



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA  
POTENCIA INMUNOGÉNICA DE TRES DISTINTOS  
FORMULADOS DE LA VACUNA M-TT.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

**VÍCTOR FRANCISCO JIMÉNEZ JUÁREZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2011**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ

**VOCAL:** Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

**SECRETARIO:** Profesor: BENITO ANTON PALMA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: OSCAR ARMANDO PEREZ MENDEZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: TERESA NERI GOMEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA “RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ”. CALZADA MÉXICO-XOCHIMILCO #101. MÉXICO D.F. C.P. 14370.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. Benito Anton Palma.

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Dr. Jorge Alberto Hernández Calderón.

**SUSTENTANTE:**

---

Víctor Francisco Jiménez Juárez.

---

## DEDICATORIA.

*El presente trabajo está dedicado  
a todos y cada uno de los  
miembros de mi familia, puesto  
que a través de los años la vida  
me ha indicado que son las únicas  
personas en este mundo que me  
aman y confían en mí DE  
VERDAD.*

*Gracias Dios mío por haberme  
dado las fuerzas y la sabiduría  
necesaria para ser paciente y  
perseverar en este arduo camino.*

*Así mismo, mi total  
agradecimiento y admiración a ti  
madre por tu amor y paciencia  
para conmigo... Papá, tías  
Mónica y Rosy, tío Héctor y  
Andrea, muchas gracias a ustedes  
también por su infinito amor,  
paciencia y cariño por mí, en  
verdad se los agradezco pues sin  
ello yo no podría haber llegado  
hasta aquí.*

*A todos mis amigos y amigas que  
también pusieron su cariño y  
confianza en mí, muchas gracias  
de verdad, pues ustedes saben que  
también son piezas claves en este  
juego de la vida.*

*Por último, permítaseme expresar  
lo siguiente:*

**“LA CLAVE DEL ÉXITO  
RADICA EN LA VOLUNTAD  
Y LA ACTITUD QUE SE  
TENGA PARA QUERER  
ALCANZARLO.”**

*A TODOS GRACIAS.*

---

## **AGRADECIMIENTOS.**

*Permítaseme agradecer a todas aquellas personas e Instituciones que contribuyeron para que el presente trabajo pudiera llevarse a cabo. A la Fundación Gonzalo Río Arronte A.C., INPRFM-2040, así como al proyecto de NTDA con clave 1R01DA030715-01.*

*Así mismo, deseo expresar mi total agradecimiento, afecto y admiración al Dr. Benito Antón Palma por haberme hecho partícipe de su grupo de trabajo de investigación, pero sobre todo por la confianza, estima y la amistad en mí depositada.*

*También mi agradecimiento a Juan Carlos Calva por sus consejos y sugerencias siempre tan útiles y oportunas en su debido momento; a los Doctores Jorge Alberto Hernández C. y Alberto Salazar Juárez por todo su apoyo y consejos que a fin de cuentas contribuyeron para mi formación académica, aparte de su ayuda incondicional y amistad durante estos años.*

*Y finalmente, a todos mis amigos y colegas con los que compartí gratas experiencias dentro de la convivencia laboral (Richard, Anabel, Gabby, Margarita, Héctor, Elizabeth, Javi, Erick, Diana, Alfredo, el Sr. Noé, Rodrigo A. y un muy largo etc.)*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
I.INTRODUCCIÓN .....	3
1.a. Breve historia de las vacunas y evolución de las mismas a través del tiempo hasta nuestra época. ....	3
1 b. Vacunas (Generalidades). ....	3
1.c. Conceptos básicos de vacunación.....	5
1.d. Inmunización activa. (Conceptualización).....	6
1.e. Vacunas Conjugadas. Definición, usos y aplicaciones. ....	7
1.f. Conjugación de haptenos a proteínas. ....	8
1.g. Presentaciones farmacéuticas y formulaciones más comunes que poseen las vacunas en el mercado actual. ....	10
1.h. Mecanismos de estimulación de la respuesta inmune por medio de adyuvantes que contienen aluminio.....	12
1.i. Aspectos químicos y farmacológicos de la morfina y de la heroína.....	17
1.j. Fármacoterapia para el tratamiento de la dependencia a opiáceos. (Tratamientos actuales de farmacología clásica para la adicción a opiáceos y sus limitaciones clínicas).....	18
1.k. Fundamentos y bases inmunológicas para explicar el esquema de inmunización convencional utilizando a la vacuna de M-TT. ....	21
II. ANTECEDENTES.....	24
2.a. Vacuna M-TT, diseño y funcionabilidad. ....	24
2.b. Inmunogénicidad de la vacuna M-TT.....	25
2.c. Efectos terapéuticos de la vacuna M-TT.....	26
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN. ....	28
IV. OBJETIVOS. ....	29

V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
A. Justificación y Planteamiento de las diversas formulaciones de vacuna M-TT.....	30
B. Monitoreo de la respuesta inmune humoral contra la morfina/heroína: Determinación de títulos de anticuerpos contenidos en los antisueros de animales inmunizados activamente contra este opiáceo, por ensayos de ELISA por captura de anticuerpo. ....	37
C. Protocolo general para realizar el ensayo de ELISA por captura de anticuerpo..	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	43
6.1 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 01 de sujetos de estudio.....	43
6.2 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 02 de sujetos de estudio. ....	47
6.3 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 03 de sujetos de estudio.....	50
6.4 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 04 de sujetos de estudio.....	53
6.5 Gráfico resumen en donde se expresa el promedio del título de anticuerpos obtenidos en cada sangrado, por cada grupo de experimentación.....	56
6.6 Análisis estadístico de resultados por medio de programas computacionales. ...	56
6.7 Resultados de las pruebas estadísticas, realizadas al conjunto de resultados obtenidos, para cada uno de los grupos experimentales. ....	58
6.8 Gráficos que resumen los resultados de las pruebas estadísticas realizadas a cada uno de los grupos experimentales. ....	61
VII. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS A FUTURO. ....	69
VIII. REFERENCIAS.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática de la estructura química de la morfina y la heroína.	17
Figura 2.a	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.)	44
Figura 2.b	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.)	44
Figura 2.c	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.)	45
Figura 2.d	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.)	45
Figura 2.e	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el quinto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.)	46
Figura 2.f	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.)	46
Figura 3.a	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.)	47
Figura 3.b	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.)	47
Figura 3.c	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.)	48
Figura 3.d	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.)	48

Figura 3.e	Valores aproximados del de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.)	49
Figura 3.f	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.)	49
Figura 4.a	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C)	50
Figura 4.b	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C)	50
Figura 4.c	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C)	51
Figura 4.d	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C)	51
Figura 4.e	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el quinto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C)	52
Figura 4.f	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C)	52
Figura 5.a	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C)	53

Figura 5.b	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C)	53
Figura 5.c	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C)	54
Figura 5.d	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C)	54
Figura 5.e	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el quinto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C)	55
Figura 5.f	Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C)	55
Figura 6	Gráfico de barras que indica los valores promedio de los títulos de Abs obtenidos en los seis sangrados del esquema de inmunización, para cada uno de los grupos experimentales en donde se estudiaron los diferentes formulados de la vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10)	56
Figura 7	Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del Grupo 01.	61
Figura 8	Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del Grupo 02.	62
Figura 9	Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del Grupo 03.	62
Figura 10	Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del grupo 04.	63
Figura 11	Gráficos de barras que expresa los valores máximos de título de Abs generados por cada formulado de la vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10).	63

Figura 12	Porcentaje de cambio de promedios de títulos de Abs. para cada formulación, con respecto al promedio de títulos de Abs. obtenido durante el primer sangrado, mismo que se tomo como referencia del estado basal para realizar dichas comparaciones.	64
-----------	---	----

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Promedio de títulos de Abs, obtenido para cada grupo experimental durante los seis sangrados correspondientes al esquema de inmunización que se siguió durante este proyecto experimental.	61
----------	--	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS.**

Ab – Anticuerpo.

