



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Valoración de Liposomas como Adyuvantes
en la Producción en Sueros Hiperinmunes
Usando Veneno de Abeja como Inmunógeno**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a

Eduardo Bonilla Espinosa

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



MEXICO, D. F.

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



EXÁMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFA. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL: PROF. JOSE SULIVAN LOPEZ GONZALEZ
SECRETARIO: PROFA. ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS
1er. SUPLENTE: PROF. GUILLERMO GONZALEZ VILLAMAR
2do. SUPLENTE: PROF. GENARO JIMENEZ REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, SSA

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA

SUPERVISOR TECNICO:

DR. SALOMON CALDERON MANES

SUSTENTANTE:

EDUARDO BONILLA ESPINOSA

Agradecimientos:

A Dios, por la oportunidad de disfrutar de la vida.

A mis padres, Martha y Alfredo, por toda su comprensión y paciencia, por el apoyo que he recibido de ellos.

A mis hermanos, Alfredo, Juan Carlos, Martha Elena, Alfonso, Francisco, Gabriel y Ricardo, por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A Gena, por su cariñosa guía para aprender.

A todos mis tíos, primos, sobrinos y parientes políticos, por ser una gran y hermosa familia.

A la familia Zacatenco, por tantos momentos de diversión.

A Javier del Castillo y su familia, grandes amigos de la infancia.

Al equipo Fahrenheit: Raymundo, Manuel, Igor, Angel, Francisco, Bernardo, Ignacio, Alejandro, Jesús Alejandro y demás integrantes (incluyendo a sus familias), por la forma tan molona de mostrar su aprecio y apoyo.

A la generación 85 de la Facultad de Química, con especial agradecimiento a Norma, Criselda, Adriana, Jackeline, Gloria Edith, Carlos, Ricardo, Javier y David, por su apoyo y paciencia.

A la Q.F.B. Magdalena Acosta, por su inapreciable ayuda.

A la memoria de la Q.F.B. Martha Jiménez, una gran persona.

•

Reconocimientos:

Al Dr. Salomón Calderon Manes y al personal del Instituto Nacional de Higiene, de la Secretaría de Salud, por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| | | |
|-------------------|--|----|
| CAPÍTULO 1 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | JUSTIFICACIÓN | 2 |
| 1.2 | HIPÓTESIS DE TRABAJO | 2 |
| 1.3 | OBJETIVOS | 3 |
| CAPÍTULO 2 | GENERALIDADES | 4 |
| 2.1 | CARACTERÍSTICAS DE LA PONZOÑA DE ABEJA | 4 |
| 2.1.1 | Principales componentes de la ponzoña de abeja | 5 |
| 2.1.2 | Otros componentes | 7 |
| 2.2 | LIPOSOMAS | 8 |
| 2.2.1 | Métodos de preparación de los liposomas | 14 |
| 2.2.2 | Empleo actual de los liposomas | 18 |
| 2.3 | ADYUVANTES | 19 |
| 2.3.1 | Propiedades inmunológicas, convenientes e inconvenientes | 19 |
| 2.3.2 | Adyuvantes empleados | 20 |
| 2.4 | CARACTERIZACIÓN DE VENENOS Y ESTANDA- RIZACIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES | 21 |
| CAPÍTULO 3 | PARTE EXPERIMENTAL | 24 |
| 3.1 | REHIDRATACIÓN DE LA PONZOÑA DE ABEJA | 24 |
| 3.2. | ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA PONZOÑA DE ABEJA | 26 |
| 3.2.1 | Dializado de la ponzoña | 26 |
| 3.2.2 | Determinación del poder hemolítico | 26 |
| 3.2.3 | Determinación de la actividad de la fosfolipasa | 27 |
| 3.2.4 | Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀) | 28 |
| 3.2.5 | Obtención del "anaveneno" | 28 |
| 3.3 | ESTUDIO INMUNOGÉNICO DE LA PONZOÑA DE ABEJA | 29 |
| 3.3.1 | Preparación del inmunógeno | 29 |
| 3.3.2 | Inmunización de los animales de experimentación | 33 |
| 3.3.3 | Titulación de anticuerpos | 38 |

| | | |
|-------------------|-----------------------------|----|
| CAPÍTULO 4 | RESULTADOS OBTENIDOS | 41 |
| CAPÍTULO 5 | CONCLUSIONES | 69 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 70 |

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La Secretaría de la Salud produce varios sueros hiperinmunes heterólogos para aplicación en humanos. Concretamente produce dos antiponzoñosos: antiviperino y antialacrán y las antitoxinas diftérica y tetánica. En el primer caso se emplean animales, debido a la naturaleza de los inmunógenos que no se pueden aplicar a humanos para obtener sueros homólogos, posiblemente en un futuro se llegue a contar con sueros monoclonales, y en cuanto a las antitoxinas se siguen preparando en caballos debido a su bajo costo, comparativamente con las gammaglobulinas hiperinmunes de origen humano.

En el Instituto Nacional de Higiene (INH) de la Secretaría de Salud, las inmunizaciones se realizan de manera convencional usando adyuvantes, para potenciar la respuesta inmunológica del animal y lograr que el rendimiento sea lo más alto posible. Los que emplean, son el completo e incompleto de Freund y el gel de hidróxido de aluminio, cuyos efectos potenciadores son ampliamente reconocidos. Sin embargo, el adyuvante de Freund, que es el más activo, puede producir fibromas en los lugares de inoculación que causan molestias al animal. Un sistema de adyuvantes que se ha reportado con resultados satisfactorios es el empleo de liposomas. En el presente trabajo se evalúan como una alternativa para los esquemas de inmunización primaria y para el mantenimiento de altos títulos, utilizando la ponzoña de abeja como modelo de inmunógeno experimental, debido a que está constituido por péptidos y proteínas de diversos pesos moleculares, la mayoría pequeños, por lo que es un inmunógeno difícil de manejar para lograr una buena respuesta. En el presente estudio se empleó una ponzoña de fuente comercial obtenida de la especie *Apis mellifera*.

1.1 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad es bien conocida la efectividad de los primeros auxilios ante un ataque masivo de la abejas africanizadas, que consisten en la eliminación de los sacos que contienen la ponzoña mediante una navaja de hoja libre, con lo cual se impide que se difunda la ponzoña y se presente un desenlace fatal.

Sin embargo sería de gran utilidad contar con un suero hiperinmune frente a la ponzoña de abeja, de preferencia de origen caprino, para el tratamiento de los niños que sufrieron un ataque masivo de estos insectos, ya que por su talla pequeña la acción de la ponzoña es más enérgica.

También se podría utilizar en los adultos que por no haber recibido los primeros auxilios, presenten ya un cuadro de intoxicación, homologando la conducta terapéutica que se sigue con los pacientes que han sufrido una picadura de alacrán o una mordedura de serpiente venenosa.

1.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

En numerosos estudios se ha demostrado la efectividad de los liposomas como adyuvantes, por lo que es posible que utilizándolos para encapsular la ponzoña de abeja, ésta sea un buen inmunógeno y se facilite la obtención de un suero hiperinmune para el tratamiento de casos especiales de ataque masivo por abejas africanizadas.

1.3 OBJETIVOS

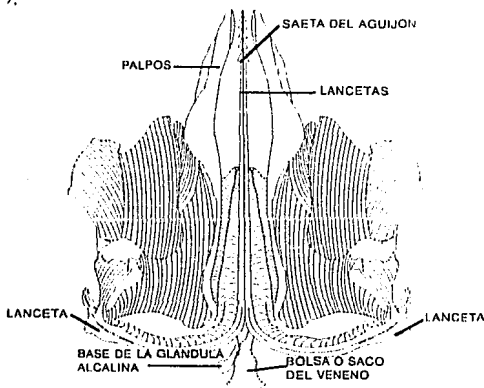
El presente estudio tiene como objetivos:

1. Evaluar la inmunogenicidad de la ponzoña de abeja encapsulada en liposomas, comparándola con la respuesta a este inmunógeno empleando como adyuvantes el de Freund, completo e incompleto, y el gel de hidróxido de aluminio, para posteriormente desarrollar la metodología para la fabricación del correspondiente suero hiperinmune de origen heterólogo.
2. Estudiar algunas de las propiedades biológicas de la ponzoña de abeja que pudieran emplearse como pruebas para determinar la potencia de los anticuerpos obtenidos, una vez ya estandarizadas.

CAPÍTULO 2 GENERALIDADES.

2.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA PONZOÑA DE ABEJA.

La ponzoña de abeja está clasificada como de baja actividad, y es difícil determinar con exactitud su composición debido a la gran variedad de compuestos presentes y que su obtención es un procedimiento laborioso, que requiere de gran cantidad de abejas para poder recolectar un volumen apreciable (1), sin embargo se cuenta en el mercado con la ponzoña desecada (2). El mayor problema para su estudio es la separación y caracterización de todos los componentes, debido al bajo peso molecular que tienen algunos, y a que muchos de ellos se encuentran en pequeña proporción. Se considera que un 90% del total del veneno es agua y en el restante 10% se encuentran los demás componentes y otros compuestos orgánicos. Se ha demostrado que la cantidad de componentes inoculados en un piquete de abeja es de 59 μg (3,4). El siguiente es un esquema del aguijón(5):



En este trabajo se estudian solamente dos componentes, la melitina y la fosfolipasa A-2. El primer componente tiene acción neurotóxica, se encuentra en mayor proporción y además posee la capacidad de lisar los eritrocitos de diferentes especies animales (3,6,7), aunque muchos no han sido estudiados todavía, se propone que el mecanismo de lisis es la alteración de la tensión superficial del medio, debido a fenómenos físicoquímicos al actuar como un detergente, provoca la destrucción de la membrana del eritrocito (7).

El otro componente que se estudia es la fosfolipasa A-2, que aún cuando se presenta en menor proporción en la ponzoña, ya que por su tamaño molecular puede producir una respuesta inmunológica (8,6,3).

2.1.1. Principales componentes de la ponzoña de abeja.

HISTAMINA: Es una amina de bajo peso molecular que está presente en bajas concentraciones, entre 0.1 a 1.5 % de la ponzoña total. Es muy soluble en agua, alcohol, cloroformo en caliente, poco soluble en cloroformo frío e insoluble en éter (8,6).

FOSFOLIPASA A2: Es una proteína cuya proporción en la ponzoña seca es de aproximadamente 12%, su peso molecular varía de 19.0 KD (Determinado por el método de N-terminal) a 14.5 KD (Por el método de Edman). Es una enzima que contiene en su estructura azufre y carbohidratos. Se cree que la diferencia de peso entre los datos reportados por los dos métodos se debe a los carbohidratos. Tiene 128 residuos de aminoácidos de los cuales 8 son grupos -SH no libres y se considera que el aminoácido 13 es el punto de unión a los carbohidratos que constituyen la molécula. Su punto isoelectrico es a pH de 10.0 (6,8,9).

Se desnaturaliza a temperaturas mayores de 65°C, presenta su actividad máxima frente a la yema de huevo a 55°C, es mas activa que la fosfolipasa A del veneno de *Crotalus* cuando se utiliza lecitina de huevo como sustrato y requiere la presencia de iones calcio (3,8,6,9,10,11).

HALURONIDASA: Esta enzima esta presente en concentración del 3 al 9% en ponzoña seca, tiene un alto peso molecular que todavía no se ha determinado con exactitud, se supone está entre 35.0 y 50.0 KD. En su composición se ha encontrado glucosamina, manosa, galactosa, fucosa y tirosina. Es diferente a otras hialuronidasas, ya que tiene mayor actividad que la obtenida a partir de testículos de toro. El pH óptimo de actividad se encuentra entre 4.0 y 5.0, se inhibe en plasma humano citratado o heparinizado, es más activa en soluciones con fosfato de sodio, acetato de sodio o cloruro de sodio. Es estable a 50°C en pH de 5.0 (6,8,9,10,11,12).

MELITINA: Constituye el componente principal por su concentración, es un péptido que comprende aproximadamente el 50% del peso seco de la ponzoña. En su composición tiene 26 aminoácidos en total: ácido aspártico, tirosina, fenilalanina, histidina y glicina como grupo terminal; su peso molecular es bajo, del orden de los 2.84 KD, aunque no se considera una enzima, se ha demostrado la existencia de un precursor; la promelitina. Este compuesto varía ligeramente entre las diferentes especies de abejas, pero su actividad es similar. Tiene características básicas e hidrofóbicas debido a su composición y estructura, además presenta actividad sobre la tensión superficial disminuyéndola, se cree que adopta una estructura micelar en agua. Su punto isoeléctrico se presenta en un pH de 12.2 (3,8,12,13).

2.1.2. Otros componentes:

PEPTIDO MCD: Es un péptido degranulante de mastocitos, se encuentra del 1 al 2% del peso seco total, su peso molecular es de aproximadamente 2.59 KD, tiene 22 aminoácidos y dos puentes disulfuro debidos a 4 cisteinas. Se le conoce también como péptido 401 (3,12).

APAMINA: Es otro péptido pequeño con peso molecular de 2.31 KD, constituye de un 2 a un 4% de peso seco, en su composición no se encuentran aminoácidos aromáticos (6).

MINIMINA: Compuesto peptídico que recibe este nombre por su efecto en el crecimiento de larvas de mosca, su peso molecular es de 6.0 KD, no se conoce todavía su cantidad en peso seco (6,8).

Estos son los datos más generales de los componentes de la ponzoña de abeja reportados en la literatura y varían según la especie de la cual se obtuvo el producto.

La ponzoña de abeja es un alérgeno que ocasiona reacciones anafilácticas en personas sensibilizadas (14,15), siendo éste un problema de salud de mayor importancia que sus actividades neurotóxica y enzimática (Fosfolipídica, hemólisis, necrosis, etc.). Sin embargo, en los casos de hipersensibilidad, con la terapia inmunológica se obtienen buenos resultados al inmunizar a los pacientes con ponzoña de abeja para inducir la producción de IgG protectora que bloquea la acción de la IgE (16,17,18). La hipersensibilidad puede presentarse en los

animales productores del suero pero se espera obtener, como sucede en la producción de otros sueros antiponzoñosos, la respuesta primaria de IgG protectora para lograr un óptimo rendimiento en la producción del suero y que no se obtenga una respuesta en IgE.

2.2. LIPOSOMAS.

Los liposomas se conocen desde 1961, fueron desarrollados por Alec D. Bagham en Inglaterra; su hallazgo fue casual cuando evaluaba los efectos de los fosfolípidos en coágulos de sangre; al adicionar agua y colocando una muestra al microscopio, observó pequeñas micelas que presentaban una doble capa de lípidos, muy parecida a la membrana celular (19), los liposomas son partículas microscópicas que presentan formas muy variadas, que pueden tener en su constitución diferentes lípidos, además del producto o productos que se quieren encapsular en ellos. Por los componentes que lo forman, presentan carga eléctrica la que permite que sean absorbidos o no por mucosas y membranas, influyendo en el tiempo de permanencia en un organismo. En su interior pueden contener la o las fases líquidas.

Sus características varían según los componentes grasos que se empleen en su preparación. Hay una gran cantidad de formulaciones y métodos de preparación, aun cuando el método básico reportado por Bagham sigue empleándose con pocas modificaciones. Según la estructura que presenten las micelas pueden ser multilaminares o unilaminares, dependiendo de la cantidad de capas lipídicas que lo conformen. Su tamaño puede ser muy variado y es posible regularlo prácticamente a voluntad (19,20,21). Se consideran dos formas básicas de clasificación: Micelas multilaminares, en inglés MLV's (Multilamellar vesicles),

cuando tienen varias membranas una dentro de otra separadas por una fase acuosa y las micelas unilaminares, en inglés ULV's (Unilamellar vesicles), en las cuales sólo hay una membrana lipídica que encierra una fase acuosa. Su tamaño puede variarse con un tratamiento posterior como las radiaciones ultrasónicas.

Por su versatilidad, los liposomas se han utilizado para múltiples propósitos, por ejemplo debido al parecido que tienen con las membranas celulares se usan para estudios sobre su comportamiento permeable, se emplean también para la encapsulación de fármacos, como adyuvantes, y hasta como soporte de reactivos para determinaciones en pruebas inmunoquímicas, como por ejemplo el LILA (Liposome immune lysis assay), método desarrollado por Ishimori (22,23,24).

