiac puncture for a blood count, including a group 5 (CS) as a normal control. In addition to, all mice organs were removed for histopathological analysis. A difference was found in the immune response of leukocytes, basophils, monocytes, neutrophils, and macrophages, as well as a tissue changes between rodents that were supplied with IP and controls, suggesting that IP has immunostimulatory activity against bacterial infections.

Key words: Isoprinosine (IP), immunomodulator, BCG, mice, biometry, histopathology.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	10
Métodos.....	13
Resultados	15
Discusión.....	18
Conclusiones	22
Referencias bibliográficas.....	23
Anexo A: Análisis Histopatológico de los 19 ratones estudiados	26
Anexo B: Conteo de células (Macrofagos gigantes) por transectos del bazo con objetivo x10	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes promedios obtenidos de la biometría hemática de los 19 ratones pertenecientes a los 5 grupos analizados.....	16
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de porcentajes promedio de monocitos y basófilos obtenidos de la biometría de los 19 ratones pertenecientes a los 5 grupos analizados.	16
Figura 2. Fotografías de distintas placas del bazo cada grupo obtenidas a partir del análisis histopatológico de los 5 grupos estudiados.	17
Figura 3. Mediana de células multinucleadas encontradas en el bazo a partir de 13 transectos de 1 campo de ancho, usando objetivo 10X en todos los grupos analizados.	18

INTRODUCCIÓN

El medicamento isoprinosine que surgió en los años 70, se basa en el principio activo del metisoprinol, el cual es un inmuno-estimulador que está compuesto químicamente de p-acetamidobenzoato, de N,N-dimetilamina-2-propanol e inosina (en proporción de 3:1) ($C_{52}H_{78}N_{10}O_{17}$), que se desarrolló con el objetivo de tratar a personas que sufren de diversas patologías inmuno-depresivas asociadas a infecciones virales, enfermedades autoinmunes y neoplasias, mientras que con lo que respecta a la degradación metabólica, esta se da en el hígado dando como resultado en un aumento del ácido úrico el cual se normaliza después de la suspensión del medicamento (NCBI, 2019).

En el auge del descubrimiento de esta medicina se realizaron estudios sobre diversas enfermedades neurológicas, en donde se investigó el efecto que tiene esta droga en casos de encefalitis viral, analizando varios casos que presentaban leucopenia y linfocitosis, pero en uno de los casos en específico se le administraron por sonda gástrica 3 gramos de isoprinosine en las primeras doce horas y luego 6 gramos por día durante tres días, dando como resultado, a las 36 horas después, un estado consciente del paciente con un análisis de su líquido cefalorraquídeo exponiendo que los linfocitos aumentaron en un 75% , aunque también se evidencio que el líquido cefalorraquídeo seguía mostrando anormalidades con saturación de proteínas, manifestando una vez más que existen argumentos para comprobar su actividad inmunoestimulante (Nisman, 1973).

En el Ecuador se han realizado estudios del metisoprinol para el tratamiento de enfermedades como el dengue, virus de inmunodeficiencia felina (VIF), virus dermatológicos, entre otras patologías causadas por diversos virus presentes en el país, pero en el contexto de su actividad antiviral y no por el análisis de su actividad sobre el sistema inmunológico (Ponce y Ruíz, 2016)

Este medicamento, también llamado inosina pranobex (IP), se lo caracterizaba por ser un agente antiviral, pero con el paso del tiempo y estudios posteriores a su lanzamiento al mercado se lo categorizó como inmuno-potenciador, ya que como en el caso de estudio de evolución del tratamiento de la varicela en niños se comprobó que el efecto antivírico es un efecto secundario ya que no se vio ninguna reducción del cuadro clínico en los infantes que presentaron varicela (Becerril, 2009).

Del mismo modo se ha demostrado que el efecto antiviral es minúsculo en comparación con otros medicamento con lo que respecta a pruebas contra herpes viral, herpes zoster, herpes genital, hepatitis B y C o panencefalitis esclerosante subaguda (SSPE por sus siglas en inglés), donde con lo que respecta al último, un estudio se observó que la cantidad de IgG aumento y los anticuerpos contra el sarampión estaban presentes en altas cantidades, pero no logro eliminar o disminuir la carga vírica y solo se evidencio un 5 por ciento de remisión en los pacientes estudiados (Huttenlocher y Mattson, 1979).

Del mismo modo el efecto del isoprinosine sobre el sistema inmunológico es favorecer al mismo, mas no ataca directamente a la replicación viral, por ello este medicamento se enfoca en la proliferación y diferenciación de los linfocitos T con antígenos específicos, además existe evidencia de que se también ayuda a la producción de linfocitos B, pero a causa de su acción sobre los linfocitos T CD4⁺ y macrófagos (Hadden, Hadden y Coffey, 1979).

Además se ha logrado demostrar que el IP tiene una acción importante contra enfermedades virales, aunque existe una controversia, ya que algunos autores de artículos científicos ponen en contraste que estas enfermedades no son de alta gravedad, por lo que es difícil de investigar a falta de un grupo de pacientes grandes a los cuales estudiar para poder interpretar los resultados con una significancia estadística a pesar de que van más de 20 años de estudio, pero evaluando más el caso de metisoprinol y su utilidad sobre enfermedades como la esclerosante subaguda, se ha probado el efecto que tiene sobre el interferón- α y demás

citoquinas que estimulan una mejor respuesta inmunitaria, confirmando que si tiene una actividad sobre el sistema inmunológico (EASP, 1995).