Abs- Anticuerpos.

ANOVA – Análisis de varianza entre grupos. (Analysis Of Variance)

BSA- Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin).

CTLs CD8<sup>+</sup> - Linfocitos T citotóxicos tipo CD8<sup>+</sup>

DCs- Células Dendríticas.

ELISA - Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

EIA – Ensayos Inmunoenzimáticos.

FDA- Administración de alimentos y fármacos de los Estados Unidos de América (Food and Drugs Administration).

TNF – Factores de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factors).

HLA- Antígeno para leucocitos humanos (Human Leukocyte Antigen).

HRP- Enzima Peróxidasa de Rábano.

IL-1 – Interleucina 1.

MHC- Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex).

M-TT – Morfina -Toxoide Tetánico.

nm- Nanómetro (s).

OPD - Orto Fenildiamina. (Orto PhenilDiamine).

PAMPs – Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns).

T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup> - Células T ayudadoras tipo CD4<sup>+</sup>

TLRs - Receptores Toll (Toll Like Receptors)

## RESUMEN

El presente proyecto de investigación está enfocado en la propuesta de una formulación y evaluación de la potencia inmunogénica, para determinar la mejor presentación farmacéutica para la vacuna M-TT, que se sintetiza en el laboratorio de neurobiología Molecular y Neuroquímica de las Adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM).

El procedimiento convencional para almacenar a la vacuna M-TT, conlleva mantenerla congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , lo que ocasiona ciertas desventajas para un posible proceso de industrialización: manufactura, transporte y envasado de la misma. El objetivo principal de este trabajo de investigación, fue llevar a cabo un protocolo experimental con diversas formulaciones de la vacuna en cuestión, y decidir finalmente cual de todas las formulaciones ensayadas dentro de este proyecto será la más apropiada para la manufacturación de la misma, en función de la eficacia y potencia inmunogénica determinadas bajo el seguimiento del protocolo experimental propuesto a realizar en este trabajo de tesis.

Las diferentes formulaciones con las cuales se trabajó a la vacuna M-TT durante el desarrollo de este proyecto son descritas a continuación:

1. Fracción de vacuna M-TT liofilizada, y resuspendida posteriormente con agua estéril.
2. Formulación de vacuna M-TT en forma de suspensión más adición de timerosal como agente preservativo.
3. Fracción de vacuna M-TT previamente formulada y liofilizada posteriormente, cerrada al vacío y preservada a  $4^{\circ}\text{C}$ , lista para resuspenderse con agua estéril al momento de ser administrada.

Para poder cuantificar los títulos de anticuerpo correspondientes a cada una de las formulaciones usadas en este protocolo experimental, fue necesario realizar un esquema de inmunización, en donde se aplicaron seis inmunizaciones y consecutivamente se fueron obteniendo los antisueros correspondientes de cada una de las vacunaciones realizadas, mismos que fueron puestos bajo análisis de ensayo de ELISA por captura de anticuerpo. Los resultados finales de estos ensayos experimentales nos permitieron determinar cual formulación es la que posee mayor potencia inmunogénica, siendo este el parámetro a utilizar para tomar la decisión final, en la cual la vacuna de M-TT será manufacturada y puesta en una presentación farmacéutica para su posterior uso e investigación en pruebas clínicas.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1 a. Breve historia de las vacunas y evolución de las mismas a través del tiempo hasta nuestra época.**

Los antecedentes históricos de la vacunación se remontan a los procedimientos chinos de inhalación de polvo hecho de escaras secas de viruela para protegerse así de esta enfermedad. Más tarde, en 1721, lady Mary Montagu lleva este procedimiento denominado variolización a Europa.

En 1796 Edwuard Jenner publicó sus tratados acerca de la vacunación, en donde exponía la manera en la que utilizó material de pústulas de vacuna, la viruela de las vacas, para ser inoculadas en seres humanos a fin de protegerlos de las infecciones por la viruela humana. A finales del siglo XIX Louis Pasteur estableció las bases modernas de la vacunación utilizando cepas atenuadas de cólera aviario; estas mismas técnicas le permitieron desarrollar posteriormente vacunas contra el ántrax y la rabia.<sup>1</sup>

Actualmente, conforme se revelan las diferencias en las vías de procesamiento de los antígenos, los científicos desarrollan y diseñan vacunas que en muchos casos son acompañadas de coadyuvantes con la finalidad de llevar al máximo la presentación de los antígenos con moléculas de MHC de la clase I o II. Inclusive, en algunas ocasiones es necesario acudir a la ingeniería genética para desarrollar vacunas que maximicen la reacción inmunitaria contra epítopes seleccionados y simplificar su administración.<sup>2</sup>

### **1 b. Vacunas (Generalidades).**

La inmunización es la aplicación de antígenos en los individuos susceptibles mediante vacunación (inmunización activa) o administración de sueros con una gran cantidad de anticuerpos en contra del agente patógeno (inmunización pasiva).<sup>1</sup>

Una vacuna puede consistir en proteínas, polisacáridos o ácidos nucleicos de agentes patógenos que son expuestos al sistema inmune, como unidades simples, como parte de partículas complejas, como agentes vivos inactivados,

o vectores que inducen respuestas específicas que inactivan, destruyen o suprimen al agente patógeno.<sup>2</sup>

Las vacunas se componen esencialmente de:

- a) Un antígeno, cuya composición y naturaleza define el tipo de vacuna que se trata.
- b) Preservativos para impedir el crecimiento bacteriano (p.ej. timerosal)
- c) Estabilizadores del antígeno (p. ej. Glicerina)
- d) Una fase líquida donde está contenido el material antigénico. También puede contener un adyuvante asociado al antígeno.<sup>1</sup>

Una vacuna ideal, sería aquella que entre sus características contara con las siguientes:

- a) Administración fácil, por la vía más natural posible y en una sola dosis.
- b) Bien tolerada y segura, sin efectos adversos a corto o largo plazo.
- c) Respuesta inmune rápida, protectora y específica hacia el antígeno usado.
- d) Respuesta protectora de larga duración con mínima necesidad de dosis de refuerzo.
- e) Barata y de manejo y almacenamiento estables.<sup>1</sup>

Al momento de establecer el uso de una vacuna es indispensable seleccionar la dosis adecuada con la cual se alcanzará la protección inmunológica para la cual fue diseñada, así como también es necesario determinar el momento en que la vacuna será administrada y la vía de administración más conveniente, así como las condiciones bajo las cuales la vacuna mantendrá niveles de protección adecuados.<sup>1</sup>