Desde un principio, se han usado como vehículos para la administración de fármacos (19,21,25), en especial los de alto riesgo, que pueden producir efectos nocivos en dosis altas (19,21). Los liposomas posibilitan su administración en cantidad menor para obtener el efecto deseado, causando un mínimo de efectos secundarios en el paciente. Pueden utilizarse en fármacos que se caracterizan porque al ser administrados se diluyen en el torrente sanguíneo y gran cantidad del principio activo es eliminado sin cambio alguno, o es degradado antes de llegar al sitio "blanco" (19,26). Los liposomas pueden quedar en los espacios extracelulares o en las células del sistema reticuloendotelial, permaneciendo semanas antes de ser degradados por los macrófagos y otras células del organismo.

Al realizar pruebas con los liposomas se demostró que los compuestos que forman parte de su estructura no causan trastornos en el organismo y por ser material inerte no producen reacciones secundarias, debido a que en su

preparación se utilizan fosfolípidos y lípidos de gran simplicidad molecular, como por ejemplo colesterol y fosfatidilcolina o cualquier otro fosfolípido, como estos compuestos se encuentran en cualquier especie animal, se evita el problema de una respuesta no deseada al aplicar un fármaco.

Por definición un lípido es una sustancia no miscible con el agua, como por ejemplo triglicéridos, colesterol, la vitamina D, etc. y por lo tanto es posible encontrar en la naturaleza lípidos que por su complejidad y tamaño puedan ser inmunológicamente activos. Tenemos como ejemplo el lípido A, estudiado en trabajos realizados con liposomas, es un componente de los lipopolisacáridos bacterianos con el que se ha reportado una respuesta inmológica contra los liposomas en si, cuando se ha utilizado como componente estructural de las micelas, que puede llegar a estimular la formación de anticuerpos contra las membranas celulares del sujeto de experimentación, dependiendo de las proteínas de superficie de las células del organismo (27,28). En esos estudios se destaca que el lípido A es capaz de crear una respuesta inmunitaria contra los liposomas, sin necesidad de estar unido a ellos, al administrarse simultáneamente o en forma aislada. Los anticuerpos obtenidos de esa inmunización reaccionan contra los liposomas solamente cuando el lípido A forme parte de su estructura (28).

En los primeros ensayos, al administrarse a un organismo el fármaco encapsulado en liposomas, no se obtenía el efecto deseado, porque el fármaco no llegaba al lugar en donde se requería. Si la vía de administración fue oral, la liberación del fármaco ocurrió a nivel intestinal, dando el liposoma una protección moderada al principio activo al pasar por el estómago, pero no más allá de ese punto (19,21,23). En algunas pruebas se aplicó en animales por vía intravenosa (29), y

se determinó el tiempo adecuado que pudieran estar los liposomas disponibles para la liberación del fármaco (De días a semanas). Sin embargo, por la acción fagocitaria de los macrófagos disminuye el efecto del fármaco al ser degradado antes de llegar al sitio "blanco" (19). En la aplicación por vía subcutánea o intramuscular, la difusión de liposomas en el organismo se vió muy limitada porque permanecieron en el espacio extracelular, sin llegar al torrente sanguíneo o linfático, lográndo una mayor permanencia del fármaco, pero con un efecto muy localizado en el área de aplicación (25,29,30,31).

El tamaño de los liposomas también permite que los macrófagos los reconozcan como extraños y al ser fagocitados, se presenten dos posibilidades para el fármaco: los liposomas son degradados rápidamente, por la acción de enzimas, liberando el fármaco y difundiendo éste por todo el organismo, favoreciendo su eliminación por vía renal sin sufrir modificaciones metabólicas de importancia. La segunda posibilidad consiste en el metabolismo del fármaco después de que el liposoma es degradado por el macrófago. En ambos casos no se obtiene el efecto terapéutico deseado (25,26). Por la vía subcutánea, intramuscular e intravenosa, los liposomas son afectados por la acción de los macrófagos pudiendo desarrollarse, en algunos casos, una respuesta inmunológica contra el fármaco al ser éste presentado como inmunógeno (19,32).

Los fracasos que se presentaron con los liposomas como forma farmacéutica se debieron a la falta de control sobre la dirección deseada al momento de administrarlos, en aquellos casos que requería una acción en un lugar determinado. Por el contrario, dieron buenos resultados en aquellos casos que no se requería un lugar determinado de acción. Por ejemplo, al ser utilizados como vehículos de administración de fármacos para tratar enfermedades del sistema

reticuloendotelial, micosis sistémicas, pielonefritis y en cáncer, es decir, en padecimientos que pueden encontrarse diseminados en el organismo (20).

Tomando como unidad un liposoma, y aún siendo un cuerpo extraño, por su naturaleza lipídica es poco probable que un organismo monte una respuesta inmune específica contra los lípidos, debido a la forma en que pueden ser eliminados los liposomas, aunque sí es posible que se monte contra las sustancias contenidas en él o en su superficie. La aseveración anterior sirve de fundamento para estimar el tiempo de liberación de las sustancias administradas, que está dado por la capacidad de los liposomas de soportar la degradación de sus componentes, lo que está directamente relacionado con la resistencia que presente la membrana, ya que la eliminación de la sustancia se retarda más y permite una mayor permanencia de ella, comparativamente con la administración de la sustancia sola (19,20,33). En la aplicación de fármacos, a través de liposomas, y dependiendo de la preparación de los mismos y de su procesamiento posterior, existe la posibilidad de que se ocurra lo siguiente: A) parte del fármaco permanezca en solución fuera de los liposomas, B) parte quede en la superficie y C) parte permanezca encapsulado en los liposomas al momento de ser administrado el medicamento en el organismo, así el efecto del fármaco (A) comienza a ejercerse inmediatamente y tiempo después actuará el fármaco que esté en los liposomas (B,C), con lo que se logra un mayor tiempo de permanencia del fármaco en el organismo, al evitar su rápida eliminación por vía renal o por metabolismo en el hígado, sin tener que aplicar dosis elevadas y repetidas para conseguir ésto (33), como sucede con otras formas farmacéuticas. El éxito logrado con las microesferas de liberación controlada ha resuelto completamente este último problema, y los trabajos con liposomas han quedado a nivel de

investigación para éste y otros campos más, aunque en algunos casos pueden tener ya aplicaciones prácticas (19).

Los liposomas pueden utilizarse en dos formas de asociación : La sustancia es cubierta por la doble capa lipídica durante la encapsulación, con lo que se mantendrán en el compartimiento acuoso del liposoma. En el segundo caso, la sustancia puede estar expuesta en la superficie del liposoma, al quedar intercalados e incluidos en la estructura de la membrana durante la encapsulación. Para fines inmunogénicos es importante la segunda forma de presentación de la sustancia, debido a que imita una célula con sitios antigénicos en su superficie lo que permite obtener una respuesta inmune contra este compuesto. Dependiendo de la cantidad expuesta del inmunógeno, los macrófagos podrán tener la posibilidad de reconocerlo como extraño más fácilmente, logrando así la fagocitosis del liposoma y su posterior degradación por las fosfolipasas que contienen esas células. Si los inmunógenos se aplican por vía intravenosa en los animales de experimentación, llegan al bazo o al sistema linfático y éste puede ser el primer contacto con las células del sistema inmune, logrando obtener una respuesta del organismo contra el inmunógeno (20,34,43,44,).

En resumen, los liposomas cumplen ciertas características que los hacen un buen vehículo para la administración de ciertas sustancias que en otras condiciones no logran despertar una buena respuesta inmunitaria en el organismo, los macrófagos los reconocerán como extraños, iniciando la respuesta inmunológica. Los lípidos, al ser degradados por las células que los fagocitaron, no presentan problemas por la liberación de productos tóxicos o nocivos por su metabolismo. Por último hay una gran variedad de formas de preparación y muchas de ellas son fáciles y no presentan interferencias con las sustancias administradas.

2.2.1. Métodos de preparación de liposomas.

Las técnicas de preparación de los liposomas son muy variadas, sus características cambian de acuerdo al método de preparación, además dependen del tipo de lípidos utilizados en las micelas. Básicamente su preparación consiste en agregar una fase acuosa a los lípidos, agitando para favorecer la formación de las micelas. El método comunmente empleado es por evaporación del disolvente, básicamente el desarrollado por Bagham. En este método los lípidos se disuelven en éter, cloroformo, alcohol o mezclas de ellos, y se forma una película sobre las paredes del recipiente de vidrio al evaporar el disolvente con calor o eliminándolo por vacío, posteriormente se agrega la solución que contiene la sustancia a encapsular y por medios mecánicos se desprende la película favoreciendo la encapsulación del medio acuoso (20,26,35,36,37). Los liposomas obtenidos pueden tratarse para variar sus características, ya sea por ultrasonido para fragmentarlos más, o filtrando las suspensiones y lavando para obtener los liposomas y la sustancia encapsulada, o se puede utilizar la separación por tamaños en cromatografía de columna o por último se dejan como se prepararon permitiendo que las sustancias queden tanto dentro de las esferas como en la fase acuosa (26,35,36,38,).

Por la gran disponibilidad de lípidos y por las diversas técnicas de preparación, se pueden variar las características de los liposomas (19,20,21). Como ejemplo se dan a continuación algunos métodos de preparación, así como las formulaciones de los liposomas:

Método 1:

| | relación molar |
|-----------------------------|----------------|
| Dipalmitoilfosfatidilcolina | 1.0 |
| Acido palmítico | 1.0 |
| Cloroformo | cbp disolver |

Se disuelven los lípidos en el cloroformo, se evapora en rotavapor a 50°C hasta formar una película en las paredes del recipiente, se enfría a temperatura ambiente, se agrega la fase acuosa conteniendo la sustancia a encapsular y se agita en vortex hasta desprender la película. Se enfría en nitrógeno líquido y se liofiliza. Para emplearlos se rehidratan con agua destilada a temperatura ambiente. Con este procedimiento se obtienen micelas unilaminares de tamaño muy variable (35).

Método 2:

| | relación molar |
|------------------|----------------|
| Fosfatidilcolina | 1.5 |
| Colesterol | 1.0 |
| Estearilamina | 0.5 |
| Cloroformo | cbp disolver |

Se disuelven los lípidos en el cloroformo, se evapora en rotavapor a 37°C hasta formar una película en las paredes del recipiente, se agrega una solución 10^{-3} M de NaCl que contiene la sustancia a encapsular y se agita en vortex 5 min, los liposomas resultantes se someten a sonicación durante 15 minutos. El tamaño resultante es de aproximadamente $0.595 \pm 0.383 \mu\text{m}$. Estos liposomas son unilaminares (36).

Método 3:

| | relación molar |
|-------------------|----------------|
| Lecitina de huevo | 28.0 |
| Ergosterol | 2.3 |
| Anfotericina B | 1.0 |
| Cloroformo | cbp disolver |

Se disuelven los lípidos en el cloroformo junto con la anfotericina B, que en este caso formará parte de los liposomas, y la solución se distribuye en frascos ampulita. Se evapora el cloroformo con vacío hasta formar una película en la superficie de los recipientes. Se almacenan protegidos de la luz, a -20°C , en atmósfera de nitrógeno. Para utilizarlos se agrega agua destilada, haciéndola pasar a través de un filtro para esterilizarla, y se agita vigorosamente para rehidratar los liposomas, agitando hasta separar la membrana lipídica y obtener la suspensión⁽³⁹⁾.

Método 4:

| | relación molar |
|--------------------------------|----------------|
| L- α -fosfatidilcolina | 4.5 |
| Acido L- α -fosfatídico | 0.7 |
| Colesterol | 5.0 |
| Tween 80 | variable |
| Tolueno/metanol(50:50) | cbp disolver |

Se disuelven las sustancias en la mezcla de tolueno/metanol, se evapora con nitrógeno gaseoso hasta formar la película en las paredes del recipiente, se agrega una solución balanceada de fosfatos, donde se encuentra la sustancia que se va a encapsular, y se sonicán durante 20 minutos para formar los liposomas. Se

centrifuga a 3600 g durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante, el sedimento se corre en una columna con Sephadex G-50 para separar los liposomas según su tamaño. Los liposomas resultantes son multilaminares por la acción del surfactante (Tween 80), su tamaño varía de 70 a 200 nm⁽²⁵⁾.

Método 5:

| | relación molar |
|-----------------------------------|----------------|
| Dipalmitoilfosfatidilcolina | 7.0 |
| Fosfatidilglicerol | 1.0 |
| Colesterol | 2.0 |
| Eter/cloroformo/metanol (9/4.2/1) | cbp disolver |

Se disuelven los lípidos en la mezcla eter/cloroformo/metanol se agrega la sustancia a encapsular disuelta en amortiguador de fosfatos, se purga el recipiente con nitrógeno, y se sonica en baño de agua a 4°C durante 5 min. Los disolventes orgánicos se eliminan en rotavapor a 30°C. Se purga el frasco con nitrógeno y se incuba a 45°C durante 30 minutos. Se lavan los liposomas con solución 10 mM de fosfatos (pH 7.2) conteniendo 150 mM de NaCl y se centrifuga, la operación se repite dos veces más. Este tipo de micelas se conoce como liposomas de fase reversa o REV (Reverse phase vesicles) ⁽²⁰⁾.

Como puede apreciarse en las formulaciones, la composición de los liposomas requiere de un lípido anfipático, como un fosfolípido, que cumpla los requerimientos necesarios para formar las membranas de doble capa. Los demás lípidos tienen la función de dar forma y carga eléctrica al liposoma. Otra particularidad que se puede apreciar es la necesidad de emplear agentes surfactantes que permitan la formación de liposomas multilaminares. En el caso

del método No. 3 el compuesto en estudio, anfotericina B, se incluye durante la formación de la película de lípidos para posteriormente hidratarlos y tener en suspensión los liposomas. También es importante destacar que no importando la formulación, se requiere de medios mecánicos para propiciar la formación de los liposomas al desprender la película de las paredes del recipiente o formar las micelas en el medio acuoso, como en el caso de los liposomas de fase reversa, para que engloben la sustancia presente en la fase acuosa.

2.2.2. Empleo actual de los liposomas.

Actualmente los liposomas tienen una gran variedad de aplicaciones, la mayoría está encaminada a la encapsulación de fármacos, por ejemplo, como el empleo de la doxorubicina, para la terapia antitumoral en humanos a escala clínica (26, 40), en otros casos como productos cosméticos, en la industria de alimentos, como adyuvantes para diferentes inmunógenos, para su estudio como modelos de membranas celulares (26), de sistemas más complejos como el epitelio corneal (41), soporte de reactivos para pruebas, como la técnica LILA (Liposome immune lysis assay), desarrollada por Ishimori para la determinación de anticuerpos contra albúmina humana, en la cual solo se necesita cambiar la proteína o la sustancia en el liposoma para poder determinar diversos anticuerpos (22), o como partículas inertes para soporte de reactivos, sustituyendo a la bentonita o a las partículas de látex (36). Estos cuantos ejemplos dan una idea de la versatilidad del empleo de los liposomas y de su potencial que es bastante amplio para muchos campos.

2.3. ADYUVANTES.

Los adyuvantes cumplen la función de potenciar la respuesta del organismo ante el estímulo de un inmunógeno, el cual si se aplicara sólo no estimularía la producción de títulos altos de anticuerpos como cuando se usan con un adyuvante. Potencian la respuesta inmune al retener más tiempo el inmunógeno en el organismo, incrementando la fagocitosis del mismo, además favorecen la inflamación con lo que aumenta la presencia de linfocitos y macrófagos en la zona de aplicación. En inmunología se conocen también otras sustancias que estimulan al sistema inmune, que se denominan inmunoestimulantes, las que producen una respuesta inespecífica y transitoria de la actividad inmunológica, es decir, aumenta su respuesta pero de manera general reaccionando contra todo sin distinguir inmunógenos, esto se conoce también como respuesta anamnésica inespecífica, lo que puede dar como resultado que los sueros obtenidos tengan alta concentración de otros anticuerpos no deseados y que la cantidad total de anticuerpos contra el inmunógeno aplicado no sea la adecuada (42,43).

2.3.1. Propiedades inmunológicas, ventajas e inconvenientes.

Uno de los retos inmunológicos, en la producción de sueros, es la obtención de altos títulos de anticuerpos protectores y para ello se emplean adyuvantes adecuados. Varios de los adyuvantes, que se mencionarán a continuación, tienen grandes desventajas que limitan su uso. Los adyuvantes se utilizan para la obtención de sueros hiperinmunes a escala de producción. También se adicionan a las vacunas constituidas por virus inactivados y a los toxoides, tanto para uso humano como para animales (42,43).

2.3.2. Adyuvantes empleados.

Los dos adyuvantes más empleados en el Instituto Nacional de Higiene, de la SSA, son el Adyuvante de Freund (Completo e incompleto) y el gel de $Al(OH)_3$, en el presente trabajo se compararán éstos con los liposomas ya que varios autores han comprobado su efectividad como adyuvantes.