Con lo que respecta al mecanismo de acción del IP sobre el sistema inmune al verse sometido un estímulo, se tiene incógnitas que no se han podido establecer actualmente, ya que no se ha establecido si hay una diferencia en las dosis y su efecto beneficioso, conjuntamente según la bibliografía el efecto que tiene el IP en la respuesta inmunorestaurativa no está muy claro en cómo actúa sobre las células inmunológicas como macrófagos, basófilos o linfocitos T dependiendo de la posología dada (Shams, Ngah, y Lotfy, 2019). Del mismo modo existe evidencia que puede tener un efecto en el tratamiento subsecuente de infecciones mixtas entre virus y bacterias, pero no se han analizado si las dosis afectan a la respuesta inmune (Bera, Salapová y Spajdel, 2016)

Una de las formas más comunes de estimular el sistema inmunológico y con evidencia actual de que funcionan para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, es la administración de la vacuna BCG ya que al estar conformada de bacterias *Mycobacterium bovis* o bacilo de Calmette-Guérin atenuada causa en el sistema inmunológico una respuesta adaptativa ya que los macrófagos son los encargados de fagocitar y destruir al microorganismo, derivando en una reacción en cascada por parte de los linfocitos T, además de la aumentar la presencia de citoquinas como IL-4 e IL-12 que llaman a otras células inmunes para mejorar la respuesta inmune (OMS, 2004).

En conclusión, el IP ha logrado ser un beneficio para personas que sufren de enfermedades autoinmunes por causa viral ya que se ha demostrado su gran actividad inmunoestimulante en diferentes cuadros clínicos, pero no si tiene una actividad directa sobre agentes bacterianos dependiendo de la posología administrada. Por lo que este estudio plantea evaluar si es que un medicamento diseñado para contrarrestar infecciones virales por estimulación del sistema inmunológico posee actividad contra agentes bacterianos y al mismo

tiempo investigar si es que esa actividad farmacológica es dependiente de la concentración utilizada frente al mismo reto inmunológico.

MÉTODOS

Al ser un experimento basado en el efecto que tiene el IP sobre el sistema inmune, se plantea cinco diferentes grupos de estudio, con un total de 19 ratones como modelos a estudiar. Se dividió en 4 grupos de 4 animales cada uno (A, M, B y C) y un grupo de 3 animales (CS), donde el Grupo 4 fue el que se usó como control sin tratamiento, pero con reto inmunológico y el grupo 5 como control normal sin ningún tratamiento ni reto inmunológico.

El experimento consistió en la administración de isoprinosine a tres diferentes concentraciones equivalentes de; 1500mg, 2000mg y 3000mg por cada 70kg de peso, lo que equivale a una dosis específica en cada ratón, de 0.5mg, 0.6mg y 0.9mg respectivamente, esta relación se obtuvo gracias a que según dosificación especificada por el proveedor es de: 1g cada 12 horas para un sujeto de 70kg, por lo que a cada ratón que pesa un promedio de 20 a 25 gramos se va a dividir las tres concentraciones de isoprinosine escogidas para este experimento para el peso de cada roedor, obteniendo así la dosis en mg de IP. Una vez obtenida esta relación se utilizó como vehículo agua destilada para poder suministrar el fármaco, el cual se vende en pastillas comprimidas por lo que se trituró en mortero hasta obtener una consistencia de polvo y poder disolverlo en 0.5ml de H₂O.

Se clasificó cada dosis a un grupo correspondiente siendo Grupo 1 a la dosis de 1500mg (baja-B), el Grupo 2 a la dosis de 2000mg (media-M) y el Grupo 3 a la dosis de 3000mg (alta-A), donde a pesar de ser la dosis alta de 3000mg correspondiente al Grupo 3, se suministró por 41 días al Grupo 2 la misma cantidad de dosis equivalente a 2000mg por lo que se definió que la dosis alta pertenece al grupo M y la dosis media pertenece al grupo A.

A los tres grupos se les suministro su respectiva dosis diariamente durante 21 días consecutivos vía intragástrica mediante una cánula de alimentación metálica curva, mientras que al Grupo 4 (C) y Grupo 5 (CS) no se le dio el medicamento en ningún momento. Después de los 21 días se realizó un desafío patológico a los ratones de cada grupo incluyendo el de control negativo Grupo 4 (C), a partir de la vacunación intraperitoneal con BCG a una concentración de 1mg para asegurar una inoculación por parte del bacilo atenuado de *Mycobacterium bovis*.

Esta concentración se determinó gracias a un análisis de a dosis máxima letal obtenida a partir de un estudio realizado con anterioridad al descrito en este documento, este consistió en la aplicación de la vacuna en una concentración de 1mg, donde no se vio mortalidad. Hay que tener en cuenta que los ratones permanecieron aislados durante todo el proceso para evitar que se consuman entre sí por su naturaleza caníbal, esto debido a la posible alteración del sueño, afectación a la actividad motriz y los efectos de la becegeitis inducida a los roedores que causarían una debilidad en los mismos.