### **1 c. Conceptos básicos de vacunación.**

Los PAMPs, por sus siglas en inglés (Pathogen Associated Molecular Patterns) son los sensores que tienen una función central en la detección de agentes patógenos dentro de la inmunidad innata, puesto que juegan un papel clave en la manera en que las células presentadoras de antígenos (APCs), como por ejemplo las células dendríticas (DCs), responden ante cierto agente patógeno. Así mismo, las células T tienen un importante papel dentro de la inmunidad adaptativa. Sus receptores reconocen péptidos en contexto con el MHC II (o HLA) que son moléculas que están en la superficie de estas células. Existen dos clases principales de células T: Linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTLs) restringidos a las moléculas de MHC de clase I, y las células T ayudadoras CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>) restringidas a las moléculas de MHC de clase II. Los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> monitorean virtualmente todas las células del organismo y poseen la habilidad de matar directamente a las células infectadas o que presentan complejos péptido-MHC de clase I, extraños o diferentes a los endógenos. Las células CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> son esenciales para muchas características principales de la inmunidad adaptativa. Una vez activadas, las células T<sub>H</sub> transmiten señales de soporte a través de interacciones directas y por liberación de citocinas a otras células propias del sistema inmune, por lo que estas células son las encargadas de iniciar y amplificar varias de las funciones efectoras específicas contra antígenos y por ende, son las que determinan la naturaleza de la respuesta inmunológica. En base al tipo de citocinas que secretan, las células T<sub>H</sub> pueden subdividirse en células T<sub>H</sub>1 que son las que están involucradas en la inducción de la inmunidad celular, así como también en la activación de macrófagos, activación del complemento, opsonización de anticuerpos del tipo IgG, citotoxicidad de células por medio de anticuerpos y la activación de CTLs vía IL-2. Se entiende entonces que, las células T<sub>H</sub>1 son las que atacan contra los virus intracelulares y bacterias patógenas, así como contra células cancerígenas; también son las encargadas de provocar la clásica reacción de hipersensibilidad que ocurre con la hinchazón de la piel y cuando se encuentran sobre activadas, generan enfermedades de tipo autoinmune.

Contrariamente, las células  $T_H2$  producen las citocinas IL-4,-5,-10 y -13, de modo que activan a las células B, mediando el cambio de las inmunoglobulinas (Ig) de la clase IgE a los subtipos IgG, con ligera activación del complemento y eosinófilos. Así entonces, la respuesta inmunitaria que confieren las células  $T_H2$  está involucrada con la inmunidad que confiere protección contra bacterias, parásitos y también juega un papel efector en el desarrollo de las reacciones alérgicas inflamatorias. Finalmente, las células T  $CD4^+$  tienen un papel importante durante la regulación de la respuesta inmunológica, notablemente por la vía de las células  $CD4^+$ ,  $CD25^+$ ,  $Foxp3^+$ , etc. Después del encuentro con el antígeno, estas células comienzan a dividirse (expansión clonal) para generar una población de células lo suficientemente grande, capaz de enfrentar al antígeno en cuestión. Una vez que el antígeno se ha eliminado del organismo, una subpoblación de células especializadas en reconocer a dicho antígeno, permanece en el cuerpo para dar a lugar a lo que se conoce como memoria inmunológica. En cuanto a las células B de memoria, se ha demostrado que los reservorios de células T específicas para un antígeno, persisten en los nódulos linfáticos que drenan el sitio de vacunación, donde se encargan de regular a las células B específicas al antígeno.

Cierto subconjunto de células T ayudadoras, como las células foliculares  $CXCR5^+ICOS^{hi}$ , expresan receptores de alta afinidad al antígeno embebido en una vacuna y coestimulan la producción de moléculas necesarias para las células B. Entonces, la vacunación con proteínas promueve la proliferación de células B mediante la selección de células  $T_H$  de alta afinidad al antígeno, creando reservorios para esta clase de células en los nódulos linfáticos cercanos al sitio de vacunación.<sup>5</sup>

#### **1 d. Inmunización activa. (Conceptualización)**

La finalidad de la inmunización activa es conferir inmunidad protectora y memoria inmunitaria. En este tipo de inmunización un antígeno determinado es introducido en el individuo susceptible para así iniciar la respuesta. Este tipo de respuesta es específica contra los epítopes que se encontraban en él y no contra otros, y cuando el organismo inmunizado se vea expuesto de nuevo a dicho antígeno en una ocasión ulterior, se generará una respuesta de memoria

que producirá los efectores inmunes necesarios para contener la infección o limitar el daño.<sup>1</sup>

La especificidad de la respuesta está condicionada por la estructura antigénica del agente infeccioso, o sus secuencias proteínicas o subproductos (toxinas) y se produce entonces una respuesta primaria en el individuo susceptible vacunado, mediada por los linfocitos B y T. La memoria generada se expresa en la protección dada por los efectores inmunes, anticuerpos y células T sensibilizadas en una respuesta al mismo antígeno administrado.<sup>1</sup>

### **1 e. Vacunas Conjugadas. Definición, usos y aplicaciones.**

En la actualidad, con mayor frecuencia se investiga la manera de favorecer eficientemente la generación de respuesta inmunológica con sustancias que poseen una estructura molecular muy sencilla o pequeña y que a primer instancia, por sus propiedades fisicoquímicas no podrían considerarse como candidatos a ser utilizados como materia prima para la síntesis y diseño de una vacuna, tal es el caso de los polisacáridos que recubren las paredes de las bacterias Gram (-) o moléculas como las que se usan en proyectos de investigación de vacunas de carácter anti adictivo.<sup>2</sup>

En el caso de las vacunas que están compuestas por polisacáridos de las paredes celulares de bacterias Gram (-), su principal limitación es su incapacidad para activar a las células  $T_H$ . Activan las células B del tipo 2 (TI-2) de una forma independiente del timo, lo que tiene como consecuencia la producción de IgM pero poco cambio de clase, maduración nula de la afinidad y poco desarrollo, en el mejor de los casos, de células de memoria.<sup>2</sup>

Como las células  $T_H$  no participan en la reacción, la vacuna derivada de dichos polisacáridos puede activar células B de memoria, específicas de IgA que se generaron con anterioridad con la exposición natural de las superficies mucosas a los antígenos bacterianos.<sup>2</sup>

Una manera de hacer participar a las células  $T_H$  en la reacción a un antígeno polisacárido consiste en conjugarlo o enlazarlo de manera covalente a una proteína acarreadora, cómo el toxoide tetánico por citar un ejemplo. El conjugado de polisacárido y proteína es mucho más inmunogénico que el

polisacárido por sí sólo y, puesto que activa a las células  $T_H$  permite el cambio de clase desde la IgM hacia la IgA. Este tipo de vacunas que se componen de una molécula de una sustancia pobremente antigénica, unida a una proteína acarreadora para aumentar su nivel de inmunogenicidad, reciben propiamente el nombre de vacunas conjugadas. Aunque este tipo de vacunas pueden inducir células B de memoria, no lo pueden hacer con células T de memoria específicas para el agente patógeno.<sup>2</sup>

En el siguiente inciso se describirá de forma general los conceptos fundamentales para comprender la conjugación de haptenos a proteínas y los principales procedimientos involucrados en dicho proceso.

### **1 f. Conjugación de haptenos a proteínas.**

La preparación de conjugados hapteno-proteína constituye una etapa intermedia en la preparación de determinado tipo de inmunógeno, sobre todo cuando es necesaria la producción de anticuerpos específicos contra sustancias que no son inmunogénicas (Abs anti-hapteno).