A) Adyuvante Incompleto de Freund: Consiste en aceite mineral, por ejemplo Bayol F, un agente surfactante, como Arlacel A al 15% v/v y la suspensión acuosa del inmunógeno. No induce estados de hipersensibilidad retardada, ni actúa sobre la inmunidad celular. Al igual que el adyuvante completo, estimula la respuesta secundaria y puede inhibir la inducción de tolerancia al inmunógeno, llegando en algunos casos a romper la tolerancia. El efecto que tiene es doble: retarda la eliminación del inmunógeno e incrementa su difusión, pero forma granulomas en el sitio de la inoculación. Su empleo continuo es seguro ya que no induce artritis.⁽⁴³⁾

B) Adyuvante Completo de Freund: La fórmula del adyuvante completo es la misma que del incompleto, pero va adicionado de bacterias inactivadas como *Mycobacterium tuberculosis* o *Propionobacterium acnes*. Los componentes solubles e insolubles de las paredes de la bacteria, potencian todavía más la respuesta del organismo que la simple emulsión de aceites minerales y el inmunógeno. El adyuvante de Freund tiene un gran efecto con dosis pequeñas de inmunógeno, es eficaz cuando se usa con haptenos y con antígenos muy variados. Se considera que el adyuvante completo de Freund sólo es activo sobre las respuestas a inmunógenos timodependientes. Como característica sobresaliente el adyuvante completo estimula más la producción de IgG que de IgM, en particular

de IgG₂. Se ha demostrado que desarrolla reacciones de hipersensibilidad retardada, la aplicación de este adyuvante en forma repetida puede inducir artritis y produce fibromas en el sitio de la inoculación (42,43).

C) Gel de Hidróxido de Aluminio [Al(OH)₃]: Al igual que los geles de otras sales inorgánicas y orgánicas, por ejemplo hidróxido de magnesio, fosfato de aluminio, sulfato de berilio o alginato de calcio, actúa formando un granuloma en el sitio de aplicación, el cual consta básicamente de macrófagos. La liberación del inmunógeno ocurre lentamente consiguiéndose que después de la respuesta primaria se presente la respuesta secundaria con mayor producción de IgG₁ en vez de IgG₂ a diferencia del adyuvante incompleto de Freund, tiene el inconveniente de propiciar el estado de hipersensibilidad con reacción de tipo retardado (42,43).

2.4. CARACTERIZACION DE VENENOS Y ESTANDARIZACION DE SUEROS HIPERINMUNES.

Los pasos requeridos para la elaboración de cualquier antiveneno o suero hiperinmune varían de acuerdo con la especie animal de donde se obtiene el veneno y de la especie en donde se producirá el suero. La metodología se puede resumir en los siguientes puntos (45):

A.- Obtención y conservación de las muestras de veneno y caracterización de la actividad letal del veneno: En México se producen sueros frente a la ponzoña de los géneros *Crotalos* y *Bothrops* y además de alacranes del género *Centruroides*. En el caso de las serpientes es posible mantenerlas en cautiverio y obtener periódicamente el veneno, el cual se seca para su conservación. Para obtener la

ponzoña de los alacranes se atrapan en la región en que habitan para quitarles la glándula venenosa, que se seca al sol. Para su empleo se trituran para obtener el veneno junto con algunas proteínas estructurales. También se puede obtener el veneno sin matar a los alacranes por medio de descargas eléctricas "ordeñando" periódicamente a los animales. Para la conservación de las ponzoñas se pueden refrigerar, congelar, desecar o liofilizar. Para cada lote de veneno obtenido se realiza la determinación de su potencia mediante la DL₅₀ para poder establecer las dosis que se aplicarán a los animales de producción.

B.- Producción de la respuesta inmune inicial, mantenimiento y seguimiento del proceso: Para la producción a gran escala generalmente se utilizan caballos, debido al gran volumen de plasma que se obtiene en cada cosecha. Los animales que se emplean deberán ser jóvenes, sanos y no haber sido empleados para obtener otros anticuerpos. El primer paso en el control de los animales es la cuarentena, donde se comprueba que están clínicamente sanos.

La inmunización primaria se obtiene al administrar el veneno al animal de producción empleando como adyuvantes el completo e incompleto de Freund y gel de alúmina. Los intervalos de inoculación dependen tanto del animal de producción como del veneno utilizado; por ejemplo, en la inmunización en caballos con veneno de serpiente de coral, se puede comenzar con una dosis de 200 mg hasta llegar a los 500 o 1000 mg (45), aunque siempre el indicador de las dosis a administrar es la DL₅₀. Los animales que se utilizan para la producción deben vigilarse constantemente y recibir la atención veterinaria que requieran en cualquier momento del esquema de inmunización o de mantenimiento, debido a que soportan un reto inmunológico fuerte, y la actividad propia del veneno. Al obtener el título de anticuerpos deseado, se realiza la primera sangría de cosecha,

se deja descansar a los animales por un mínimo de 40 días y se aplica un esquema de mantenimiento para evitar que el título de anticuerpos baje, se deja descansar a los animales y se procede nuevamente a realizar la sangría de cosecha. Todo el proceso se controla mediante la determinación del título de anticuerpos en sangrías de prueba. En cada sangría de cosecha se procede a la plasmaféresis. Así se continua hasta que baja el título de anticuerpos en los animales o presentan degeneración almidonada del hígado y son sacrificados.

C.- Obtención, purificación y distribución de los sueros hiperinmunes: Después de realizar la sangría de cosecha, cuyo volumen depende de la especie animal empleada, el plasma se somete a un proceso de purificación que puede serla precipitación con sales inorgánicas neutras o con alcohol en frío (Método de Cohn).

Durante el proceso, así como al producto purificado se le realizan pruebas de control, en las cuales se verifica su potencia protectora, esterilidad, inocuidad, ausencia de pirógenos, su pureza por medio de inmunoelectroforesis, presencia de sólidos totales, determinación de pH, proteínas, cloruros y conservador.

Para decidir si la presentación es líquida o liofilizada se consideran las zonas de distribución, donde hay mayor posibilidad de que ocurra un accidente, para permitir así su almacenamiento y transportación óptimas (45).

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REHIDRATAACION DE LA PONZOÑA DE ABEJA

Se utilizó ponzoña de la abeja *Apis mellifera*, obtenida de fuente comercial*. Para su rehidratación se redisolvieron los cristales en solución salina isotónica (ssi), a una concentración del 1%, que se empleará en la mayor parte de las pruebas. Esta concentración se puede variar ya sea que se vaya a emplear como inmunógeno o como pruebas de control. En cada lote se preparó la cantidad necesaria para una semana.

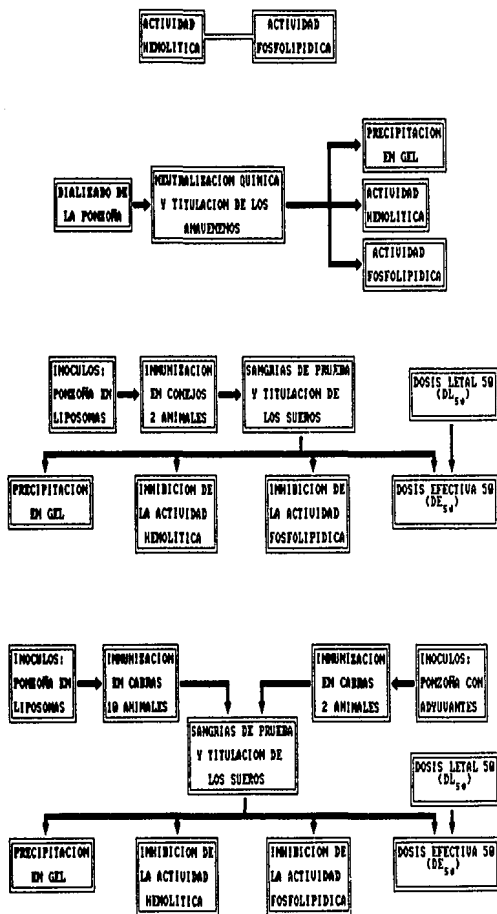
La razón de utilizar ponzoña seca, obtenida de fuente comercial, fue el contar con un producto estable y homogéneo, permitiendo conservarla durante años a -15°C mientras el envase permanezca cerrado, o meses si ya fue abierto. Para los fines de este trabajo, la solución se conserva estable entre 0 y 4°C durante algunas semanas.

Al llevar el producto desecado a una concentración del 1% se tiene aproximadamente una dilución 1:100 de la ponzoña desecada. Se eligió este valor para tener un volumen suficiente para las pruebas *in vitro* y las inoculaciones ya que a esta concentración tiene buena potencia inmunogénica y reactiva. El desarrollo del proyecto se presenta en el diagrama de la página siguiente:

* SIGMA Chemical Co. Cat. No. V-3125

DIAGRAMA DE TRABAJO

PRUEBAS DE VALORACION DE LA PONZOÑA Y DE LOS SUEROS OBTENIDOS



3.2 ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA PONZOÑA DE ABEJA.

3.2.1 Dializado de la ponzoña.

La ponzoña se dializó en una membrana de 12 mm de diámetro y con poro del número 2, del dializado se recuperaron las moléculas de mayor tamaño y de la solución de diálisis las de menor tamaño molecular, para posteriormente estudiar la actividad hemolítica y enzimática de las fracciones. Las diálisis se realizó con ponzoña al 10%, contra solución salina isotónica, a temperatura ambiente, por un periodo de 24 h. El dializado se llevó al volumen original (5.0 ml). A esta fracción se le denominó "de alto peso molecular" (FAPM) por no pasar por la membrana. El dializante se concentró por evaporación a 40°C hasta un volumen de 5.0 ml, a esta fracción se le denominó "de bajo peso molecular" (FBPM), Posteriormente las fracciones resultantes se diluyeron 1:10 para trabajar la ponzoña en una concentración aproximada del 1%, que es como se reportan los resultados.

3.2.2 Determinación del poder hemolítico.

La ponzoña de abeja causa la lisis de los eritrocitos de diversas especies. Los mecanismos por los cuales la produce son dos; la melitina ocasiona cambios en la tensión superficial del medio afectando a la membrana celular hasta su ruptura. Este péptido también aumenta la actividad de la fosfolipasa A-2 sobre los fosfolípidos de la membrana celular, como por ejemplo la lecitina que se transforma a isolecitina, incrementando la permeabilidad a los iones y al agua, produciéndose la hemólisis. Cuando se determina la potencia hemolítica de la ponzoña se está midiendo la actividad de la melitina y de la fosfolipasa A-2.

Para esta prueba se prepararon diluciones seriadas en ssi de la solución de trabajo, considerando a ésta como una dilución 1:100 de la ponzoña natural, en incrementos de 2 desde 1:1,000 hasta 1:1,024,000. A 0.5 ml de cada dilución se le adicionó 0.1 ml de una suspensión en ssi de eritrocitos equinos, previamente lavados y ajustados a la concentración del 2% y de no más de 4 días de obtenidos. El volumen de cada tubo se ajustó a 1.1 ml con ssi. Se incluyó un control negativo constituido por 0.1 ml de la suspensión de eritrocitos y 1.0 ml de ssi, así como un control positivo con 0.1 ml de eritrocitos y 1.0 ml de agua destilada. Las mezclas se dejaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos para facilitar su lectura. El título fue la máxima dilución que produjo hemólisis total y correspondió a la dilución 1:512,000 para la ponzoña sin dializar y de 1:64,000 para las fracciones dializadas (FAPM y FBPM).

3.2.3 Determinación de la actividad de la fosfolipasa.

Para esta prueba se usó como sustrato yema de huevo diluida 1:3 con ssi, adicionada de azida de sodio al 0.01% como conservador, este reactivo es estable por 30 días en refrigeración. Para las pruebas de actividad de la fosfolipasa el sustrato se diluyó 1:10. Se probaron las mismas diluciones de la ponzoña que se emplearon para la determinación de poder hemolítico, en cada tubo se midió 1.0 ml de ponzoña diluida, se adicionó 0.1 ml del sustrato y se llevó el volumen final a 2.1 ml. Se incluyó un control negativo constituido por 0.1 ml del sustrato y 1.0 ml de ssi. Las mezclas se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura comparando con el control negativo. El título fue la máxima dilución en la que el contenido del tubo estaba completamente claro y correspondió a la

dilución 1:256,000 de la ponzoña sin dializar y de 1:64,000 para la ambas fracciones del veneno dializado (FAPM y FBPM).

3.2.4 Determinaciones de la dosis letal 50 (DL₅₀)

Para esta determinación se emplearon ratones de 18 a 20 g de peso, administrándole a cada uno 0.5 ml por vía endovenosa de las diluciones de la ponzoña 1:20, 1:25., 1:30, 1:35 y 1:40 a partir de una dilución de trabajo del 1%. La lectura de los resultados se hizo a las 24 h y los cálculos se hicieron por el método de Reed and Muench, habiéndose encontrado que la ponzoña tenía una potencia de 166 DL₅₀/ml.

3.2.5 Obtención del "anaveneno".

Tomando en cuenta que con las exotoxinas bacterianas se pueden producir los toxoides o anatoxinas y utilizando las mismas bases para la obtención de dichos productos, se intentó preparar el "anaveneno" de abeja . Para ello se tomaron tres muestras de 5 ml de la fracción APM y a cada una se le adicionaron 0.5 ml de glutaraldehído 0.0250 mol/l, 0.01250 mol/l y 0.00625 mol/l respectivamente.

Las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 6 días y durante ese tiempo, en intervalos que variaban de 1 a 18 horas se determinaron las actividades hemolítica y enzimática de las fracciones APM y BPM, observandose la inactivación completa. En otra parte del estudio, al realizar prueba de precipitación en gel, se demostró que también perdieron antigenicidad.

Posteriormente se intentó la destoxificación de las fracciones APM y BPM con glutaraldehído a una concentración 0.00125 mol/l. En otro lote se probó formalina al 1:10,000 y en un tercer lote se probó el tiomersal al 1:10,000 para evaluar la posibilidad de emplearlo como conservador. En estos experimentos se inactivaron totalmente las fracciones y también en la fase posterior se demostró que perdieron la antigenicidad, por lo que se descartó la posibilidad de utilizar "anaveneno" así como de emplear el tiomersal como conservador.

3.3 ESTUDIO INMUNOGÉNICO DE LA PONZOÑA DE ABEJA.

3.3.1 Preparación del inmunógeno.

Como las ponzoñas animales en general, son pobres inmunógenos y requieren del empleo de adyuvantes para despertar una respuesta inmune adecuada, se planeó utilizar liposomas para obtener títulos altos de anticuerpos en los animales de experimentación y la ponzoña natural, es decir tal como se obtuvo de la fuente comercial.

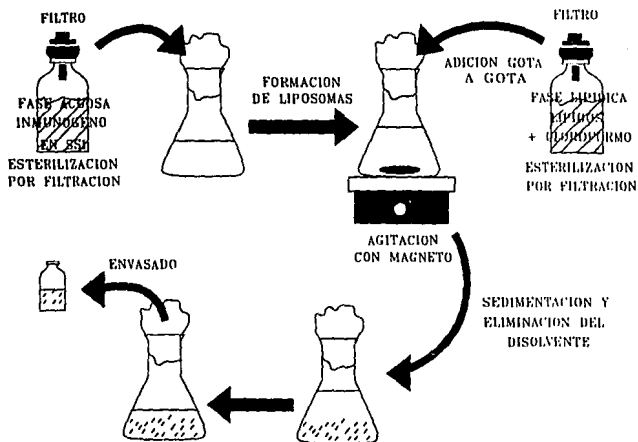
En este estudio se emplearon liposomas de fase reversa (I) y de tipo convencional (II). Para obtener los primeros se disolvieron en 100 ml de cloroformo 5.0 g de colesterol y 5.0 g de lecitina. Esta solución se esterilizó por filtración. En un matraz de 50 ml estéril se colocaron 10 ml de ponzoña de abeja al 1%, esterilizada por filtración, y 10 ml ssi estéril. La mezcla se colocó sobre un agitador magnético y se adicionaron gota a gota 5 ml de la solución de lípidos. Trabajando en condiciones de esterilidad se decantó el sobrenadante y los liposomas se lavaron tres veces con aproximadamente 20 ml de ssi estéril. El

volúmen se llevó a 30 ml con ssi estéril, se envasó en frascos ampula y se conservó a 4°C. (Ver diagrama No. 1).