Una vez que se realizó el reto inmunológico, se observó los efectos de la vacuna durante 14 días, mientras se seguía suministrando el isoprinosine diariamente. Al final de este periodo de tiempo se realizó la extracción de 1 ml de sangre a los todos los ratones a lo que vacuno y también a los 3 ratones que no fueron vacunados, siendo un total de 19 extracciones vía punción cardiaca, esta se realizó durmiendo a los roedores con cloroformo y colocándolo en posición decúbito dorsal para localizar la zona con mayor latido cardiaco, posteriormente se utilizó una jeringa de 1 ml para proceder a obtener la muestra de sangre. Al mismo tiempo se realizó una disección de cada individuo con el objetivo de proceder a un análisis histopatológico de los órganos; bazo, pulmón, riñón e hígado que se almacenaron en tubos falcón de 15ml con una solución de paraformaldehido al 10%.

RESULTADOS

En ninguno de los cuatros grupos con los que se realizó la experimentación se reportó muerte de los animales, ni tampoco se observó cambios en los patrones de consumo de agua, alimento y sueño/vigilia.

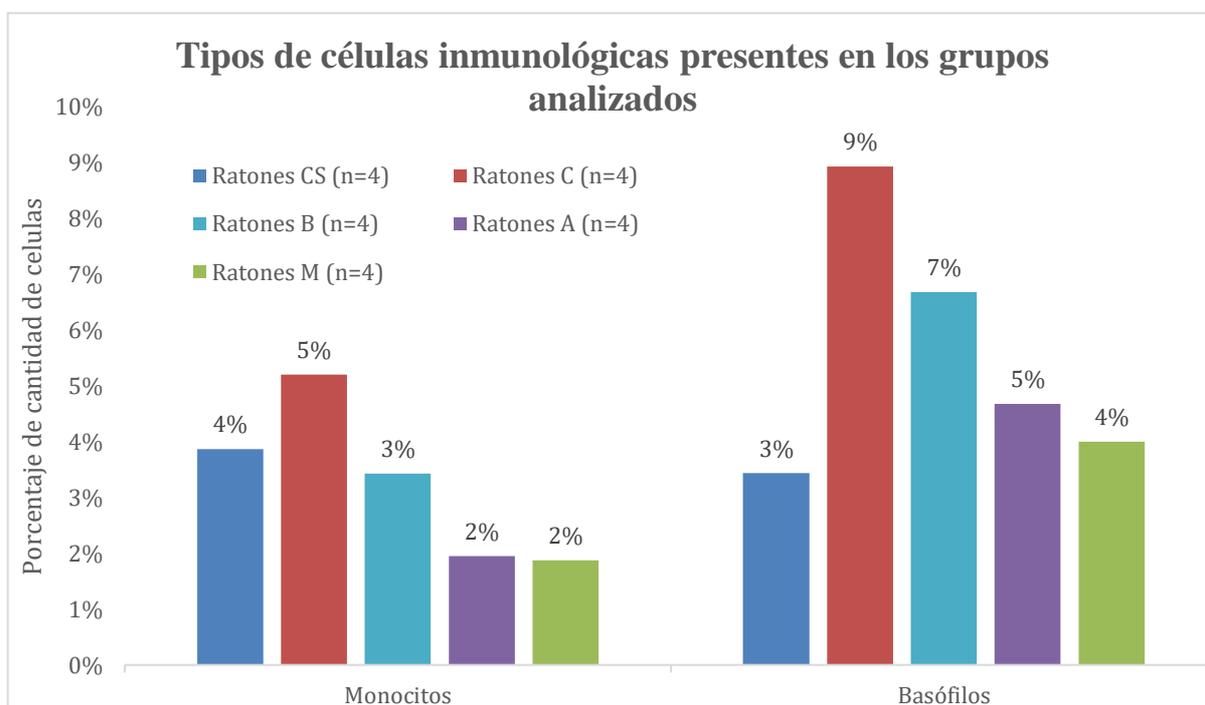
Al analizar los resultados obtenidos en el conteo de leucocitos, como se puede observar en la tabla 1, no hubo diferencias entre el grupo control sin intervención (CS) y los que recibieron solo BCG (C), pero si se encontró un significativo mayor porcentaje de monocitos y de basófilos. Sin embargo, en los animales pre-tratados con isoprinosine, se encontró un significativo menor conteo de leucocitos en el grupo de dosis baja (B) en comparación a los dos controles, al igual que el grupo con dosis media (M), pero con lo que respecta a los ratones con dosis alta (M) llegó a casi a ser el mismo número que el control normal (CS). Al mismo tiempo en esos tres grupos pre-tratados con isoprinosine se encontró un significativo incremento en el porcentaje de neutrófilos en relación a los dos grupos control, pero no fue diferente entre cada una de las dosis de isoprinosine. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos no mostro diferencias entre los tres grupos de isoprinosine, ni tampoco en comparación con el control que recibió solo BCG (C), pero si menor que en el grupo control sin intervención alguna.

De igual forma, en los grupos pre-tratados con isoprinosine se observó que el número de monocitos fue progresivamente disminuyendo, aunque no de forma significativa entre ellos, pero si en comparación al grupo que recibió solo BCG (C) y en menor medida que el grupo control sin intervención (CS; tabla 1). Algo semejante ocurrió con el porcentaje de basófilos, mismo que disminuye conforme aumenta la cantidad de isoprinosine administrado, llegando a que en la dosis a largo plazo sea equivalente al control sin ninguna intervención (CS) y significativamente menor al grupo solo con BCG (C; figura 1).

Tabla 1. Porcentajes promedio obtenidos de la biometría hemática de los 19 ratones pertenecientes a los 5 grupos analizados.