En general los haptenos se caracterizan por ser moléculas de una amplia diversidad de grupos funcionales. Dada la gran variedad de haptenos, existen numerosas vías para la preparación de dichos conjugados.

El término hapteno fue sugerido, por primera vez por Landsteiner en 1921<sup>7</sup>, a partir de entonces varios autores (Fieser, Davis, Stryer, Piatkin, etc.) se han referido al término hapteno de varias formas, entre ellas destacan las que definen a los haptenos como sustancias carentes de capacidad inmunogénica, que reaccionan selectivamente con anticuerpos específicos. Otra definición indica que, los haptenos son moléculas foráneas y pequeñas que no tienen la posibilidad de estimular la formación de anticuerpos; sin embargo, pueden intervenir en dicha formación si se encuentran enlazados a especies moleculares portadoras de grupos químicos o determinantes antigénicos.

De lo anterior se sugiere que, los haptenos son sustancias de naturaleza química sencilla, casi siempre de bajo peso molecular, que son incapaces de activar por sí solas el sistema inmunológico, pero cuando se acoplan o

conjugan a algún sustrato proteico en inmunogénico, pueden comportarse como inmunogénos.

Frecuentemente, son sus inmunodeterminantes específicos los que distinguen a los haptenos de otras moléculas relacionadas. El uso de estos grupos funcionales para formar el enlace en el conjugado, disminuye la especificidad de los anticuerpos antihaptenos. Anteriormente, en pruebas realizadas con morfina donde se obtuvieron anticuerpos específicos contra la 3-O-carboximetilmorfina acoplada a la seroálbumina bovina (BSA), se determinó que dichos anticuerpos reconocieron mejor a la codeína que a la morfina.<sup>8</sup>

Muchas macromoléculas han sido conjugadas con haptenos para la preparación de:

- Complejos inmunogénicos hapteno-proteína para la producción de anticuerpos antihaptenos,
- Reactivos para la detección de haptenos mediante ensayos inmunoenzimáticos (EIA),
- Y reactivos, los cuales, conjuntamente con los anticuerpos restringen o incrementan la aplicabilidad del EIA en fase sólida.

Para poder realizar una inmunización, es necesario un determinado número de grupos haptenos por cada molécula de proteína (comúnmente de 8 a 25 moléculas del hapteno a conjugar, por cada molécula de BSA), el anticuerpo es dirigido primeramente a la parte del hapteno que se encuentra más alejado del sitio donde se encuentra el enlace con la proteína.

En la conjugación de haptenos, es importante la elección del portador. Los más comunes son seroalbúminas de varias especies, generalmente las que son solubles en agua, como la ovalbúmina, entre otras proteínas altamente inmunogénicas como la hemocianina (KLH), trioglobulina o fibrinógeno.

La unión de los haptenos a las proteínas, generalmente ocurre por los grupos más reactivos de las proteínas:  $\epsilon$ - y  $\alpha$ - amino (pKa 10 y 8, respectivamente), fenólico, sulfhidrilo (pKa 9), imidazólico (pKa 7) y carboxílico (pKa 2-4).<sup>8</sup>

Los procedimientos para lograr la conjugación de haptenos a proteínas acarreadoras, están en correspondencia con los grupos funcionales aprovechables presentes en la molécula del hapteno en cuestión. Además de la naturaleza de estos grupos aprovechables, hay que tener en cuenta también, la estabilidad y solubilidad del hapteno.<sup>9</sup>

### **1 g. Presentaciones farmacéuticas y formulaciones más comunes que poseen las vacunas en el mercado actual.**

Como se mencionó anteriormente, las vacunas por lo general están compuestas principalmente por el antígeno en cuestión, el cual le confiere la naturaleza y establece la clase de vacuna que se trata, así mismo se les adiciona otro tipo de compuestos que les confieren características y propiedades particulares entre sí, tal es el caso de los agentes preservativos como el timerosal; agentes estabilizadores que ayudan a mantener la integridad y consistencia del antígeno y también muchas veces las vacunas están embebidas en vehículos o fases líquidas que ayudan al antígeno a que genere una respuesta inmunológica más robusta al momento de ser administrado, tal es el caso de los adyuvantes.

En preparaciones farmacéuticas el timerosal se ha utilizado como conservante de productos farmacéuticos. Ha sido usado en muy pequeñas cantidades en vacunas desde la década de 1930. En aplicaciones tópicas ha sido usado como fungicida o antibacteriano (gotas oftálmicas). La actividad antibacteriana está relacionada con la liberación del etil-Hg después de la ruptura espontánea y enzimática del timerosal en etil-Hg y tiosalicilato. A pH ácido el timerosal es bactericida. A pH alcalino o neutro es bacteriostático y fungistático. El timerosal puede ser añadido al final del proceso de producción, desde el producto final a granel hasta el envase final o en el diluyente de una vacuna liofilizada. El timerosal es usado como un agente inactivador en la fabricación de ciertas vacunas (*pertussis acelulares*). En este proceso, aun cuando no es usado como conservante, explica la presencia de cantidades mínimas de timerosal en la concentración final en vacunas (» 2µg/timerosal/ml). También es usado para evitar la contaminación bacteriana durante el proceso de producción de algunas vacunas (influenza) y para prevenir la contaminación

bacteriana y fúngica de vacunas durante su uso, particularmente de frascos multidosis. Si bien la probabilidad de contaminación es muy baja, el uso de conservantes en vacunas en general y en frascos multidosis en particular no elimina la posibilidad de contaminación bacteriana.<sup>3</sup>

Así como a cierto tipo de vacunas se les adicionan agentes preservativos como es el caso del timerosal, también es posible encontrar en el mercado farmacéutico formulaciones que poseen excipientes llamados adyuvantes (del latín "*adjuvare*"-ayudar), que ayudan al antígeno a aumentar la respuesta inmunológica en el organismo al cual le es administrado. El mecanismo de acción de estas sustancias es diverso: inducen la formación, durante un período de tiempo variado, de un depósito del antígeno en el sitio primario de aplicación o liberación, aumentando y estimulando su contacto con las células presentadoras de antígeno. Así mismo, pueden estimular la secreción de citocinas reguladoras. El uso de adyuvantes es esencial cuando se pretende la producción de vacunas a partir de moléculas pequeñas y péptidos sintéticos que por lo general suelen ser débilmente inmunogénicos. El adyuvante de mayor uso médico lo constituyen las sales de aluminio (hidróxido, sulfato), las cuales se usan en conjunto con toxoides. Otro adyuvante de uso común, restringido para uso sólo en animales por las reacciones inflamatorias locales que produce, es el coadyuvante incompleto de Freund.<sup>1</sup>

Una vez descritos los procesos por los cuales un hapteno se conjuga con una proteína para convertirse en una vacuna conjugada, y la importancia que tienen los adyuvantes como excipientes dentro de la formulación de las vacunas, nos enfocaremos en los mecanismos que poseen los adyuvantes (principalmente los que contienen aluminio) para estimular y favorecer a la respuesta inmune, con el fin de proporcionar un mejor entendimiento y fundamentar de manera inmunológica, el uso que se le dio al adyuvante utilizado durante este proyecto experimental.