Para obtener los liposomas del tipo convencional (II) se preparó una solución de lípidos igual que para los de fase reversa, que se esterilizó también por filtración. En un matraz estéril de 125 ml se colocaron 20 ml de la solución y se conectó al vacío para eliminar el disolvente, utilizando una trampa con algodón para conservar la esterilidad. El matraz se agitó constantemente para formar una película de lípidos sobre las paredes. Una vez que se evaporó completamente el cloroformo se agregaron 10 ml de ponzoña al 1 % estéril y unas perlas de vidrio, también estériles, para facilitar el desprendimiento de la película de lípidos, al agitar el matraz. El inmunógeno se envasó en frascos ampula y se conservó a 4°C. (Ver diagrama 2).

Estas fueron las cantidades con que se trabajó, pero el volúmen de ponzoña estará siempre en función de la cantidad que se utilizará para cada dosis y para cada animal, por lo tanto se puede variar la concentración de acuerdo a las necesidades.

DIAGRAMA No. 1
PREPARACION DE LIPOSOMAS. METODO I



FORMACION DE LIPOSOMAS. METODO I

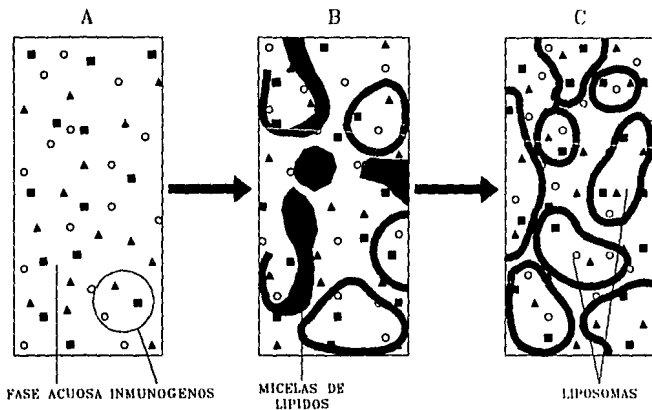
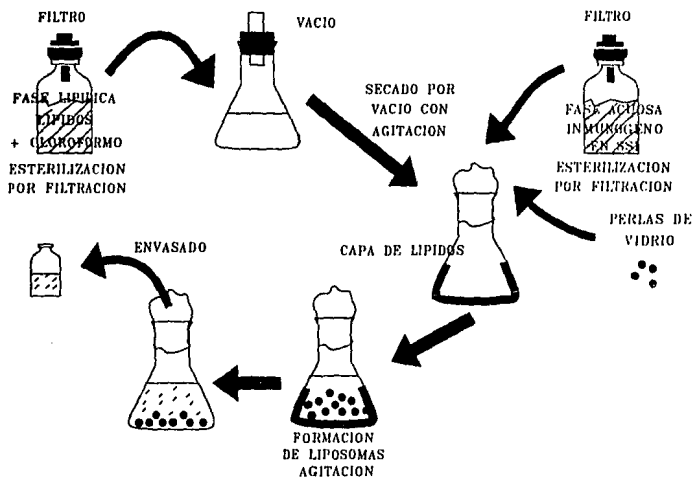
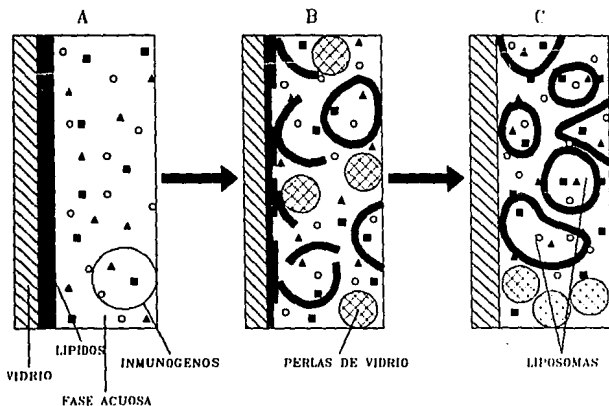


DIAGRAMA No. 2
PREPARACION DE LIPOSOMAS. METODO II



FORMACION DE LIPOSOMAS. METODO II



3.3.2 Inmunización de los animales de experimentación.

Para probar los inmunógenos se utilizaron conejos y cabras, debido a que por ese tiempo en todos los criaderos de conejos se presentó una epizootia de fiebre hemorrágica, solamente se pudieron inmunizar dos animales con el inmunógeno preparado con liposomas de fase reversa.

Para la inmunización de caprinos se utilizaron 12 animales entre 25 y 30 Kg, de mas de 2 años de edad; a 10 se les aplicó la suspensión de liposomas-inmunógeno y el resto fue inmunizado con la ponzoña al 1 % adicionada de adyuvante completo de Freund para la primera inoculación, el inmunógeno con adyuvante incompleto de Freund para la segunda, y después de la primera sangría de prueba se inocularon con el inmunógeno adsorbido en gel de $Al(OH)_3$. En las tablas 1, 2, 3 y 4 se dan los datos del esquema de inmunización y sangrias de prueba.

TABLA 1

CALENDARIO DE INMUNIZACION PARA PRODUCCION DE
 SUEROS HIPERINMUNES
 DE ORIGEN CUNICULA CONTRA LA PONZOÑA DE ABEJA.

| DIA | CONEJO A | | | CONEJO B | | | OBSERVACIONES |
|-----|----------|-------|------------------|----------|-------|------------------|------------------------|
| | Vol. | Dosis | | Vol. | Dosis | | |
| | ml | mg | DL ₅₀ | ml | mg | DL ₅₀ | |
| 01 | | | | 2.0 | 5.0 | 830 | ponzoña + ACF VSC |
| 08 | | | | 2.0 | 5.0 | 830 | ponzoña + AIF VSC |
| 13 | | | | | | | 1ra. sangría de prueba |
| 15 | 0.5 | 2.5 | 415 | 0.5 | 2.5 | 415 | L(I) VIM |
| 17 | | | | | | | 2a. sangría de prueba |
| 22 | 0.5 | 2.5 | 415 | 0.5 | 2.5 | 415 | L(I) VIM |
| 29 | 0.5 | 2.5 | 415 | 0.5 | 2.5 | 415 | L(I) VIM |
| 36 | 0.5 | 2.5 | 415 | 0.5 | 2.5 | 415 | L(I) VIM |
| 43 | 0.5 | 2.5 | 415 | 0.5 | 2.5 | 415 | L(I) VIM |
| 55 | | | | | | | 3a. sangría de prueba |
| 57 | 0.5 | 2.5 | 415 | 0.5 | 2.5 | 415 | L(I) VIM |
| 63 | | | | | | | 4a. sangría de prueba |
| 65 | 1.0 | 5.0 | 830 | 1.0 | 5.0 | 830 | L(I) VIM |
| 70 | | | | | | | 5a. sangría de prueba |
| 72 | 1.0 | 5.0 | 830 | 1.0 | 5.0 | 830 | L(I) VIM |
| 77 | | | | | | | 6a. sangría de prueba |
| 79 | 1.0 | 5.0 | 830 | 1.0 | 5.0 | 830 | L(I) VIM |
| 83 | 1.0 | 5.0 | 830 | 1.0 | 5.0 | 830 | L(I) VIM |
| 87 | | | | | | | 7a. sangría de prueba |
| 94 | | | | | | | 8a. sangría de prueba |
| 101 | | | | | | | Sangría a blanco de B |
| 108 | | | | | | | Sangría a blanco de A |

CLAVES:

ACF : Adyuvante completo de Freund VSC: Inoculación subcutánea

AIF : Adyuvante incompleto de Freund SP : Sangría de Prueba

VIM : Inoculación intramuscular L(I): Liposomas del tipo(I)

TABLA 2

**CALENDARIO DE INMUNIZACION PARA PRODUCCION DE
SUEROS HIPERINMUNES DE ORIGEN CAPRINO CONTRA LA
PONZOÑA DE ABEJA.**

| 10 cabras (C1 a C10) inmunizadas con liposomas | | | | | |
|--|---------|------|-------|--|---------------------------------|
| DIA | Volúmen | | Dosis | | Observaciones |
| | ml | mg | DL50 | | |
| 01 | 2.0 | 0.1 | 16.6 | | L(I) VSC |
| 03 | 2.0 | 0.1 | 16.6 | | L(I) VSC |
| 06 | 2.0 | 0.1 | 16.6 | | L(I) VSC |
| 08 | 2.0 | 0.1 | 16.6 | | L(I) VSC |
| 10 | 2.0 | 0.1 | 16.6 | | L(I) VSC |
| 13 | 2.0 | 0.1 | 16.6 | | L(I) VSC |
| 15 | 2.0 | 0.2 | 33.2 | | L(I) VSC |
| 17 | 2.0 | 0.2 | 33.2 | | L(I) VSC |
| 28 | | | | | 1a. sangría de prueba |
| 29 | 2.0 | 0.5 | 88 | | L(II) VSC |
| 31 | 2.0 | 0.5 | 88 | | L(II) VSC |
| 34 | 2.0 | 0.5 | 88 | | L(II) VSC |
| 36 | 2.0 | 0.5 | 88 | | L(II) VSC |
| 38 | 2.0 | 0.5 | 88 | | L(II) VSC |
| 41 | 2.0 | 0.5 | 88 | | L(II) VSC |
| 43 | 2.0 | 0.5 | 88 | | L(II) VSC 2a. sangría de prueba |
| 45 | 2.0 | 1.0 | 166 | | L(II) VSC |
| 48 | 2.0 | 1.0 | 166 | | L(II) VSC |
| 51 | 2.0 | 1.0 | 166 | | L(II) VSC |
| 55 | 2.0 | 1.5 | 254 | | L(II) VSC |
| 58 | 2.0 | 1.5 | 254 | | L(II) VSC |
| 59 | | | | | 3a. Sangría de prueba |
| 63 | 2.0 | 2.0 | 332 | | L(II) VSC |
| 66 | 2.0 | 2.0 | 332 | | L(II) VSC |
| 73 | 2.0 | 5.0 | 830 | | L(II) VSC |
| 80 | 2.0 | 10.0 | 1660 | | L(II) VSC |
| 87 | 2.0 | 10.0 | 1660 | | L(II) VSC |
| 94 | | | | | 4a. sangría de prueba |
| 99 | | | | | 5a. sangría de prueba |

CLAVES:

VSC: Inoculación Subcutánea

L(I): Liposomas del tipo I

L(II): Liposomas del tipo II

TABLA 3

**CALENDARIO DE INMUNIZACION PARA PRODUCCION DE
SUEROS HIPERINMUNES DE ORIGEN CAPRINO CONTRA LA
PONZOÑA DE ABEJA.**

| 2 Cabras (C11-C12) inmunizadas con adyuvantes de Freund y gel de Al(OH) ₃ | | | | | |
|--|---------|------|------------------|--|---|
| DIA | Volúmen | | Dosis | | Observaciones |
| | ml | mg | DL ₅₀ | | |
| 01 | 2.0 | 1.0 | 166 | | Ponzoña + ACF VSC |
| 07 | 2.0 | 1.0 | 166 | | Ponzoña + AIF VSC |
| 18 | | | | | 1a. sangría de prueba |
| 19 | 2.0 | 2.0 | 332 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 21 | 2.0 | 2.0 | 332 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 24 | 2.0 | 4.0 | 664 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 26 | 2.0 | 4.0 | 664 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 28 | 2.0 | 4.0 | 664 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 31 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 33 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC 2a. sangría de pba. |
| 35 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 38 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 40 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña + Al(OH) ₃ VSC |
| 42 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña VSC |
| 45 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña VSC |
| 47 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña VSC |
| 49 | 2.0 | 8.0 | 1328 | | Ponzoña VSC 3a. sangría de prueba |
| 63 | 2.0 | 10.0 | 1660 | | Ponzoña VSC |
| 70 | 2.0 | 10.0 | 1660 | | Ponzoña VSC |
| 84 | | | | | 4a. sangría de prueba |
| 89 | | | | | 5a. sangría de prueba |

CLAVES:

VSC: Inoculación Subcutánea

AIF: Adyuvante Incompleto de Freund

ACF: Adyuvante Completo de Freund

TABLA 4

**CALENDARIO DE INMUNIZACION PARA PRODUCCION DE
SUEROS HIPERINMUNES DE ORIGEN CAPRINO CONTRA LA
PONZONA DE ABEJA.**

| 10 Cabras (C1 a C10) inmunizadas con liposomas | | | | | |
|--|---------|------|------------------|-----------------------|---------------|
| DIA | Volúmen | | Dosis | | Observaciones |
| | ml | mg | DL ₅₀ | | |
| 135 | 2.0 | 15.0 | 2540 | L(II) VSC | |
| 139 | 2.0 | 30.0 | 4980 | L(II) VSC | |
| 143 | 2.0 | 30.0 | 4980 | L(II) VSC | |
| 150 | | | | 6a. sangría de prueba | |
| 160 | 2.0 | 20.0 | 3320 | L(II) VSC | |
| 163 | 2.0 | 20.0 | 3320 | L(II) VSC | |
| 167 | 2.0 | 20.0 | 3320 | L(II) VSC | |
| 174 | | | | 7a. sangría de prueba | |
| 2 Cabras (C11-C12) inmunizadas con liposomas | | | | | |
| DIA | Volúmen | | Dosis | | Observaciones |
| | ml | mg | DL ₅₀ | | |
| 125 | 2.0 | 15.0 | 2540 | L(II) VSC | |
| 129 | 2.0 | 30.0 | 4980 | L(II) VSC | |
| 133 | 2.0 | 30.0 | 4980 | L(II) VSC | |
| 140 | | | | 6a. sangría de prueba | |
| 150 | 2.0 | 30.0 | 4980 | L(II) VSC | |
| 153 | 2.0 | 40.0 | 6640 | L(II) VSC | |
| 157 | 2.0 | 50.0 | 8300 | L(II) VSC | |
| 164 | | | | 7a. sangría de prueba | |

CLAVES:

VSC: Inoculación Subcutánea
L(II): Liposomas del tipo II

3.3.3 Titulación de anticuerpos

Immunoprecipitación.

Como prueba presuntiva de la respuesta inmune, los sueros de los animales se estudiaron por precipitación en gel de agarosa, utilizando la técnica de doble difusión de Ouchterlony con los pozos en roseta. La ponzoña completa al 1% se colocó en el pozo central, los pozos de la periferia se llenaron con suero de los animales, probando las diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, las placas se dejaron durante 24 horas a 28°C. Al cabo de este tiempo se realiza la lectura para observar bandas de inmunoprecipitación en el gel.

Esta misma técnica se empleó para probar los sueros contra la ponzoña inactivada (Anaveneno) y para las fracciones separadas por diálisis, para observar las bandas al principio de la inactivación y seguir el proceso, tanto en la ponzoña total, como en ambas fracciones obtenidas.

Titulación de la inhibición del poder hemolítico.

Para esta prueba se mezclaron 0.25 ml del suero de los animales inmunizados con 0.25 ml de la ponzoña de abeja diluida en incrementos de 2, desde 1:1,000 hasta 1:1,024,000 y se llevó a un volumen final de 1.0 ml. Estas mezclas se dejaron 60 minutos a temperatura ambiente para permitir la neutralización y a cada tubo se le adicionaron 0.1 ml de eritrocitos equinos, previamente lavados y ajustados al 2%. Se dejaron interaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. En la prueba se incluyó un testigo negativo constituido por 0.75 ml de ssi, 0.25 ml de ponzoña al que se añadió 0.1 ml de eritrocitos, en este tubo se presentó hemólisis

completa. Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos para facilitar la lectura. El título de anticuerpos neutralizantes presentes lo dió el tubo con la máxima concentración de la ponzoña que mostró inhibición completa de la hemólisis.

Titulación de la inhibición de la actividad de la fosfolipasa.

Las mezclas de suero inmune y ponzoña se prepararon en la misma forma que para la prueba de inhibición de la hemólisis y se dejaron interaccionar 60 minutos a temperatura ambiente. En seguida se adicionó a cada tubo 0.1 ml del sustrato de yema de huevo preparado como se describió anteriormente y las mezclas se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente. Se incluyó un testigo para facilitar la lectura constituido por 1.0 ml de ssi y 0.1 ml del sustrato. Después del período de incubación se realizaron las lecturas. El título de anticuerpos correspondió al tubo cuya turbidez era exactamente igual al testigo.