Ratones	CS (n=3)	C (n=4)	B (n=4)	A (n=4)	M (n=4)	SD
Glóbulos Blancos (mm ³)	8923	7646	5310	6211	8111	1306,96
Neutrófilos (%)	5%	4%	10%	13%	12%	4%
Linfocitos (%)	88%	81%	80%	80%	79%	3%
Monocitos (%)	4%	5%	3%	2%	2%	1%
Eosinófilos (%)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Basófilos (%)	3%	9%	7%	5%	4%	2%

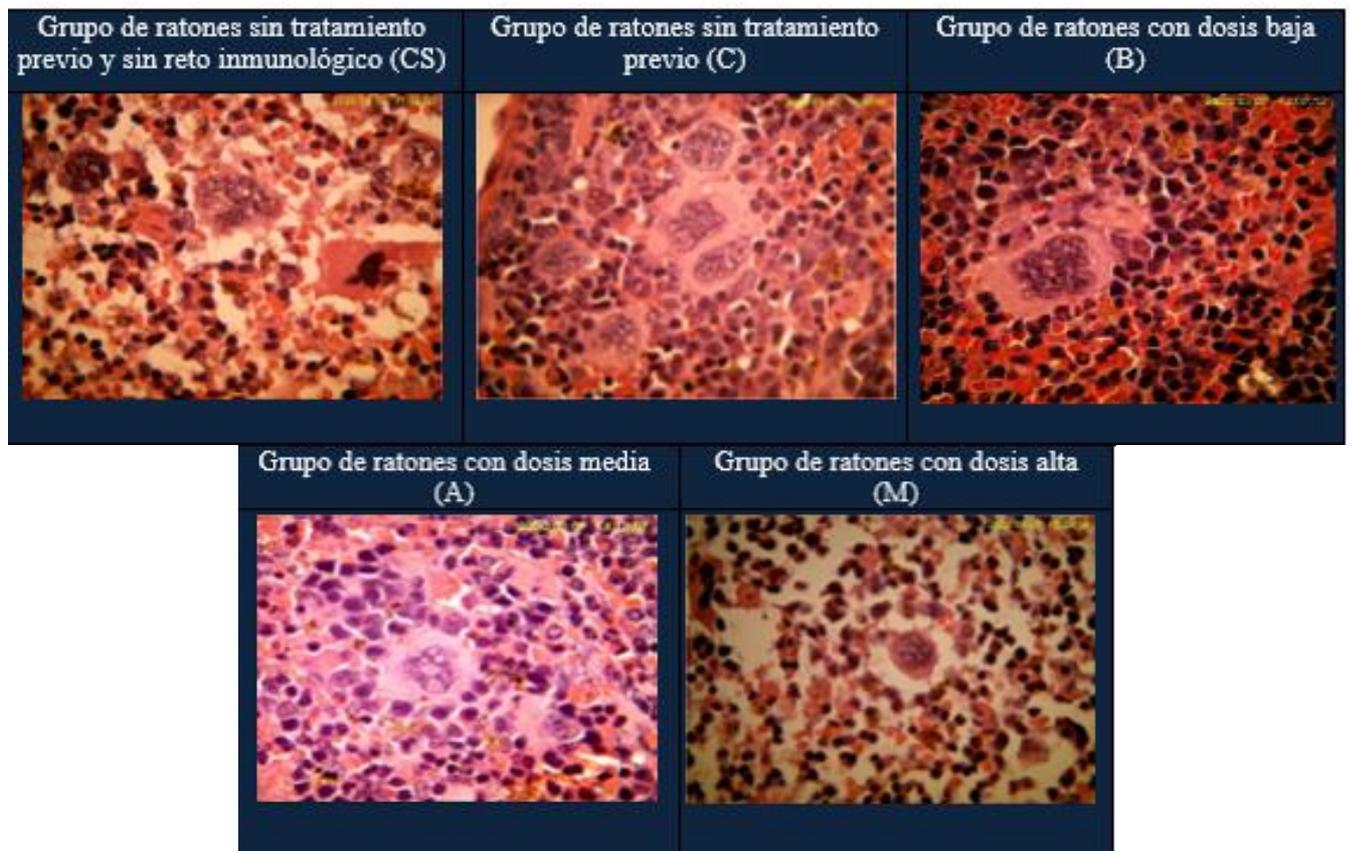
Figura 1. Comparación de porcentajes promedio de monocitos y basófilos obtenidos de la biometría de los 19 ratones pertenecientes a los 5 grupos analizados.



En lo que refiere al análisis histopatológico de los tejidos de cada uno de los animales estudiados, en el hígado, pulmón y riñón no se encontraron diferencias importantes entre los cinco grupos, razón por la cual el análisis se focaliza en los hallazgos en el bazo como se

observa en la figura 2, hubo presencia de células gigantes multinucleadas en todos los grupos analizados, donde con lo que respecta al grupo CS se encontraba ligeramente reactivo, es decir que se encontraba en su estado natural con una población de macrófagos normal, mientras que en el grupo control C con BCG se observó un aumento del volumen en el tejido linfoide y con mayor afluencia de sangre, definiendo este como un órgano congestionado. Del mismo modo los tratamientos correspondientes la dosis media (A) y dosis alta (M) se encontraban congestionados pero el grupo con dosis baja (B) tenía el órgano ligeramente congestionado, por lo que para encontrar diferencias se procedió a realizar el conteo de los macrófagos.