## **1 h. Mecanismos de estimulación de la respuesta inmune por medio de adyuvantes que contienen aluminio.**

El efecto que tienen las sales de aluminio como adyuvantes fue reportado por primera vez en 1926, en base a las observaciones de que una fracción de toxoide diftérico que se precipitó en presencia de sales de aluminio, inducía una respuesta inmune más robusta que la que inducía una solución en donde estaba disuelto dicho toxoide.<sup>10</sup> Los adyuvantes que se agregan a las vacunas que se usan comercialmente en humanos, generalmente son compuestos de oxihidróxido de aluminio ( $\text{AlO}(\text{OH})$  comúnmente nombrado como hidróxido de aluminio) o hidróxifosfato de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$  comúnmente nombrado como fosfato de aluminio). Las vacunas que contienen derivados de aluminio se preparan por la adsorción de los antígenos a las partículas de los geles de hidróxido de aluminio o de fosfato de aluminio, o por precipitación *in situ* de los antígenos en una solución de alum ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). La dosis habitual de aluminio utilizado en vacunas para consumo humano es de alrededor de 0,5 mg. La cantidad límite superior permitida de hidróxido de aluminio como adyuvante para vacunas de uso en humanos, según lo indicado por la Organización Mundial de la Salud es de 1.25 mg y de 0.85 a 1.25 mg según lo reglamentado por la FDA de los Estados Unidos de América.<sup>15</sup>

Desde un punto de vista inmunológico, las principales desventajas de los adyuvantes derivados del aluminio, son su escaso o nulo efecto adyuvante con cierto tipo de antígenos, la inhabilidad de inducir respuestas inmunes mediadas por células T citotóxicas y la tendencia a inducir respuestas inmunes mediadas por inmunoglobulinas del tipo IgE, lo que puede provocar predisposición de cuadros alérgicos contra la vacuna en individuos susceptibles.<sup>11</sup>

➤ *Inflamación y reclutamiento de células presentadoras de antígenos (APCs).*

La inducción de la inflamación por los adyuvantes derivados de hidróxido de aluminio es de suma importancia para el reclutamiento de las APCs, así como para la liberación de citocinas y otros mediadores que inducen la maduración y la activación de las células dendríticas. Estudios histológicos reportan que el edema y la necrosis de algunas fibras musculares, promueven la infiltración de neutrofilos a las 24 o 72 horas después de la administración intramuscular de la vacuna con el adyuvante derivado de hidróxido de aluminio. También se ha reportado que 4 días después de la administración, un 25 % de las células que se infiltraron eran eosinófilos, después de 72 horas aparecieron monocitos que eventualmente incrementaron la inflamación granulomatosa. Es probable que estos monocitos se convirtieran en células dendríticas inmaduras una vez que salieron a los vasos linfáticos que drenan los nódulos linfoides.<sup>12</sup>

➤ *Retención del antígeno en el sitio de administración.*

La formación de un depósito en el sitio de administración que libera lentamente cantidades de antígeno durante un lapso prolongado de tiempo, ha sido considerada como el principal mecanismo por el que el hidróxido de aluminio estimula la respuesta inmune. Estudios sugieren que toma alrededor de tres días después de la administración para que lleguen nuevamente más células mononucleares, la retención del antígeno por este periodo de tiempo, debería facilitar la captación y presentación del antígeno. Los antígenos pueden ser retenidos en el sitio de inyección inclusive siendo adsorbidos de nuevo por el adyuvante o quedando atrapados en los espacios disponibles de los agregados del adyuvante.

Los antígenos que son adsorbidos por cambio de ligando, probablemente continúen estando adsorbidos después de la administración, mientras que los antígenos que se adsorbieron mediante fuerzas electrostáticas son diluidos bastante rápido una vez que entraron en contacto con el líquido intersticial. No obstante, algunos antígenos que se liberaron pueden volver a quedar

atrapados dentro de los agregados formados por las moléculas del adyuvante y permanecer en el sitio de administración. Se ha especulado que los antígenos que quedaron atrapados en los sitios disponibles de los agregados, retrasan suficientemente la difusión del antígeno desde el sitio de administración, para permitir la captación de los antígenos por medio de la entrada de las APCs.<sup>12</sup>

➤ *Maduración de las células dendríticas.*

Las vacunas se administran comúnmente por inyección dentro del musculo esquelético o tejido subcutáneo. Aunque la iniciación de la respuesta inmune ocurre en los nódulos linfáticos, los cuales podrían estar separados por una distancia considerable del sitio de administración, es probable que el efecto que tienen los adyuvantes derivados de aluminio en las células y tejidos cercanos al sitio de inyección sea crítico para la estimulación de la respuesta inmune. La proporción de antígeno adsorbido dentro de los geles de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, que se difunde por medio de los fluidos intersticial y linfático a los nódulos linfoides depende en la capacidad de adsorción y el coeficiente de adsorbatividad del adyuvante empleado, así como también del grado de desadsorción que presenta el antígeno una vez dentro del fluido intersticial.<sup>12</sup>

Las células dendríticas (DCs) también juegan un papel importante durante el transporte del antígeno a los nódulos linfáticos y la activación y presentación del antígeno ante las células T no activadas antígeno específicas. Las células dendríticas inmaduras son altamente eficientes en capturar y captar antígenos a sus receptores, mediante endocitosis, pinocitosis y fagocitosis. Una vez que las células dendríticas captan al antígeno en presencia de señales estimuladoras, las células dendríticas migran a los nódulos linfáticos a través de los vasos linfáticos aferentes. Durante su migración, las células procesan el antígeno para poder madurar finalmente, y con ello presentar eficientemente los péptidos antigénicos a las células T, activándolas mediante señales coestimuladoras, dirigiendo así la apropiada diferenciación de las células T efectoras.<sup>11</sup> Se ha demostrado recientemente que los adyuvantes derivados de aluminio facilitan la habilidad de las células dendríticas para activar a las

células T CD4<sup>+</sup> por lo que este tipo de adyuvantes no solo facilitan la captación del antígeno, sino que también ayudan a la eficiencia de la presentación del mismo antígeno con el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras.<sup>12</sup>

Debido a la eficiente activación de las células dendríticas por moléculas microbianas vía Receptores Toll (TLRs), no es de sorprender que la mayoría de los productos microbianos actúen como potentes adyuvantes. Probablemente, los adyuvantes derivados de aluminio no actúen vía TLR, debido a que el hidróxido de aluminio fue un adyuvante efectivo en ratones que carecían de MyD-88, una molécula facilitadora en el señalamiento del mecanismo de activación para TLR<sup>16</sup>, también cabe señalar que la naturaleza de sal mineral que presenta el hidróxido de aluminio es otro factor que lo inhabilita para desencadenar una respuesta inmune a través de TLRs. No obstante, se ha demostrado que los monocitos que circulaban por el torrente sanguíneo de los humanos que fueron administrados con toxoide tetánico adsorbido en hidróxido de aluminio, indujeron mucho mejor la proliferación de las células T autólogas, que los monocitos activados con toxoide tetánico en solución.<sup>13</sup> Lo que correlaciona con un incremento en la captación del toxoide tetánico que fue adsorbido en el hidróxido de aluminio y la inducción de secreción de IL-1. Las partículas del gel de hidróxido de aluminio son <10 µm de diámetro y por ende pueden ser más eficientemente captadas por medio de fagocitosis que los antígenos en solución. Recientes estudios muestran que el hidróxido de aluminio incrementa la expresión del MHC II y cierta cantidad de moléculas coestimuladoras de monocitos que se encuentran dentro del torrente sanguíneo, acompañado por un incremento en mRNA que expresa para IL-4 y un modesto incremento de IL-1, TNF e IL-6. La mayoría de estos monocitos se diferenciaron en células dendríticas, como lo indico su morfología y el incremento en la expresión de CD83, un marcador de células dendríticas maduras. La neutralización de IL-4 y la reducción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> abolieron el incremento de MHC II en las células monocíticas, lo que sugiere que el efecto del hidróxido de aluminio en estas células fue indirecto. Los adyuvantes derivados del hidróxido de aluminio también pueden activar a las células presentadoras de antígenos de forma indirecta, debido a que al

administrar este adyuvante de forma intramuscular causa dañado en el tejido y necrosis de algunas fibras de musculo esquelético, recientes estudios sugieren que la necrosis celular libera ciertas moléculas que aún no son identificadas, las cuales ayudan también a activar a las células dendríticas.<sup>11</sup>