Determinación de la Dosis Efectiva Media 50 (DE₅₀)

Para esta prueba se prepararon mezclas con 3.0 ml del suero de los animales inmunizados y 0.5 ml de ponzoña conteniendo 21 DL₅₀. Esta mezcla se dejó 60 minutos a temperatura ambiente para permitir la neutralización de la ponzoña y se inocularon 0.5 ml por animal a 6 ratones de 18 a 20 g de peso, que se dejaron en observación durante 24 horas. Paralelamente se inocularon 6 ratones respectivamente con diluciones de la ponzoña para validar la DL₅₀. En las tablas 5 y 6 se explican los cálculos realizados para la determinación de ambas dosis.

| TABLA #5 PRUEBA DE POTENCIA DE LA PONZOÑA (DL ₅₀) | | | | | | |
|---|------|---|---|-----|-----|--------------|
| Dil | mg | S | M | S a | M a | % Mort. |
| 1:50 | 0.10 | 0 | 6 | 0 | 19 | 19/19=100.0% |
| 1:60 | 0.08 | 0 | 6 | 0 | 13 | 13/13=100.0% |
| 1:70 | 0.07 | 2 | 4 | 2 | 7 | 7/9=77.8% |
| 1:80 | 0.06 | 4 | 2 | 6 | 3 | 3/9=33.3% |
| 1:90 | 0.05 | 5 | 1 | 11 | 1 | 1/12=8.3% |

$$\log DL_{50} = \log 80 + \frac{63.6 - 50.0}{63.6 - 18.7} (\log 1.14) = 1.9031 + [(0.3029)(0.0569)]$$

$$\log DL_{50} = 1.9031 + 0.0172 = 1.9023$$

si el antilog DL₅₀ = antilog 1.9023 tenemos que: DL₅₀ = 88/0.5ml ya que a cada animal se le administró 0.5 ml, por lo tanto la potencia es: **166 DL₅₀/ml**. Como la concentración es de 1mg/ml en esta prueba la potencia es de: **166 DL₅₀/mg**.

| TABLA #6 PRUEBAS DE POTENCIA DEL SUERO.(3DL ₅₀ POR RATON) | | | | | | |
|--|--------------------|---|---|-----|-----|-----------|
| Dil. del suero | Dil. de la ponzoña | S | M | S a | M a | % Sobrev. |
| 1:1.3 | 1:50 | 0 | 6 | 0 | 6 | 0/6=0.0 |
| 1:2.0 | 1:50 | 0 | 6 | 0 | 12 | 0/12=0.0 |
| 1:3.0 | 1:50 | 0 | 6 | 0 | 18 | 0/18=0.0 |
| 1:4.3 | 1:50 | 0 | 6 | 0 | 24 | 0/24=0.0 |
| 1:6.6 | 1:50 | 0 | 6 | 0 | 30 | 0/30=0.0 |

CAPITULO 4

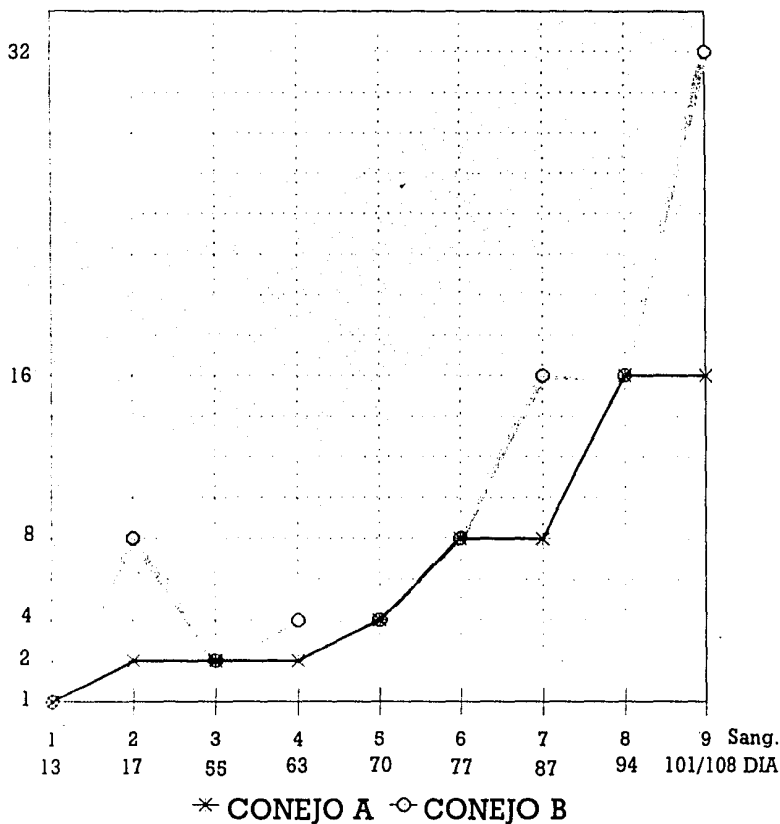
RESULTADOS OBTENIDOS

Tomando como base la literatura consultada, se inmunizaron dos conejos con los esquemas que se dan en el capítulo anterior. Desde el treceavo día se comenzó a determinar la presencia de anticuerpos en el suero, siendo ésta negativa, en tanto que en la segunda sangría -diesieteavo día- ya se observó la formación de bandas de inmunoprecipitación, en número de seis. En la gráfica #1 se muestran los títulos obtenidos en las nueve sangrías de prueba efectuadas. El título se expresa como la recíproca de la máxima dilución que dió resultados positivos.

Como se puede apreciar hay un aumento en la producción de anticuerpos contra la ponzoña de abeja conforme pasa el tiempo, aunque prácticamente no se incrementó la cantidad de inmunógeno. El conejo B es el que presenta una mejor respuesta final, aunque responde de manera más retardada que el A. El conejo B presentó una baja de anticuerpos en la tercera sangría, donde en cambio el conejo A mantuvo la respuesta.

**GRAFICA #1 TITULOS DE LOS SUEROS DE
CONEJO. PRECIPITACIONES EN GEL
(PONZOÑA TOTAL)**

Diluciones 1/X del suero de conejo

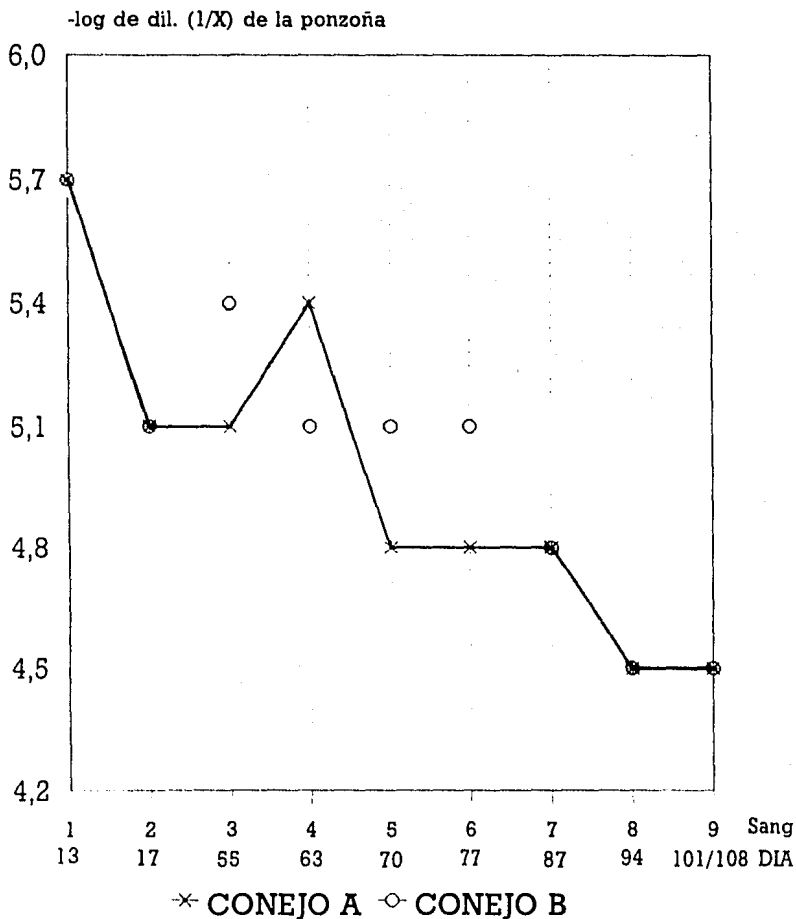


La Gráfica #2 muestra la capacidad del suero para inhibir la hemólisis, en donde se puede apreciar que los anticuerpos logran neutralizar a la ponzoña diluida 1/32,000 que en la gráfica se representa como 4.5 (-log de la dilución). Se aprecia que la capacidad de los sueros de cada conejo para inhibir la hemólisis no mantienen un comportamiento similar, donde se observa que en ambos animales un cambio después en la tercera sangría, en el conejo A se mantiene un poco más que el conejo B. (día 103)

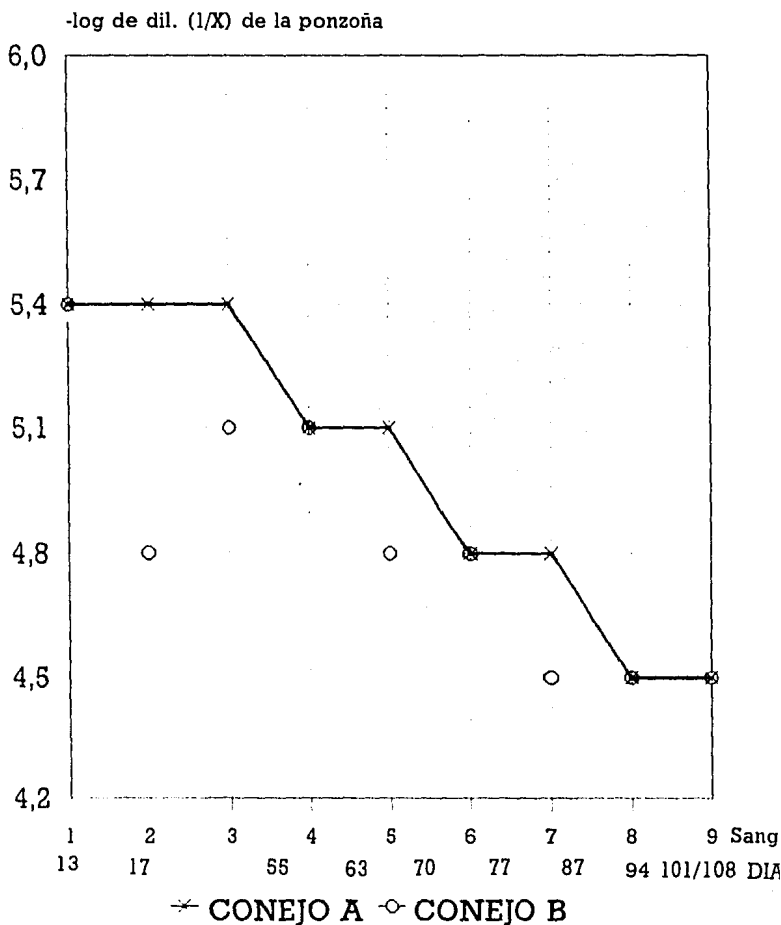
En la gráfica #3 se muestra la potencia de los sueros de los conejos para neutralizar la actividad de la fosfolipasa. En el conejo A se obtiene respuesta en la segunda sangría, y disminuye en la cuarta, aumentando conforme se avanza en la inmunización. El conejo B presenta respuesta en la segunda sangría y disminuye en la tercera, en la cuarta, quinta y sexta regresa al nivel de la segunda para aumentar en las siguientes. En ambos casos se logra obtener una neutralización hasta la dilución 1/32,000, al igual que en la inhibición de la hemólisis.

En las tres gráficas se puede observar que los animales muestran una respuesta significativa al ser inoculados con la ponzoña encapsulada en liposomas. Al obtener el título de inhibición más alto a los tres meses se procedió a la sangría de cosecha, tal y como se indica en el esquema de inmunización.

GRAFICA #2 TITULOS DE LOS SUEROS DE
 CONEJO. INHIBICION DE LA HEMOLISIS
 (PONZOÑA TOTAL)



GRAFICA #3 TITULOS DE LOS SUEROS DE CONEJO. INHIBICION DE LA FOSFOLIPASA (PONZOÑA TOTAL)



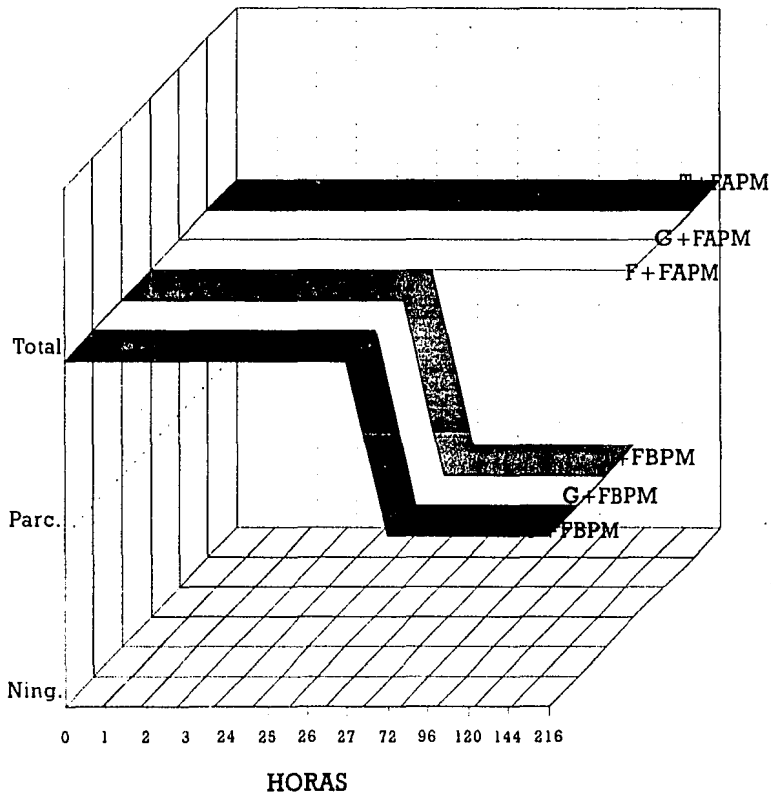
Para disponer de un inmunógeno menos agresivo para los animales de experimentación se intentó obtener el anaveneno, utilizando la metodología que se emplea para los toxoides bacterianos. En la gráfica #4 se muestra la actividad hemolítica de las fracciones de bajo peso molecular y de alto peso molecular, así como el efecto del tiomersal que se planeó utilizar como conservador. Como puede apreciarse tanto con la adición de glutaraldehído como con la formalina y el tiomersal se inhibe drásticamente la actividad hemolítica de la fracción de bajo peso molecular, en tanto que estos compuestos no tienen efecto sobre la fracción de alto peso molecular.

Al principio de la inactivación se observaron bandas de inmunoprecipitación y posteriormente se encontró que estas fracciones, después del tratamiento, no interaccionaron con el suero de los conejos inmunizados con la ponzoña nativa, lo que demuestra que el producto se desnaturalizó completamente. Con las fracciones se obtuvieron bandas menos definidas y en menor número que con la ponzoña total sin tratamiento.

Por lo que respecta a la actividad de la fosfolipasa A2 de las fracciones tratadas en la misma forma, como se observa en la gráfica #5 la actividad de la de bajo peso molecular se inhibió casi totalmente y la de alto peso molecular fue completa. En este caso también se comprobó la pérdida de especificidad.