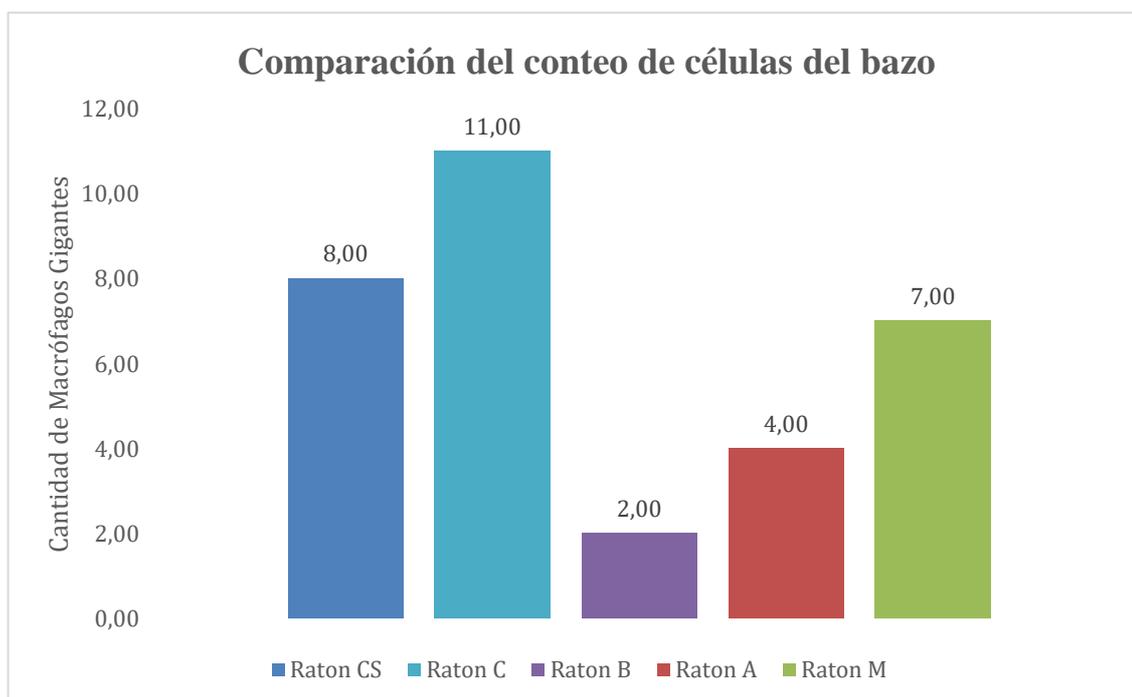
Figura 2. Fotografías de distintas placas del bazo cada grupo obtenidas a partir del análisis histopatológico de los 5 grupos estudiados.



El método de conteo consistió en realizar hasta 13 transectos de 1 campo de ancho, usando objetivo 10X. Cada transecto recorrió la muestra de bazo a lo ancho, de un límite capsular a otro. Se notó gran variabilidad en la calidad de las muestras: defectos de fijación,

diferencias de grosor y artefactos de dilatación del bloque de parafina, por lo que el las plas de un individuo del grupo control normal (CS) no se pudieron analizar, al igual que dos placas procedentes de dos individuos de la dosis a largo plazo (M). Con este preámbulo se encontró que el grupo control con BCG (C) en comparación con el grupo control normal, como se puede ver en la figura 2 hubo un aumento significativo de 8 a 11 macrófagos por campo de visión. Prestando atención a la mediana de la dosis baja se observó que descendió su número significativamente con respecto al grupo control, pero que fue aumentado progresivamente al igual que fuimos aumentado las dosis siendo así que en el grupo con dosis alta (M) llega prácticamente a una población igual que el grupo control (CS)

Figura 3. Mediana de células multinucleadas encontradas en el bazo a partir de 13 transectos de un campo de ancho, usando objetivo 10X en todos los grupos analizados.



DISCUSIÓN

Para poder realizar un análisis de manera correcta se decidió establecer un modelo como base de comparación, el cual consistió en observar el conteo de leucocitos en la sangre de los

ratones del grupo control con BCG (C) y el grupo normal (CS) con el objetivo de definir las diferencias de un organismo normal y otro sometido a un estímulo inmunológico. Como se puede ver la figura 1 el porcentaje promedio de monocitos, al igual que los basófilos aumentan significativamente considerando que solo pueden variar en un rango de 0.6-0.8 y de 0.1-0.3 respectivamente (Santos et al., 2016). Esto se da porque la vacuna BCG, al tener *Mycobacterium* atenuado causa fundamentalmente una respuesta por parte de estas dos células inmunológicas mencionadas, siendo los monocitos parte de la respuesta inmune inespecífica a nivel tisular ya que se transforman en macrófagos para poder fagocitar a las bacterias en el tejido del órgano afectado y los basófilos son promotores de la respuesta debido a que producen citocinas que llaman a otras células inmunológicas empezando una cascada de reacciones (Lloberas, 2004).

Con este modelo se decidió empezar a tratar a los animales, para ello escogimos isoprinosine, con el objetivo de ver si tiene una actividad antibacteriana por mediación del sistema inmune. Observando la biometría de los tres grupos (B, A, M) expuestas en las tabla 1 se vio que, con la administración de isoprinosine independientemente de las dosis, el comportamiento es distinto entre los ratones control con BCG (C) y los ratones con tratamiento (B, A, M), prestando atención al aumento significativo (teniendo un rango de $\pm 4.5\%$) de la cantidad de neutrófilos, debido a que la función primaria de estas células es fagocitar y destruir a bacterias que se encuentren periféricamente y al mismo tiempo liberan citocinas proinflamatorias e inmunomoduladores que llaman a otras células inmunitarias, siendo así la primera línea de defensa ante una ataque por parte de microbios (Eberl y Davey, 2014).