- *Estimulación de la respuesta inmune de tipo 2 por adyuvantes derivados del hidróxido de aluminio.*

La activación del sistema inmune puede dirigirse hacia dos tipos de respuestas. La respuesta inmune de tipo 1 esta mediada principalmente por células y se caracteriza por la expresión de IFN- $\gamma$ ; la respuesta inmune de tipo 2 es una respuesta mediada principalmente por anticuerpos, caracterizada por la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13. El control del tipo de la respuesta inmune es complejo e incluye factores genéticos, dosis de antígeno y la naturaleza del agente infeccioso. Pese a esto, se sabe que los adyuvantes ejercen una fuerte influencia en el tipo de respuesta inmune que se sigue en un esquema de vacunación, así entonces el hidróxido de aluminio estimula selectivamente la respuesta inmune de tipo 2.

Ya se ha mencionado que las células dendríticas son las que transportan al antígeno desde el sitio de vacunación al sitio en donde se encuentran los nódulos linfáticos en donde finalmente presentarán su antígeno ante las células T específicas. En adición, las células dendríticas aparecen para facilitar el transporte del antígeno desde el punto de inyección a las células T de los nódulos linfáticos e instruir a las células T ayudadoras CD4<sup>+</sup> para que se diferencien en células efectoras T<sub>H</sub>1 (que se caracterizan por la secreción de IFN- $\gamma$ ) o T<sub>H</sub>2 (que secretan IL-4 e IL-5). La IL-2 juega un papel importante en la estimulación de la diferenciación de las células T<sub>H</sub>1 e induce la expresión de IFN- $\gamma$  por medio de las células T y las células NK, y es secretada principalmente por células dendríticas y macrófagos. Las células dendríticas que maduraron bajo la presencia de la IL-2 estimularon pobremente la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> hacía células T<sub>H</sub>1. En usencia de IL-2, las células dendríticas pueden inducir la diferenciación de las células T<sub>H</sub>2.

La IL-4 promueve la respuesta inmune de tipo 2 e inhibe a la respuesta inmune de tipo 1. La deleción funcional del gen que expresa para IL-4 no interfirió con el efecto adyuvante del hidróxido de aluminio y no afecto la diferenciación de las células T<sub>H2</sub> al continuar la secreción de IL-5. Sin embargo, en ausencia de IL-4, el hidróxido de aluminio induce anticuerpos IgG2a específicos para antígenos y la secreción de IFN- $\gamma$  por medio de células T lo que señaló la iniciación de una clásica respuesta inmune de tipo 1. Es por eso que se considera a la IL-4 y la IL-3 indispensables para que el efecto del adyuvante induzca el inicio de la respuesta inmune de tipo 2. Lo que concuerda con la observación de que la IL-4 suprime la secreción de la IL-2 por las células dendríticas.<sup>11</sup>

### 1 i. Aspectos químicos y farmacológicos de la morfina y de la heroína.

La morfina es un alcaloide muy potente del tipo de las bencilisoquinolinas (forma hidratada, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O) que actúa directamente sobre el sistema nervioso central (SNC) para aliviar el dolor.

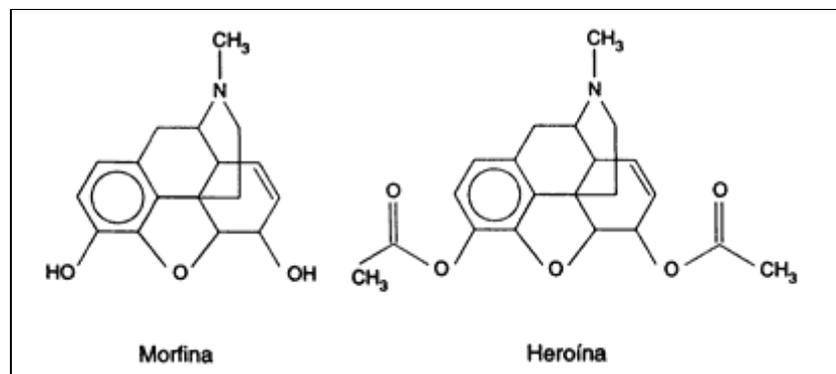


Figura 1. Representación esquemática de la estructura química de la morfina y la heroína.

La morfina representa el alcaloide más representativo y principal agente activo del opio (opio adormidera, *Papaver somniferum*) que contiene del 10% al 20% de la masa total del jugo que se obtiene al drenar a la planta de la amapola, presentando también compuestos fenantrénicos similares tales como la codeína (0.5%) o la tebaína (0.2%) y muchas otras bencilisoquinolinas como por ejemplo la papaverina (1.0%) y la noscapina (6.0%). Sin embargo, la morfina representa el prototipo de narcótico convencional, usada como

referencia al comparar las estructuras de otros compuestos sintéticos o semisintéticos (como por ejemplo, derivados de la misma morfina, benzomorfinas, metadona, fenilpiperidinas, etc.) que por lo general son de uso clínico.<sup>31</sup> Basándonos en la estructura fenantrénica de la morfina, esta sustancia ha demostrado ser capaz de unirse a diversos receptores de membrana del tipo opioides (como los receptores  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) clonados de tejido neural en mamíferos; siendo la morfina la más susceptible a unirse con mayor afinidad y selectividad al receptor opioide del subtipo  $\mu$  ( $K_i = 1.6-2.5$  nM), que es el receptor que regula un considerable número de bioactividades fisiológicas.<sup>18</sup>

Basándonos en la alta afinidad y especificidad que tiene la morfina para el receptor opioide  $\mu$ , este tipo de narcótico tiene un amplio espectro de efectos adversos, que varían desde los moderados hasta los más intensos como la euforia/disforia, dificultades respiratorias, náuseas, vómitos, sedación, hipotensión, retención urinaria, constipación y por supuesto, la adicción a este tipo de compuestos.<sup>17</sup>

La mayoría de los efectos farmacológicos de la heroína son similares a los de la morfina debido a la similitud que existe entre las estructuras moleculares de ambos compuestos, compartiendo así un perfil farmacológico similar al de la morfina para producir analgesia, sedación, inhibición de la motilidad intestinal y depresión de la función del sistema inmune.<sup>20</sup>