GRAFICA #4 ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LAS FRACCIONES DURANTE LA OBTENCION DEL ANANVENENO

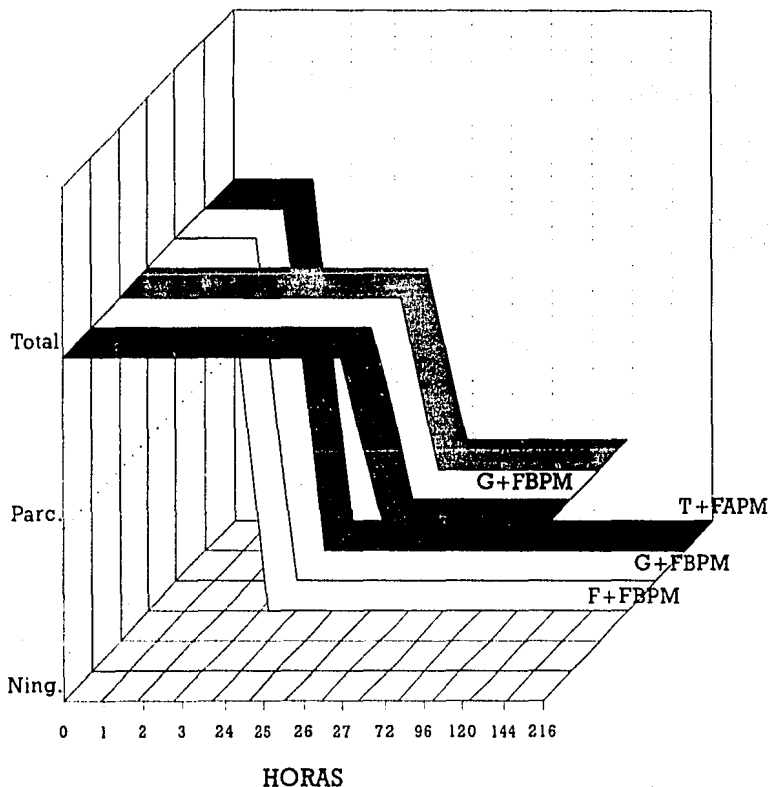
ACT. HEMOLITICA



FBPM (FRACCION DE BAJO PESO MOLECULAR)
FAPM (FRACCION DE ALTO PESO MOLECULAR)
T=TIOMERSAL G=GLUTARALDEHIDO F=FORMOL

GRAFICA #5 ACTIVIDAD FOSFOLIPIDICA DE LAS FRACCIONES DURANTE LA OBTENCION DEL ANAVENENO

ACT. FOSFOLIPIDICA

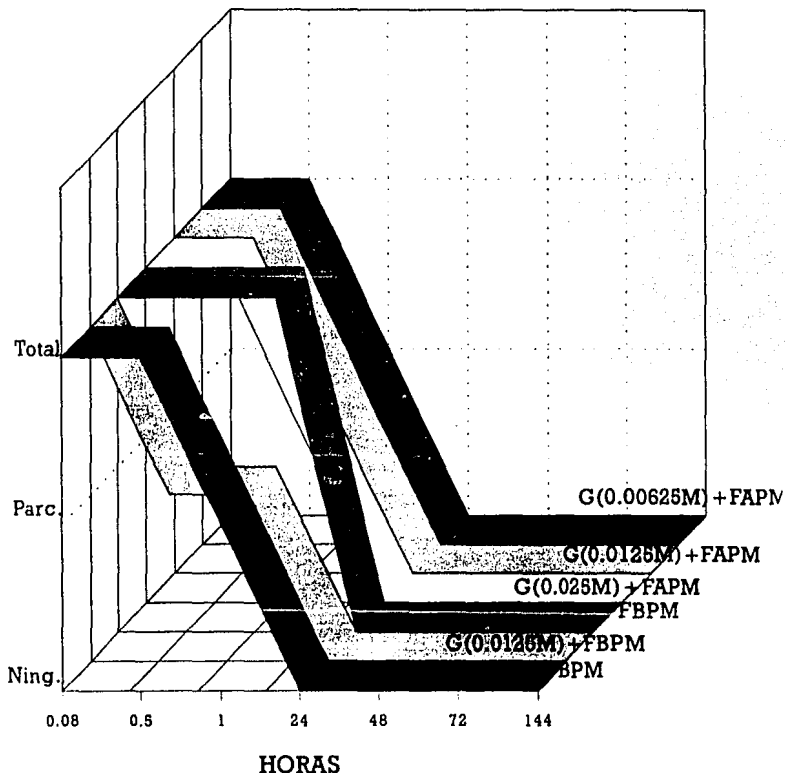


FBPM (FRACCION DE BAJO PESO MOLECULAR)
 FAPM (FRACCION DE ALTO PESO MOLECULAR)
 T=TIOMERSAL G=GLUTARALDEHIDO F=FORMOL

Considerando que posiblemente la inactivación y desnaturalización de la ponzoña se debió a la concentración de los agentes químicos utilizados, se procedió a probar diversas concentraciones del glutaraldehído: 0.00625, 0.0125 y 0.025 mol/l con ambas fracciones. Como se muestra en las gráficas #6 y #7 la inactivación se produjo a las 24 horas tanto en la poder hemolítico como de fosfolipasa A2. Tomando en cuenta todos estos resultados se decidió no emplear el anaveneno como inmunógeno, ni el tiomersal como conservador.

GRAFICA #6 ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LAS FRACCIONES DURANTE LA OBTENCION DEL ANAVENENO

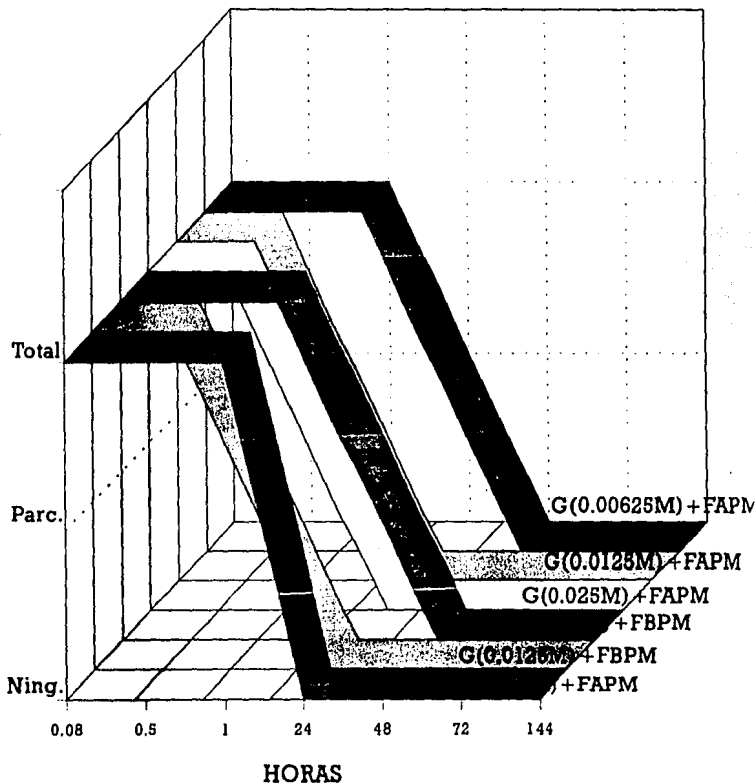
ACT. HEMOLITICA



FBPM (FRACCION DE BAJO PESO MOLECULAR)
FAPM (FRACCION DE ALTO PESO MOLECULAR)
G=GLUTARALDEHIDO (#.###)=CONC.

GRAFICA #7 ACTIVIDAD FOSFOLIPIDICA DE
LAS FRACCIONES DURANTE LA OBTENCION
DEL ANAVENENO

ACT. FOSFOLIPIDICA



FBPM (FRACCION DE BAJO PESO MOLECULAR)
FAPM (FRACCION DE ALTO PESO MOLECULAR)
G=GLUTARALDEHIDO (#.###)=CONC.

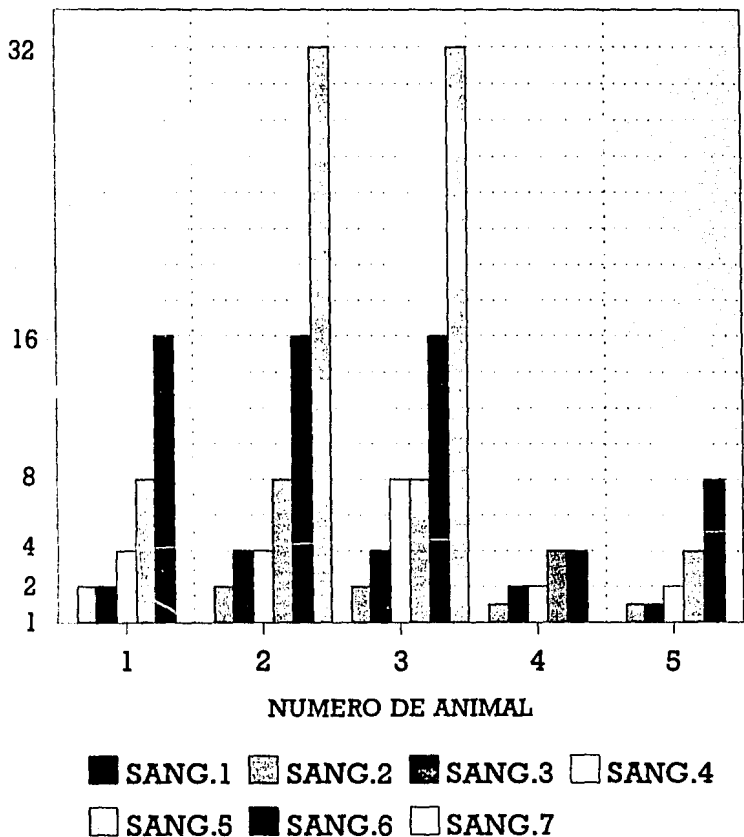
El título de anticuerpos obtenido en las doce cabras, se midió por el método de inmunoprecipitación de Ouchterlony. Los resultados se muestran en las gráficas #8 y #8A para los animales inmunizados con liposomas, donde las cabras 2, 3 y 10 alcanzaron en la última sangría, a los 174 días del esquema de inmunización, el título de 1:32. En la gráfica #9, para cabras inmunizadas con adyuvante de Freund e hidróxido de aluminio, ambos animales, 11 y 12, alcanzaron el título de 1:32 a los 164 días, correspondientes a su última sangría. En el resto de los animales de ambos esquemas, se obtuvieron títulos más bajos y variables. La gráfica #10 presenta reunidos los títulos de los animales en estudio.

En estos mismos sueros se probó su capacidad para inhibir la hemólisis. Los resultados se muestran en las gráficas #11, #11A y #12, donde se presenta el mismo arreglo que en las gráficas anteriores. El título de inhibición en todos los animales mostró variaciones erráticas, a excepción de la cabra 5, en la que si no se toma en cuenta la segunda sangría, el título fue en aumento. En el resto de los animales unas veces bajó y otras subió de sangría a sangría, sin que se tenga una explicación para ello, pues este comportamiento no se observa con otros inmunógenos, posiblemente el fenómeno se deba a variaciones en los eritrocitos pero no podemos explicar cuales variaciones. La gráfica #13 presenta juntos los resultados de los doce animales.

En cuanto a la inhibición de la actividad de la fosfolipasa A₂, gráficas #14, #14A y #15, los títulos de inhibición encontrados son menos erráticos que la inhibición de la hemólisis, pero también se observan valores más altos y más bajos. Solamente las cabras 2 y 4, en el esquema de liposomas, y la cabra 12, del esquema de adyuvante de Freund e hidróxido de aluminio, muestra una actividad homogénea. La gráfica #16 muestra los resultados de todos los animales.

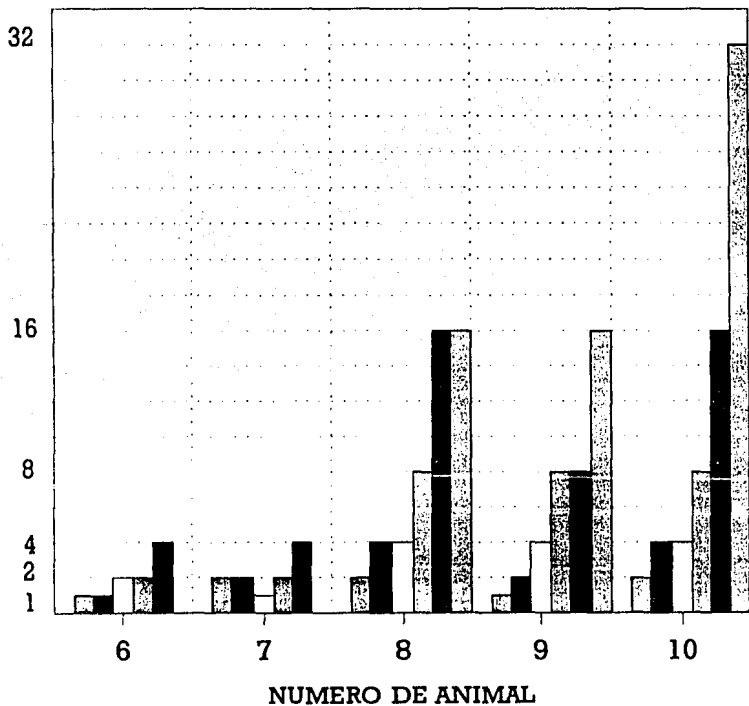
**GRAFICA #8 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS
INMUNIZADAS CON LIPOSOMAS. PRECIPITACION EN GEL.
(PONZOÑA TOTAL)**

Dilución 1/X de los sueros de cabra



**GRAFICA #8A TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS
INMUNIZADAS CON LIPOSOMAS. PRECIPITACION EN GEL.
(PONZOÑA TOTAL)**

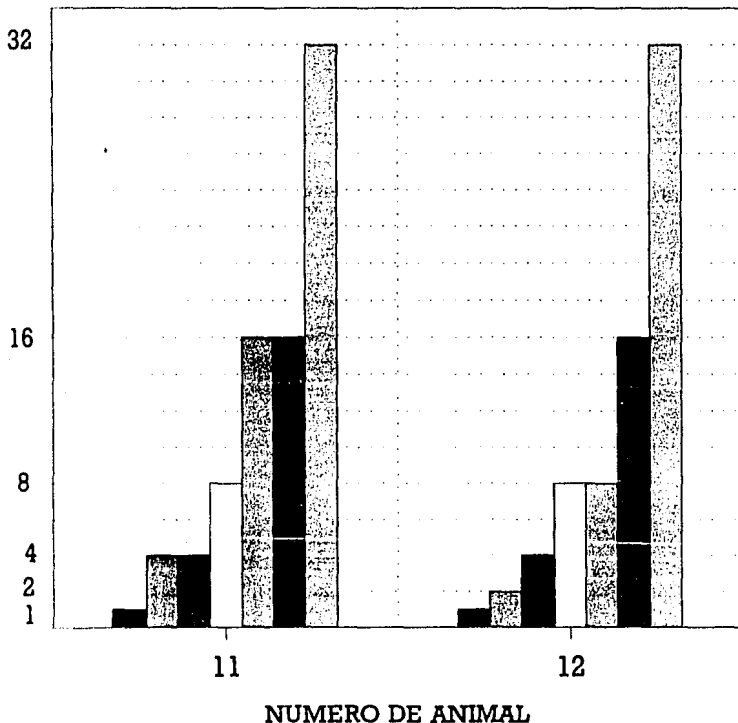
Dilución 1/X de los sueros de cabra



SANG.1
 SANG.2
 SANG.3
 SANG.4
 SANG.5
 SANG.6
 SANG.7

**GRAFICA #9 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRA
INMUNIZADAS CON ADYUV. DE FREUND E $Al(OH)_3$.
PRECIPITACION EN GEL. (PONZOÑA TOTAL)**