Para poder corroborar estos resultados y analizar si la dosis afecta a la respuesta inmunitaria, se realizó un análisis histopatológico de los órganos: pulmón, hígado, riñón y bazo debido a que estos pudieron verse afectados por la vacuna BCG por su naturaleza y por ser colocada intraperitonealmente, del mismo modo se extrajo los órganos a los ratones de los

grupo control C y CS, encontrando como se ve en el anexo A que ningún órgano, con excepción del bazo, presentaban anomalías relacionadas al objetivo y los estos resultados de la investigación.

Por lo que, al enfocarnos en el bazo en todos los grupos estudiados, se observó que la congestión que se define como un aumento de afluencia de sangre y del volumen en el tejido linfoide estuvo en todos los grupos (C, B, A, M) en comparación con el control normal (CS) que se encontraba en su estado reactivo normal, lo cual significa que este órgano perteneciente al sistema inmune en todos los animales estuvo reaccionando a algún antígeno o patógeno (Prat, Domínguez y Ausina, 2007).

Analizando las placas histopatológicas, como se muestra en la figura 2, hubo la presencia en todos los casos de células gigantes multinucleadas, por lo que se procedió a realizar un conteo de estas mostrando una diferencia en la cantidad de macrófagos entre los grupos analizados. Como se puede observar en la figura 3, la cual se obtuvo al comparar la mediana calculada a partir de 13 transectos de un campo de ancho, de un límite capsular a otro, de cada individuo correspondiente a los grupos control (C, CS) y los grupos con las distintas dosis (B, A, M), se ve que los macrófagos aumentaron de 8 a 11 al ser sometido a un reto inmunológico, pero con respecto a los ratones suministrados con isoprinosine muestra que disminuyeron la cantidad de macrófagos de manera significativa con la dosis baja (B) a 2, pero fue aumentando progresivamente al igual que fuimos aumentando la dosis suministrada hasta que con la dosis a largo plazo, siendo la alta (M), llegó a ser de 7 siendo prácticamente igual al control normal (CS) de 8 (García, 2001).

Es importante mencionar la naturaleza de la infección, donde después de 15 días de la vacunación con BCG, el mismo periodo de tiempo en el cual se realizó la biometría hemática, la infección se encuentra en etapa 2 donde existe una relación simbiótica de la micobacteria que crece dentro de los macrófagos aumentando la cantidad de estos, pero sin causar daño

tisular, que posteriormente en la etapa 3 se desarrolla la inmunidad mediada por linfocitos T helper, donde estos proliferan activando a los macrófagos para destruir las micobacterias intracelulares (García, Sarmiento y Acosta, 2009).

Sabiendo esto una de las posible causas de que los macrófagos disminuyan en su cantidad con respecto al grupo suministrado con dosis baja (B) puede ser que, teniendo en cuenta que hay un aumento de células circulantes periféricas derivando en que sea más eficiente la hipersensibilidad mediada por linfocitos T que destruye a los macrófagos infectados, entraron a la fase 3 en menor tiempo que los ratones control con BCG (C) que se encuentran todavía en la fase 2 de la infección, reduciendo más rápido la población en el bazo de macrófagos infectados mostrando así una mayor eficiencia en la respuesta inmune (Janíčková et al., 2017) (Russell, Ronald, y Karlton, 1987).

De igual manera al ser una población normal de 8 macrófagos por campo de visión, al ir aumentando la dosis de isoprinosine que estimula la presencia de linfocitos T, además de la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos, los cuales aumentaron en presencia periférica y al tener actividad inmunoestimulante ayudo a los macrófagos del bazo a destruir más rápidamente a la bacteria lo cual indicaría que mientras más alta sea la dosis del IP se daría una respuesta inmunitaria más eficaz derivando así que el bazo recupere su población normal de macrófagos más rápidamente, como se muestra en la figura 3 que con la dosis alta (M) llega prácticamente al mismo número de células que el grupo control normal (CS) sospechando que la respuesta inmune si depende de la posología de isoprinosine (Agar y Marinovic, 2012).

Teniendo presente la relación de los resultados expuestos con la literatura se puede explicar de mejora manera lo que observa en la tabla 1 con respecto a la cantidad de leucocitos totales en la sangre periférica. Los mismos que pueden comportarse de igual manera que los macrófagos en el bazo, con la diferencia que disminuyen tanto en el control (C) como en el grupo con dosis baja (B) con respecto al control normal (CS), mientras que empieza aumentar

su número con la dosis media (A) y con la dosis alta (M) hasta que prácticamente iguala al control normal (CS) ya que cumple con el rango permitidos, el cual determina que pueden variar en ± 761 (Santos et al., 2016).