Sin embargo, la heroína posee diferentes parámetros fisicoquímicos que la distinguen de la morfina. Por ejemplo, si nos basamos en las pequeñas diferencias estructurales que hay entre las moléculas de la morfina y la heroína, la heroína posee un alto grado de lipofilia, por lo que es rápidamente absorbida por los compartimientos biológicos, siendo así mucho más permeable a la barrera hematoencefálica que la morfina debido a su naturaleza hidrofóbica.<sup>28</sup> Por otra parte, estudios actuales basados en las propiedades fisicoquímicas de la molécula de la diacetilmorfina, clasifican a la heroína como un precursor de los metabolitos activos de la morfina, con un alto grado de lipofilia, lo que en conjunto contribuye a los potentes efectos inducidos

después de que la diacetilmorfina ha sido metabolizada, indistintamente de la vía de administración (intravenosa, intranasal o inalada).<sup>21</sup>

### **1 j. Farmacoterapia para el tratamiento de la dependencia a opiáceos. (Tratamientos actuales de farmacología clásica para la adicción a opiáceos y sus limitaciones clínicas).**

Actualmente, existen muy pocos tratamientos farmacológicos diseñados a modificar algunos de los mecanismos farmacodinámicos por los que la morfina y la heroína producen reincidencia en el individuo adicto a este tipo de sustancias, una vez que llegan a unirse a los receptores específicos neuronales. La desintoxicación aguda representa el primer y más socorrido tratamiento terapéutico usado clínicamente en sujetos con adicción crónica a los opiáceos, el cual se ha vuelto prioritario dentro del ámbito de la clínica y las emergencias médicas para aliviar los síntomas y signos físicos propios que aparecen durante el lapso de abstinencia a este tipo de sustancias; los cuales son comúnmente asociados con descompensaciones fisiológicas, endocrinológicas y químicas inducidas por la adicción a opiáceos. Por ejemplo, el receptor opioide  $\mu$  es parcialmente agonizado con sustancias tales como la metadona y la buprenorfina en combinación con benzodiazepinas o sedantes neurolépticos que son prescritos y administrados comúnmente durante los tratamientos para la desintoxicación aguda a opiáceos.<sup>17</sup>

Otro tipo de terapia usada para el tratamiento de la adicción a opiáceos es donde se usan sustancias como la metadona y la buprenorfina, así como otras sustancias que son antagonistas del receptor opioide  $\mu$ , como por ejemplo naloxona, naltrexona o la combinación de ambas, la cual es una medida no recomendada totalmente durante el proceso de abstinencia, debido a que se exagera la demanda en el consumo de las sustancias opioides originales que eran consumidas por el adicto, y que lo llevaron al estado de adicción inicial en dicho individuo. Bajo condiciones normales, el tratamiento y cuidado necesario para un individuo que está pasando por el síndrome de abstinencia, requiere la hospitalización y cuidado clínico bajo la supervisión de personal médico, lo que comúnmente resulta ser un procedimiento altamente costoso para el paciente y sus familiares.<sup>17</sup>

Así entonces, los principales obstáculos a los que se enfrentan los tratamientos farmacológicos contra el abuso a opiodes, están relacionados con los efectos toxicológicos que resultan de usar a largo plazo uno o la combinación de los agentes farmacológicos descritos anteriormente.<sup>22</sup>

Adicionalmente, los agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  como la clonidina, guanfacina o la lofexidina, representan otro conjunto de compuestos usados últimamente con suma frecuencia en las terapias para aliviar los signos y síntomas del síndrome de abstinencia, causado por la supresión abrupta a las sustancias del tipo opioide. Sin embargo, además de su amplio uso en las terapias de desintoxicación a largo plazo o tratamientos para mantener la abstinencia en el consumo de opiodes, estas sustancias han mostrado que también inducen graves efectos adversos, por ejemplo la metadona, buprenorfina y la pentazocina se ha reportado que producen desordenes del sueño, cuadros de ansiedad y grave deterioro cognitivo y emocional. En adición, los agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , se ha reportado que producen sedación, hipotensión, ansiedad extrema y astenia cuando se han administrado por periodos de tiempo largos, además otro tipo de estudios ha revelado que la administración a largo plazo de antagonistas del receptor opioide  $\mu$  como la naloxona y la naltrexona ocasionan que se bloqueen los sistemas de transmisión de opiodes de tipo endógeno (encefalinas y endorfinas) que se llevan a cabo en las sinapsis cerebrales, lo que conlleva a que el paciente presente con frecuencia efectos emocionales negativos, como ansiedad o depresión.<sup>23</sup>

Con esto, podemos concluir que la mayoría de los tratamientos farmacológicos citados con anterioridad, para la terapéutica de la adicción a opiáceos, en su mayoría presentan problemas relacionados con los efectos adversos que se suscitan cuando las sustancias terapéuticas son administradas durante periodos largos de tiempo, es por ello que la mayoría de los pacientes que se someten a este tipo de tratamientos los abandonan cerca del primer año del periodo de abstinencia.<sup>17</sup>

Las estadísticas en la actualidad revelan que, en Europa y Norteamérica existen cerca de dos a cuatro millones de personas adictas a la morfina o a la

heroína, y que del uno al dos por ciento de dicha población mueren prematuramente cada año, principalmente a causa de la hepatitis C o por infección de VIH, como consecuencia de los hábitos que poseen los adictos a la heroína de administrarse dicha sustancia por vía intravenosa principalmente.<sup>22</sup>

Todo lo mencionado anteriormente con relación a las deficiencias que poseen los tratamientos farmacológicos de tipo convencional, contra el abuso a las sustancias opiodes, ha dado lugar a que se desarrollen nuevas alternativas terapéuticas no solamente para la morfina y la heroína, sino también para los otros tipos de sustancias adictivas como son la cocaína o la nicotina. Estas otras alternativas terapéuticas, están basadas en formulaciones farmacológicas con potencial farmacodinámico que disminuyan al máximo los efectos adversos cuando sean usadas en terapias a largo plazo, como las que conllevan a mantener y cuidar el grado de abstinencia de los pacientes adictos ya sea a la morfina o a la heroína.<sup>17</sup>

#### **1 k. Fundamentos y bases inmunológicas para explicar el esquema de inmunización convencional utilizando a la vacuna de M-TT.**

El primer paso para poder iniciar con un esquema de inmunización activa utilizando un hapteno como lo es la molécula de la morfina o la heroína, es precisamente el diseño y la síntesis de una vacuna conjugada donde una de estas dos drogas de abuso estén químicamente, e irreversiblemente enlazadas a una proteína que sea altamente inmunogénica y al mismo tiempo posea una alta masa molecular (proteína acarreadora), debido a que tanto la morfina como la heroína poseen una masa molecular muy pequeña y una estructura molecular relativamente simple, esto ocasiona que sean incapaces por si solas de generar un entrecruzamiento por parte de los receptores moleculares de superficie para IgM específicos de los linfocitos B y así poder activar una respuesta inmunológica capaz de generar anticuerpos específicos para el reconocimiento de las estructuras de dichos opiáceos.<sup>17</sup>

Tan pronto como se administra una formulación que contiene al conjugado inmunogénico de la vacuna M-TT en un sujeto de experimentación, se debería de activar una respuesta inmune humoral clásica, dentro de un lapso de tiempo

de 5 a 10 días.<sup>25</sup> Donde las células B no activadas deberían ser estimuladas por los determinantes antigénicos del complejo proteína acarreadora-droga conjugada (hapteno) y así convertirse en células diferenciadas secretoras de anticuerpos, que en su mayoría son del isotipo IgM específicos para los antígenos contenidos en la vacuna de M-TT, incluidos los epítomos determinantes de nuestro hapteno, es decir ciertas estructuras especiales de la molécula de la morfina/heroína.<sup>17</sup>