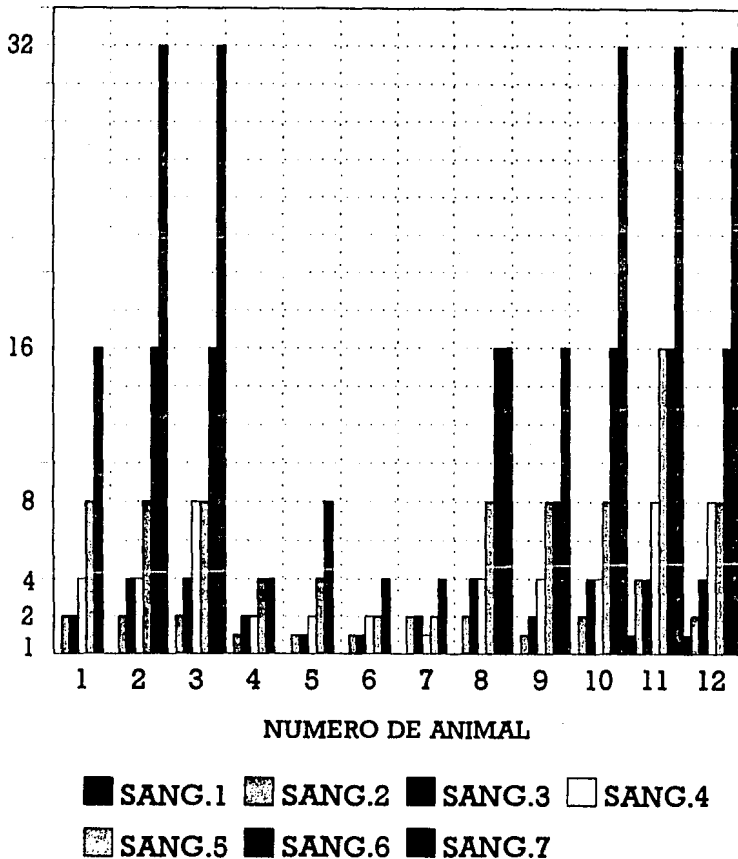
Dilución 1/X de los sueros



SANG.1
 SANG.2
 SANG.3
 SANG.4
 SANG.5
 SANG.6
 SANG.7

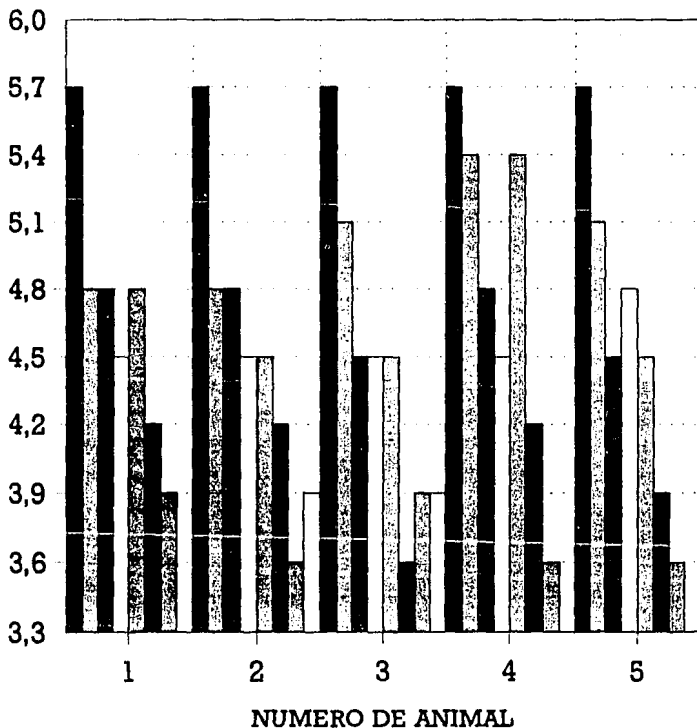
**GRAFICA #10 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRA.
PRECIPITACION EN GEL. (PONZOÑA TOTAL)**

Dilución 1/X de los sueros



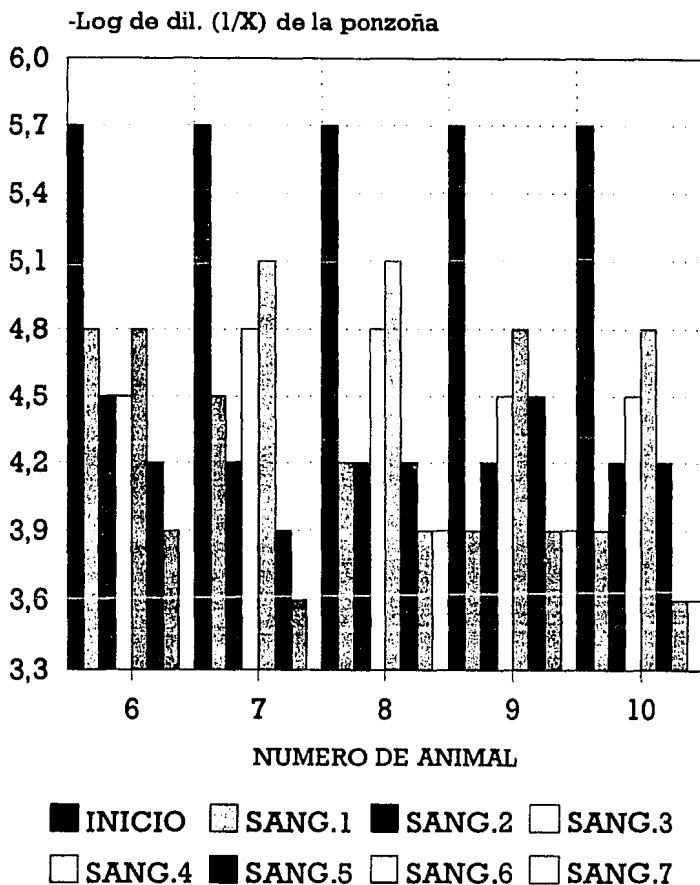
GRAFICA #11 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS INMUNIZADAS CON LIPOSOMAS. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LA PONZOÑA TOTAL.

-Log de dil. (1/X) de la ponzoña



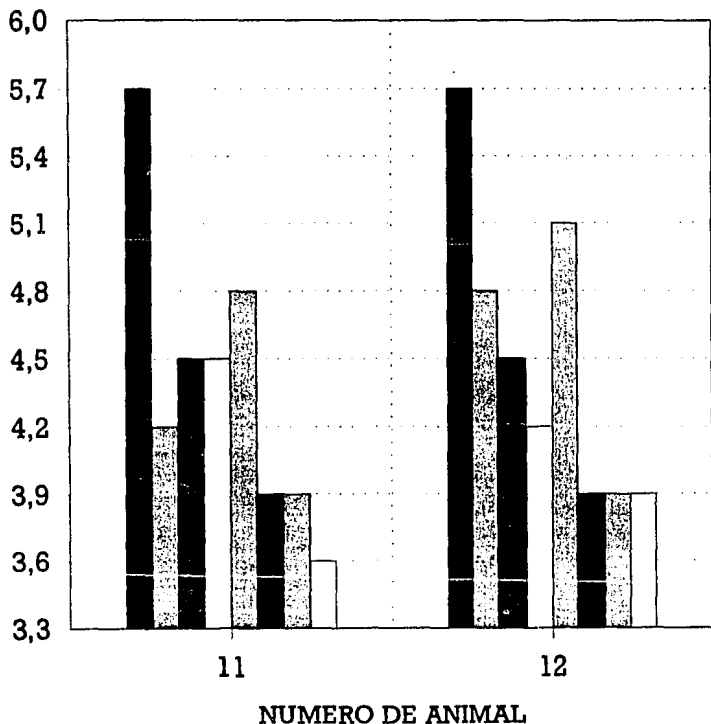
INICIO
 SANG.1
 SANG.2
 SANG.3
 SANG.4
 SANG.5
 SANG.6
 SANG.7

GRAFICA #11A TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS INMUNIZADAS CON LIPOSOMAS. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LA PONZOÑA TOTAL.



**GRAFICA #12 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS
 INMUNIZADAS CON ADYUV. DE FREUND E $Al(OH)_3$. INHIB.
 DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LA PONZOÑA TOTAL.**

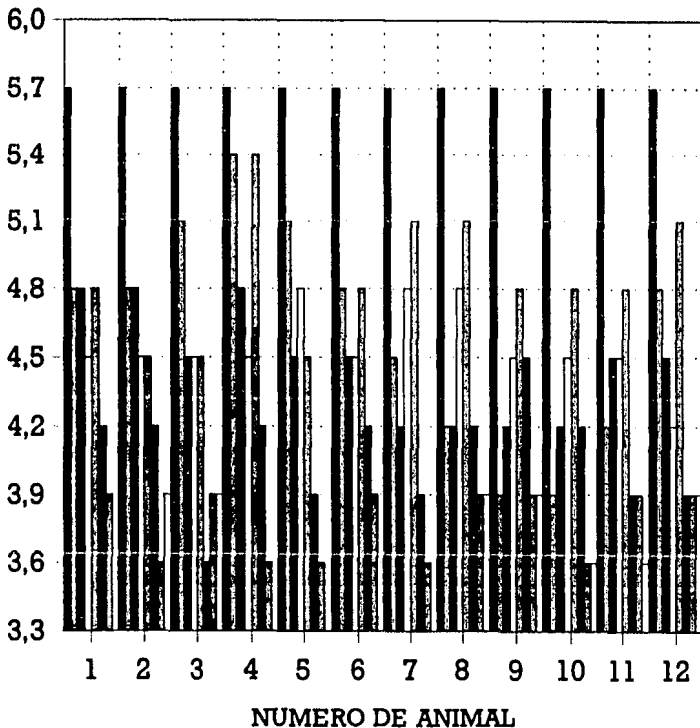
-Log de dil. (1/X) de la ponzoña



INIC.
 SANG.1
 SANG.2
 SANG.3
 SANG.4
 SANG.5
 SANG.6
 SANG.7

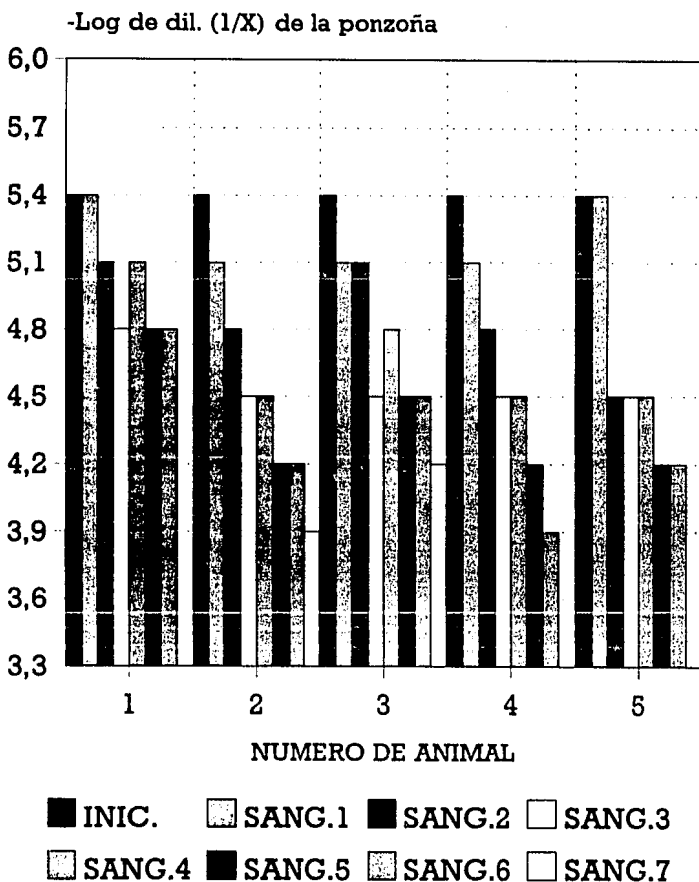
**GRAFICA #13 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS
INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE
LA PONZOÑA TOTAL.**

-Log de dil. (1/X) de la ponzoña

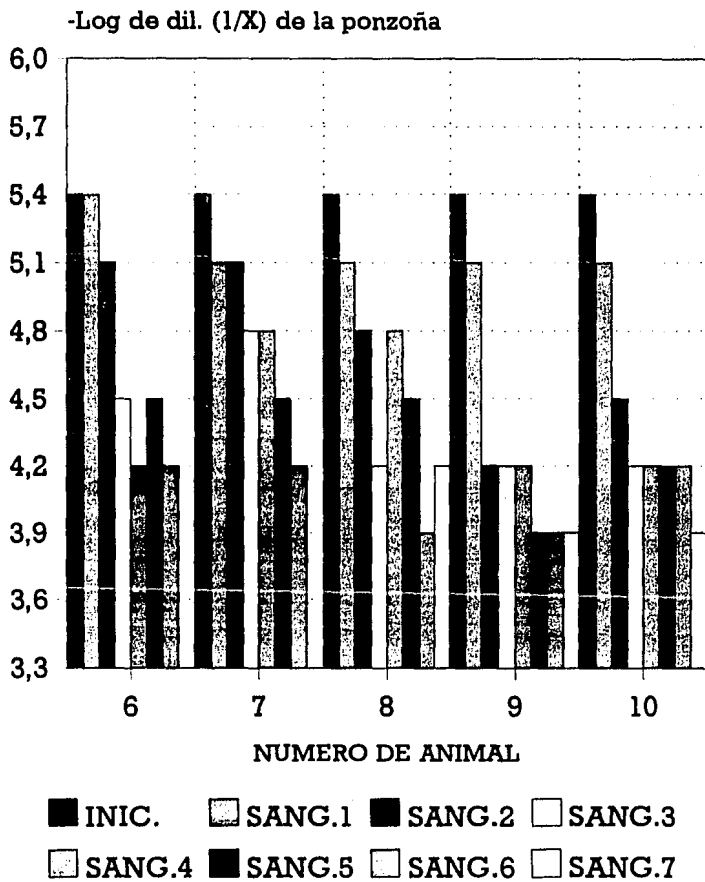


INIC.
 SANG.1
 SANG.2
 SANG.3
 SANG.4
 SANG.5
 SANG.6
 SANG.7

**GRAFICA #14 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS
 INMUNIZADAS CON LIPOSOMAS. INHIBICION DE LA
 ACTIVIDAD FOSFOLIPIDICA DE LA PONZOÑA TOTAL.**

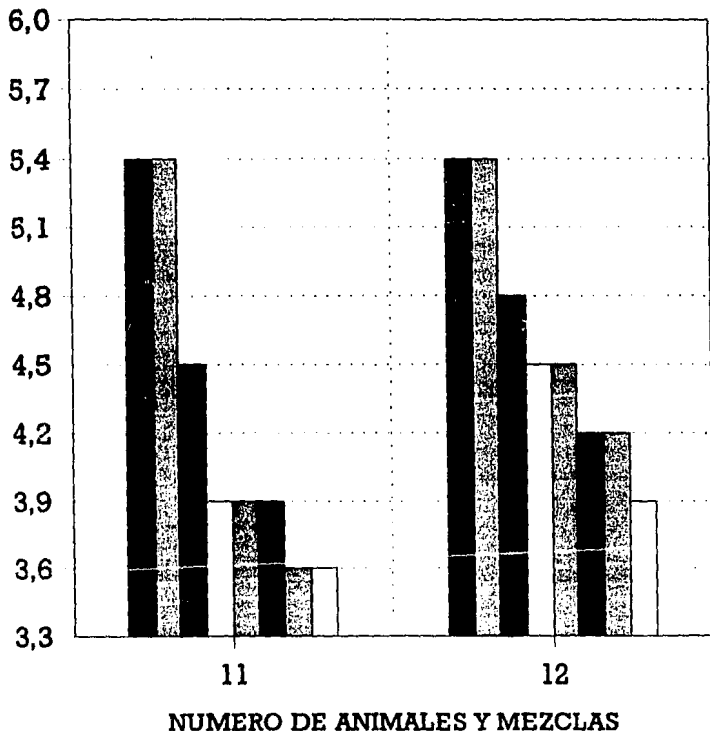


GRAFICA #14A TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS INMUNIZADAS CON LIPOSOMAS. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPIDICA DE LA PONZOÑA TOTAL.