Esto se puede ver explicado debido a que el isoprinosine en un estado de inmunoestimulación, reinicia la función linfocitaria, mejora la blastogénesis en la población de monocitos y aumenta la producción de IgG, IFN gamma, IL-1 e IL-2, los cuales forman parte de la cascada de reacciones ante una infección bacteriana (Janíčková et al., 2017). Por lo que al tener una dosis baja (B) de isoprinosine se da este efecto de reinicio con lo que los glóbulos blancos totales se reducen en cantidad, mientras que al suministrar una dosis mayor del fármaco el sistema inmunológico modulado por el mismo va a recuperar su cantidad normal de células, teniendo en cuenta que al analizar la proporción de cada tipo de leucocitos presentes en la sangre periférica si se mostró un aumento significativo de las células encargadas de reaccionar ante una infección bacteriana como: monocitos, basófilos y neutrófilos, demostrando así que el isoprinosine si aumenta la actividad inmunológica ante la presencia de un agente bacteriano y al mismo tiempo se ve afectada esta por la dosis suministrada (Silva, Pantzartzi, y Votova, 2019). Sabiendo esto, al obtener la misma cantidad de linfocitos en la tabla 1 entre los tratamientos y el control solo con BCG (C), siendo estos significativamente menores (teniendo un rango límite de $\pm 4.5\%$) que el control sin intervención alguna (CS), puede deberse que al someter a un reto inmunológico causado por *Mycobacteria* y al mismo tiempo administrar isoprinosine el organismo prioriza la producción de basófilos, monocitos y neutrófilos.

CONCLUSIONES

El medicamento isoprinosine (IP) que ha estado en el mercado por casi 50 años ha sido estudiado a lo largo de las décadas para entender de mejor manera su efecto en el cuerpo humano, gracias a ello se ha ido comprendiendo mejor su forma de acción y se ha logrado

determinar cómo logra tener un efecto contra infecciones virales como herpes labial o genital, SSPE, influenza, varicela o adyuvante para el tratamiento de enfermedades autoinmunes causadas por virus. Por otro lado se logró confirmar a través del análisis de los resultados de las biometrías lo expuesto en estudios recientes (Mishra, Yabaji y Dubey, 2018), lo que sucede al suministrar IP a un grupo de animales y luego someterlos a un reto inmunológico contra individuos que solo sufrieron el mismo reto, teniendo como base de estudio a un grupo de ratones sanos, confirmando que el isoprinosine tiene un efecto inmunoestimulante a nivel periférico, es decir que ayuda en este caso específicamente a una mejor respuesta por parte de los basófilos, monocitos, neutrófilos. Del mismo modo al observar el efecto de IP a nivel tisular, se puede suponer que si mejora la respuesta ante un infección por *Mycobacterium*, ya que al mirar los resultados del conteo de macrófagos en el bazo, lo cuales son parte clave para destruir a esta bacteria, se observó una disminución de estas células inmunológicas en el grupo con dosis baja (B) pero fueron regresando a su normalidad mientras más alta sea la dosis, por lo que se sospecha que el IP no solo ayuda a la proliferación de células polimórficas a nivel periférico sino también a su eficiencia al momento de completar todas las fases de una infección por este agente microbiano en menor tiempo que en los ratones sin isoprinosine (C). En conclusión, se observó que las dosis de isoprinosine si afecta a la velocidad con la que un organismo responde a un reto inmunológico, demostrando que el IP si posee un efecto positivo como inmunomodulador ante una infección bacteriana y que depende de la posología suministrada, pudiendo sospechar que sirva para ayudar a tratar la tuberculosis causada por *Mycobacterium*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agar, A. y Marinovic, M. (2012). Inmunomoduladores Cap 39. En I. e. Palomo, *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica Tomo 02* (págs. 627-635). Talca, Chile.: Editorial Universidad de Talca.

- Becerril, R. (2009). Evaluación del tratamiento de la varicela con ribavirina o metisoprinol en niños. *Revista de Enfermedades infecciosas de pdiatria Vol. XXXIII Num 90.*, 41-47.
- Bera, J., Salapová, E. y Spajdel, M. (2016). Inosine pranobex is safe and effective for the treatment of subjects with confirmed acute respiratory viral infections: analysis and subgroup analysis from a Phase 4, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *BMC Infectious Diseases;16.*, 19-65.
- EASP. (1995). Inmunoestimulantes: muchas indicaciones, poca experiencia. *CADIME. Vol. 11. n. 4*, 13-16.
- Eberl, M. y Davey, M. (2014). *Neutrófilos*. Obtenido de British Society for immunology: <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/cells/neutr%C3%B3filos>
- García, M. (2001). Respuesta inmune a la infección por Mycobacterium tuberculosis. Una revisión de la literatura. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex, vol. 14-num. 2*, 114-128.
- García, M., Sarmiento, M. y Acosta, A. (2009). La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales. *Vaccimonitor v.18 n.1 Ciudad de la Habana*, 25-38.
- Hadden, J., Hadden, E. y Coffey, R. (1979). Isoprinosine augmentation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation. *American Society for Microbiology Journals Vol. 13, No. 2*, 382-387.
- Huttenlocher, P. y Mattson, R. (1979). Isoprinosine in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology*, 763-71.
- ICH GCP. (23 de junio de 2005). *Multi-Center Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study To Investigate the Effect of Isoprinosine in Immunodepressed Patients With Uncomplicated Generalized Lymphadenopathy*. Obtenido de International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice : <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT00002061>
- National Center for Biotechnology Information (2019 de febrero de 26). *Inosine Pranobex*. Obtenido de Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135449284>
- Janíčková, O., et al. (2017). The effect of Isoprinosine treatment on persistent infection of Balb/c. *Acta virologica 61*, 32-38.
- Lloberas, J. (19 de noviembre de 2004). *Actualizació en Immunologia*. Obtenido de Universitat de barcelona: <http://www3.udg.edu/ice/documentacio/immunologia/Tema%20III%20PDF.pdf>
- Mishra, A., Yabaji, S. y Dubey, R. (2018). Evaluation of Isoprinosine to be Repurposed as an Adjunct Anti-tuberculosis Chemotherapy. *Medical Hypotheses*.
- Nisman, M. (1973). Evaluación Clínica de la Isoprinosine en diversas enfermedades neurológicas. *Acta Medica Costo 16(2)*, 133-141.