GRAFICA #15 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS INMUNIZADAS CON ADYUV. DE FREUND E $Al(OH)_3$. INHIB. DE LA ACTIV. FOSFOLIPIDICA DE LA PONZOÑA TOTAL

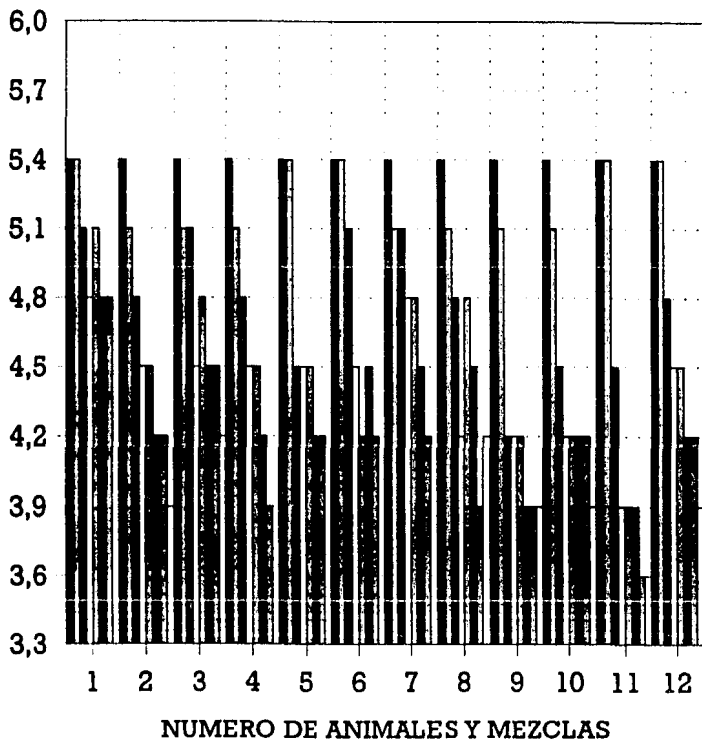
-Log de dil. (1/X) de la ponzoña



■ INIC. ▨ SANG.1 ■ SANG.2 □ SANG.3
 ▨ SANG.4 ■ SANG.5 □ SANG.6 □ SANG.7

**GRAFICA #16 TITULOS DE LOS SUEROS DE CABRAS.
INHIBICION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPIDICA
DE LA PONZOÑA TOTAL**

-Log de dil. (1/X) de la ponzoña

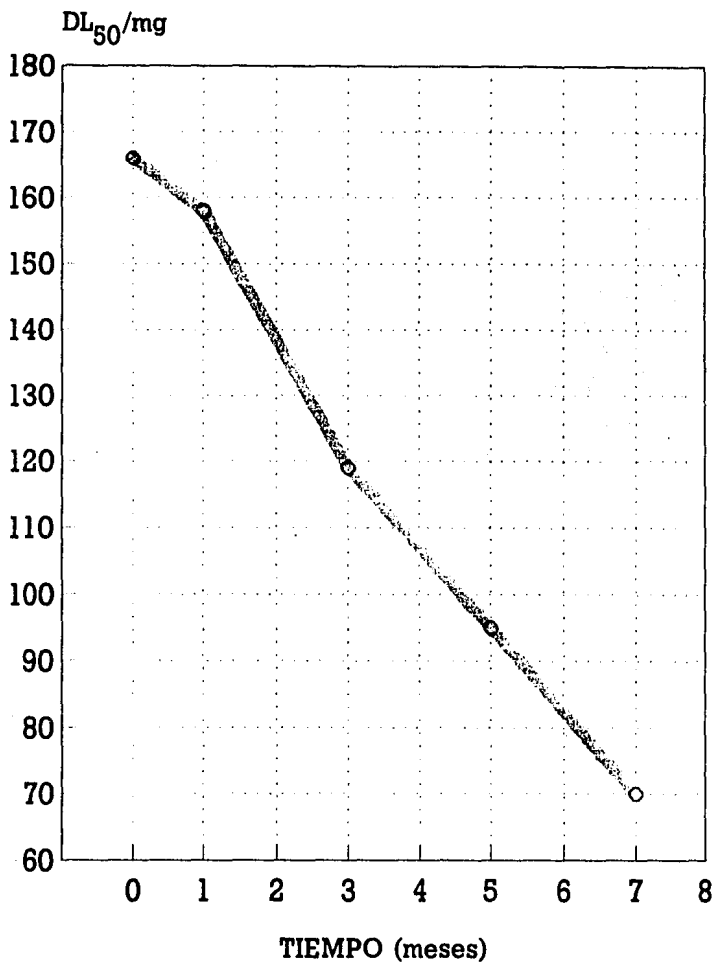


INIC.
 SANG.1
 SANG.2
 SANG.3
 SANG.4
 SANG.5
 SANG.6
 SANG.7

Finalmente, en la gráfica #17 se muestra la estabilidad de la ponzoña hidratada almacenada a 4°C, aquí se puede apreciar que dentro del primer mes la potencia no decrece en forma drástica pero que posteriormente va perdiendo actividad en forma lineal.

Después de probar los títulos de inhibición "in vitro" se procedió a determinar la dosis efectiva media (DE₅₀) en mezclas de alícuotas de los sueros que dieron los títulos más altos de inhibición de la hemólisis y de la actividad de la fosfolipasa. En estas pruebas no se obtuvo protección ya que todos los ratones inyectados con las mezclas que contenían desde 3 DL₅₀ murieron. Con estos resultados negativos se demuestra que la respuesta inmunológica no genera anticuerpos neutralizantes de la actividad tóxica del inmunógeno.

GRAFICA #17 ESTABILIDAD DE LA
PONZOÑA DE ABEJA. DOSIS LETAL 50



DISCUSION

Al analizar en su conjunto los resultados obtenidos se pueden desprender varios hechos relevantes en relación al inmunógeno y a la respuesta de los animales de experimentación:

Los títulos de inmunoprecipitación no muestran concordancia con los de inhibición de la hemólisis ni de la actividad de la fosfolipasa.

El hecho de haberse obtenido títulos erráticos en las pruebas de inhibición a lo largo del esquema de inmunización demuestra que ambas pruebas tienen un gran factor de error, por la cantidad de variantes, y por lo tanto no son reproducibles, ya que no era de esperarse que entre sangría y sangría se obtuviera un descenso, posteriormente un ascenso súbito o bien un título idéntico. Como ejemplo podemos analizar los títulos obtenidos en la cabra 4 en donde la actividad de inhibición de la fosfolipasa muestra una pendiente lineal, da resultados poco constantes de inhibición de la hemólisis y no dió resultados positivos en la inmunoprecipitación. En la cabra 2 se encontró un buen título de inmunoprecipitación e inhibición de la hemólisis y de la fosfolipasa aceptables. Con solo estos dos ejemplos se pueden comprobar las aseveraciones anteriores.

Por lo que respecta a las cabras testigo 11 y 12 que fueron inmunizadas con el adyuvante de Freund y la ponzoña adsorbida en geles, el patrón de comportamiento fue semejante al de los diez animales que recibieron la ponzoña en liposomas, a pesar de que se les aplicó una cantidad mayor de ponzoña. Lo anterior se explica porque la ponzoña es un inmunógeno pobre y en estos casos el empleo de diferentes adyuvantes no mejora la inmunogenicidad.

El hecho de que la ponzoña es un inmunógeno que no induce anticuerpos neutralizantes quedó demostrado al tratar de determinar la DE₅₀ en las mezclas de los sueros que habían dado los títulos más altos "in vitro" y al obtener resultados negativos de protección.

La discrepancia entre el hallazgo de títulos de inhibición de la actividad hemolítica y de la actividad de la fosfolipasa, y no haber encontrado poder protector "in vivo" demuestran que en la ponzoña de abeja a pesar de que se neutralice la acción de la melitina y/o de la fosfolipasa A₂, contiene otros componentes tóxicos que no son inmunógenos y por lo tanto no fueron neutralizados al tratar de determinar la DE₅₀.

Para demostrar lo anterior sería interesante continuar este estudio separando la mayor parte de los componentes de la ponzoña de abeja y estudiándolos por separado para dilucidar cuáles son inmunógenos.

Sin embargo, es necesario recordar que ésta ponzoña induce estado de hipersensibilidad, con reacción de tipo inmediato, en un gran número de personas y que es de tal magnitud que con cierta frecuencia se producen desenlaces fatales.

CAPITULO 5 CONCLUSIONES

1.- La ponzoña de abeja es un inmunógeno muy pobre a pesar de que se aplique encapsulada en liposomas, adsorbida en el adyuvante completo de Freund, o en geles de hidróxido de aluminio, ya que no da una respuesta de protección.

2.- La melitina y la fosfolipasa A2 tienen actividad inmunógena pero la respuesta no es de protección y los títulos de anticuerpos, medidos por las pruebas de inhibición de la hemólisis y de la actividad de la fosfolipasa A2 son muy variables en el curso del esquema de inmunización.

3.- Además de estos dos componentes, que fueron los estudiados en el presente trabajo, la ponzoña tiene otros componentes tóxicos no inmunógenos, lo que explica que al tratar de determinar la DE₅₀, no se demostró poder protector.

4.- Todos estos hallazgos llevan a la conclusión final de que no es posible obtener un suero contra la ponzoña de abeja.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- 01.- BENTON, A. W. and MOVE, R. A. "Venom collection from honey bee"
Science **142** [3589] 228-230 (1963)
- 02.- Manual de reactivos químicos de SIGMA, Co. 1989
- 03.- HOFFMAN, D. R. and SHIPMAN, W. H. "Allergens in bee venom. I.-
Separation and identification of the major allergens". *J ALLERGY CLIN IMM*
58 [5] 551-562 (1976).
- 04.- HOFFMAN, D. R. and JACOBSON, R. S. "Allergens in hymenoptera venom
XII. Much proteins is in a sting?" *ANN ALLERGY* **52**, 276-278 (1984).
- 05.- CASE, A "MANUAL PRACTICO DE APICULTURA". Editorial Compañia
Editorial Continental S.A. 1a. Edición en español. México, D.F. 1989.
- 06.- HABERMANN, E. "Bee and wasp venom". *SCIENCE* **177** 314-322 (1977).
- 07.- BRADICK, T.D., DASSEUX, J.L. ABDALLA, M., AMINZADEH, A. and
GEORGHIO "Effect of bee venom melitin on the order and dinamycs of
dimyristoylphosphatidilcholine unilamellar and multillamellar vesicules".
BIOCHIM BIOPHYS ACTA **12,900**(1),17-26 (1987).
- 08.- AUKRUST, L., EINARSSON, R., OHMAN, S. and JOHANSSON, S. G. O.
"Crossed radioimmunolectrophoretic studies of bee venom allergens".
ALLERGY **37**, 265-271 (1982).

- 09.- BARBONI, E., KEMENY, D.M., CAMPONS, S. and VERNON, C.A. "The purification of acid phosphatase from honey bee venom (*Apis mellifica*)". *TOXICON* 25 [10] 1097-1103 (1987)
- 10.- HOFFMAN, D. R. "Allergens in hymenoptera venom. IV Comparison of venom and venom sac extracts". *J ALLERGY CLIN IMM* 59 [5] 367-370 (1977).
- 11.- HOFFMAN, D.R. "Allergens in bee venom. III Identification of allergen B of bee venom as acid phosphatase". *J ALLERGY CLIN IMM* 59 [5] 364-366 (1977).
- 12.- HOFFMAN, D. R., SHIPMAN, W. H. and BABIN, D. "Allergens in bee venom. II Two new high molecular weight allergenic specificities". *J ALLERGY CLIN IMM* 59, 147-153 (1977).
- 13.- OWEN, M.D. "The venom system and venom hyaluronidase of the african honeybee". *TOXICON* 21 [1] 171-174 (1983)
- 14.- RICHES, H. R. C. "Hypersensitivity to bee venom". *BEE WORLD* 63 [1] 7-22 (1982)
- 15.- SETTIPANE, G.A., GRAHAM, M.D. et al. "Frequency of hymenoptera allergy in an atopic and normal population". *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 50 [3] 146-150 (1972)

- 16.- GOLDEN D. B. K., MEYERS, D. A. et al. "Clinical relevance of the venom specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy". *J ALLERGY CLIN IMM* **69** [6] 489-493 (1982)
- 17.- KEMMENEY, D. M., MCKENZIE-MILLS, M. et al "Antibodies to purified bee venom proteins and peptides II. A detailed study of changes in IgE and IgG antibodies to individual bee venom antigens". *J ALLERGY CLIN IMM* **72** [4] 376-385 (1983)
- 18.- TYSON, C. J. and COULTER, A. R. "The estimation of bee venom specific human IgG" *ANN ALLERGY* **47**, 43-46 (1981)
- 19.- OSTRO, M. J. "Liposomes". *SCI AM* **256**[1] 102-111 (1987)
- 20.- McWILLIAM, A. S. and STEWART G. A. "Production of multilamellar, small unilamellar and reverse-phase liposomes containing dust mite allergens. Potential adjuvant in the immunotherapy of allergic disease". *J IMMUNOL. METHODS* **6** [121(1)] 53-60 (1989)
- 21.- PAPAHDJOPOULUS, A. "Liposome formation and properties: An evolutionary profile". *BIOCHEM SOC TRANS* **16** [6] 910-912 (1988)
- 22.- ISHIMORI, Y., YASUDA, T. et al. "Liposome immune lysis assay (LILA): A simple method to measure protein antibody using protein antigen-bearing liposomes". *J IMMUNOLOGY METHODS* **31** [75(2)] 351-360 (1984).

- 23.- PATEL, H. M. and RUSSELL, N. J. "Liposomes: From membrane model to therapeutic applications" *BIOCHEM SOC TRANS* **16** [6] 909-910 (1987)
- 24.- ANNER, B. M. REY, H. G. and MEDA, P. "The use of liposomes in the study of Na^+ , K^+ -ATPase" *BIOCHEM SOC TRANS* **16**, 912-914 (1988)
- 25.- KRONBERG, B., DAHLMAN, A. et al "Preparation and evolution of sterically stabilized liposomes: Coloidal stability, serum stability, macrophage uptake and T". *J PHARM SCI* **79**[8] 667-671 (1990)
- 26.- AMSELEM S., GABIZON A. and BARENHOLZ Y. "Optimization and upscalies of doxorubicin-containing liposomes for clinical use" *J PHARM SCI* **79** [12] 1045-1052 (1990).
- 27.- ALVING, C.R. "Antibodies to Liposomes phospholipids and phosphate esters". *CHEM PHYS LIPIDS* **40** [2-4] 303-14 (1986).
- 28.- FOGLER, W. E., SWARTZ, G. M. and ALVING, C. R. "Antibodies to phopsholipids and liposomes: Binding of antibodies to cells" *BIOCHIM BIOPHIS ACTA* **903**, 265-272 (1987)
- 29.- SU, D. and VAN ROOIJEN, N. "The role of macrophages in the immunoadjuvant action of liposomes: effect of elimination of splenic macrophages on the immune response against intravenously liposome-associated albumin antigen" *IMMUNOLOGY* **66** [3] 466-470 (1989)

- 30.- MARUYANU, K., HOLMBERG, E. et al "Characterization of vitro immunoliposome targeting to pulmonary endothelium". *J PHARM SCI* 79[11] 978-984 (1990)
- 31.- RAMIREZ, D. A.SUMMERS, R. J. and EVANS, R. "The diagnosis of hymenoptera venom sensitivity". *ANN ALLERGY* 47 [5] 303-306 (1981)
- 32.- GIER, J. de "The use of liposomes in the search for an understanding of the significance of membrane lipid diversity" *BIOCHEM SOC TRANS* 16, 912-914 (1988)
- 33.- NASTRUZZI, C. GAMBARI, R et al "Tumor cell growth inhibition by liposome-encapsulated aromatic polyamides". *J PHARM SCI* 79[8] 672-677 (1990)
- 34.- WEISSING, V, LASCH, J and GREGORIADIS, G. "Covalent coupling of sugars to liposomes" *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1003, 54-57 (1989)
- 35.- CROWE, J.H., MCKERSIE, B. D. and CROWE, L. M. "Effects of free fatty acids and transition temperature on the estability of dry liposomes". *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 13 [979(1)] 7-10 (1989).
- 36.- LAW, S. L., LO, W. Y. and TEH, G. W. "Effect of liposomes on suspension stability". *J PHARM SCI* 76[7] 545-547 (1987)
- 37.- OSAWA, T and HARADA, H. "Preparation of liposomes by freeze-thawing method" *CHEM PHARM BULL* 33 [7] 2915-2918 (1985)

- 38.- HOTANI, H. "transformation pathways of liposomes" *J MOL BIOL* **5** [178(1)] 113-120 (1984)
- 39.- PAYNE, N. I., BROWNING, I. and HYNES, C. A. "Characterizacion of proliposomes". *J PHARM SCI* **75** [4] 330-333 (1986)
- 40.- STORM, G. "Potential pitfalls in vitro antitumor activity testing of free and liposome entrapped doxorubicin". *J PHARM SCI* **77** [10] 823-825 (1988)
- 41.- SUNAMOTO, J., IWAMOTO, K., IMOKAWA, G. and TSUCHIYA, S. "Possible eye-irritant test using polysaccharide-coated liposomes as a corneal epithelium model". *CHEM PHARM BULL* JUL **35** [7] 2958-2965 (1987)
- 42.- BOMFORD, R. "The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity". *CLIN EXP IMMUNOL* **39** 426-434 (1980).
- 43.- BACH, J.F. "INMUNOLOGIA" Editorial Limusa, México, D.F. 1ª Edición (1984) 853-861.
- 44.- SENIOR, J. and GREGORIADIS, G. "Dehydration-rehydration vesicle methodology facilitates a novel approach to antibody binding to liposomes". *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* **15** [1003(1)] 58-62 (1989)
- 45.- "PROGRESS IN THE CHARACTERIZATION OF VENOMS AND STANDARIZATION OF ANTIVENOMS" World Health Organization, Geneva, 1981.

- 46.- PAYNE, N. I., TIMMINS, P. et al "Proliposomes: A novel solution to an old problem". *J PHARM SCI* 75 [4] 325-329 (1986)
- 47.- SHAHUM, E. and THERIEN, M. "Immunopotential of the humoral response by liposomes: Encapsulation versus covalent linkage". *IMMUNOLOGY* 65 [2] 315-317 (1988)
- 48.- HEINDEL, N.D. "Effect of liposome and cyclodextrin entrapment on retardation of glutathion decomposition of nitroimidazol". *J PHARM SCI* 79 [10] 862-865 (1990).