- OMS. (enero de 2004). La vacuna antituberculosa . *Documento de posición de la Organización Mundial de la Salud*, págs. 1-14.
- Ponce, N. y Ruíz, A. (2016). Evolución clínica en pacientes hospitalizados con sintomatología de fiebre dengue que usan tratamiento convencional vs. tratamiento convencional más metisoprinol, de mayo a marzo en el Hospital de Niños León Becerra de Guayaquil, año 2015-2016. *Trabajo de Titulación de la carrera de medicina, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.*, 1-60.
- Prat, C., Domínguez, J. y Ausina, V. (2007). Mycobacterium bovis. *Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona*, 1-7.
- Russell, W., Ronald, K. y Karlton, C. (1987). Immune Modulators as antiviral Agents. *Dagnosis and treatment of viral infection* , 901-924.
- Santos, E., et al. (2016). Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo*, v. 53, n. 2, 138-145.
- Shams, S., Ngah, G. y Lotfy, O. (2019). Immunomodulating Effects of Isoprinosine in Vaccinated. *Pharmacology Department, Faculty of Veterinary, Zagazig University.*, 1-21.
- Silva, J., Pantzartzi, C. y Votova, M. (2019). Inosine Pranobex: A Key Player in the Game Against a Wide Range of Viral Infections and Non-Infectious Diseases. *Advances in Therapy*, 1878-1905.

ANEXO A: ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LOS 19 RATONES ESTUDIADOS

	Hígado	Pulmón	Bazo	Riñón
Ratón CS1	Sin lesiones	Sin lesiones	Ligeramente reactivo	Sin lesiones
Ratón CS2	Sin lesiones	Sin lesiones	Ligeramente reactivo	Sin lesiones
Ratón CS3	Sin lesiones	Sin lesiones	Ligeramente reactivo	Sin lesiones
Ratón A1	Sin lesiones	Evidencia de inflamación	Congestionado, presencia de células gigantes multinucleadas	Nefritis intersticial con acumulo de linfocitos
Ratón A2	Posible hepatotoxicidad	Atelectasia y enfisema	Congestionado, presencia de células gigantes multinucleadas	Sin lesiones
Ratón A3	Posible hepatotoxicidad	Foco aislado de inflamación	Congestionado, presencia de células gigantes multinucleadas	Nefritis intersticial con acumulo de linfocitos
Ratón A4	Posible hepatotoxicidad	Sin lesiones	Congestionado, presencia de células gigantes multinucleadas	Sin lesiones
Ratón M1	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra
Ratón M2	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra
Ratón M3	Sin lesiones	Atelectasia y enfisema	Congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón M4	Sin lesiones	Atelectasia	Congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón B1	Posible hepatotoxicidad	Sin lesiones	Ligeramente congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón B2	No se pudo analizar por mal almacenamiento de muestra	Sin lesiones	Ligeramente congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones

Ratón B3	Sin lesiones	Atelectasia	Ligeramente congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón B4	Posible hepatotoxicidad	Bronquitis, asociable con atelectasia	Ligeramente congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón C1	Sin lesiones	Sin lesiones	Congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón C2	Posible hepatotoxicidad	Sin lesiones	Congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón C3	Sin lesiones	Sin lesiones	Congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones
Ratón C4	Posible hepatotoxicidad	Bronquitis, asociable con atelectasia	Congestionado, presencia de células gigantes	Sin lesiones

**ANEXO B: CONTEO DE CÉLULAS (MACROFAGOS GIGANTES) POR
TRANSECTOS DEL BAZO CON OBJETIVO X10**

A1-20	A2-20	A3-20	A4-20	B1-20	B2-20	B3-20	B4-C20	C1-20	C2-20	C3-20	C4-20	C51-20	C52-20	M3-20	M4-20
5	4	3	9	1	1	7	2	13	7	7	11	6	14	14	5
4	4	4	6	5	1	3	4	15	17	4	16	7	8	13	7
4	3	7	7	7	3	5	4	14	11	9	9	9	7	8	5
8	6	5	4	0	2	2	2	14	16	10	20	6	7	11	8
4	6	5	3	1	2	4	4	5	13	8	14	4	9	6	4
3	5	7	5	2	3	2	1	16	14	5	21	17	12	12	7
2	1	6	4	3	1	2	3	12	12	13	11	8	9	13	9
2	8	1	3	1	1	1	2	7	6	12	8	7	13	7	12
3	4	3	8	1	1	3	1	12	10	11	9	10	8	7	5
4	8	3	4	3	1	1	1	17	12	17	10	8	6	9	2
2	7	4	4	1	2	3	1	14	11	12	13	8	12	10	3
4	6	5	7		3	3	2	23	8	11	13	5	14	9	1
4	5	4	3			1	4	12	9	6	4	5	10	9	1
4	5	4	4	1	2	3	2	14	11	10	11	7	9	9	5
4,00				2,00				11,00				8,00		7,00	
1,862110529				1,530476184				4,137789479				3,125813504		3,530298883	