Algunas de las células B secretoras de anticuerpos, podrían sobrevivir en la médula ósea y continuar produciendo anticuerpos por largos periodos de tiempo. Las células B de memoria, cuya vida media es larga, podrían también ser generadas durante la respuesta humoral primaria. Una respuesta inmunogénica secundaria podría ser suscitada solamente si los mismos antígenos de la vacuna de M-TT son administrados en repetidas ocasiones y estimular de esta manera a las células B de memoria, permitiendo así una diferenciación y proliferación más rápida de cantidades considerables de anticuerpos específicos, como los producidos durante la respuesta primaria. La subsecuente administración de los haptenos propios de la vacuna de M-TT, deberían de activar una clásica respuesta inmune secundaria, durante un periodo de tiempo no mayor a 1 o 3 días.<sup>4</sup> Durante esta respuesta inmunológica la cantidad de anticuerpos específicos incrementa su concentración, variando de un isotipo a otro (por ejemplo de IgM a IgG), mostrando maduración en la afinidad debido las repetidas exposiciones a los mismos antígenos propios del conjugado: proteína acarreadora-antígenos de drogas de abuso.<sup>25</sup>

La mayoría de los anticuerpos del tipo IgG poseen un tiempo de vida media en sangre de entre 3 a 4 semanas, y son normalmente eliminados del organismo cerca de los 21 a 30 días después de la última vacunación. Debido a que la activación de los linfocitos B requiere del reconocimiento y unión a su superficie de los anticuerpos generados contra la vacuna de M-TT, se requiere de la estimulación de dichos anticuerpos, para eso es necesario administrar en forma periódica la preparación del conjugado inmunogénico de proteína acarreadora-morfina/heroína y así estimular al sistema inmune a generar una mayor cantidad de anticuerpos antidroga y con ello mantener elevado el nivel

de este tipo de anticuerpos circulando en el suero de cada uno de los sujetos de investigación sometidos a dichos esquemas inmunológicos. Se ha visto con anterioridad que dentro de los 3 a 6 meses subsecuentes a la última aplicación del conjugado inmunogénico, los niveles de este tipo de anticuerpos específicos decae hasta un grado en el cual son indetectables por algún método inmunoquímico con lo son los ensayos de ELISA o los RIAs.<sup>17</sup>

## **II. ANTECEDENTES**

La posibilidad de efectuar un proceso de vacunación activa enfocado al tratamiento de la adicción a la heroína fue estudiado alrededor de unos 30 años atrás por Bonese y colaboradores.<sup>6</sup> Los cuales mostraron que la respuesta mantenida por este opioide fue selectivamente abolida después de la inmunización activa con un derivado inmunogénico de este enervante, el conjugado de la morfina-6-hemissucinil-BSA (M-6-H-BSA), mismo que se administro en monos Rhesus entrenados para auto administrarse heroína. De manera sorpresiva, no hubo mayor avance en cuanto a los estudios de investigación con otros modelos de vacunas anti opiáceos apropiados para uso humano y que no tuvieran como base de síntesis a la BSA como proteína acarreadora. No fue hasta el 2006, que se publicó un artículo de investigación en donde se exponían los ensayos y estudios realizados por el equipo de trabajo del Dr. Anton y colaboradores en donde se propone la validación a nivel pre-clínico de un nuevo modelo estructural para la vacuna anti heroína diseñada para uso clínico en seres humanos.

### **2 a. Vacuna M-TT, diseño y funcionabilidad.**

Inicialmente, el quipo de trabajo del Dr. Anton se abocó al diseño y síntesis de un nuevo modelo de vacuna anti morfina compuesta por un conjugado inmunogénico ideal para su uso en humanos, el cual está compuesto por el Toxoide Tetánico como proteína acarreadora, la cual se une de manera covalente a la morfina dando lugar así a la vacuna denominada M-TT (Morfina-Toxoide Tetánico), misma que se ha demostrado que es capaz de generar una respuesta inmunológica lo suficiente robusta como para sostener altos títulos de anticuerpos por la vía de vacunación activa.<sup>4</sup>

En el conjugado M-TT, la morfina se ha haptenizado de forma covalente a los grupos  $\epsilon$ -amino que quedaron libres del lado de la cadena de residuos de lisina de la proteína acarreadora (toxoides tetánicos (TT)), la cual es una proteína altamente inmunogénica, usando un brazo espaciador de una longitud aproximada de 20.15 amstrongs.<sup>4</sup>

Se ha demostrado que la longitud del brazo espaciador y la manera en que este es colocado entre la proteína acarreadora y la molécula de morfina, separa lo suficientemente entre sí a estas dos sustancias, y las orienta en el espacio de forma tal que al final, el brazo espaciador es el que ayuda a que el conjugado de la vacuna de M-TT sea altamente inmunogénico.<sup>26</sup>

La vacuna de M-TT no solamente usa una proteína acarreadora altamente inmunogénica y aprobada por la FDA para uso humano<sup>27</sup>, sino que también cuenta con el brazo espaciador el cual es del doble del tamaño del que comúnmente se utiliza en otros conjugados de morfina-6-hemisuccinil-BSA que son covalentemente haptenizados al grupo hidroxilo de la posición 6, a través de dos uniones amida que lo vuelven aún más estable.<sup>4</sup>

El brazo espaciador está formado por una cadena alifática de átomos de carbono de baja complejidad estructural, lo que reduce su papel como un determinante inmunogénico cuando la morfina haptenizada a él es expuesta a las células del sistema inmune.<sup>4</sup>

## **2 b. Inmunogenicidad de la vacuna M-TT.**

Se sabe de antemano que la vacuna M-TT es una vacuna capaz de generar una respuesta inmunológica lo suficientemente robusta como para generar títulos de anticuerpos bastante altos después de una cuarta revacunación en los animales experimentales que han sido expuestos a esquemas de inmunización usando dicho conjugado inmunogénico. No obstante se observó que la vacuna M-TT no sólo es capaz de generar una respuesta inmune robusta, sino que también los títulos de anticuerpos obtenidos fueron mayores que los que habían sido reportados con anterioridad en estudios de inmunogenicidad para otras vacunas antidrogas probadas en ratas, siendo casi de un orden de magnitud mayor que los mejores títulos obtenidos en estudios de vacunas administradas en humanos.

Por su naturaleza fisicoquímica, la morfina es una sustancia pobremente inmunogénica por sí sola, es por eso que se argumenta que los altos títulos de anticuerpos obtenidos al administrar dicha vacuna son obtenidos gracias al alto poder inmunogénico que posee el toxoide tetánico, el cual es la proteína

acarreadora usada en la síntesis de la vacuna M-TT, así también la naturaleza química y la longitud del brazo espaciador le confiere a la morfina hapténizada la suficiente libertad espacial dentro del conjugado para volverse una vacuna altamente inmunogénica y antigénica para el sistema inmune.<sup>4</sup>

### **2 c. Efectos terapéuticos de la vacuna M-TT.**

La vacuna M-TT introduce dos novedosas ventajas estructurales que nunca antes se habían propuesto en otros conjugados inmunogénicos similares, incluido el conjugado pionero M-6-H BSA usado por Bonese y colaboradores.<sup>6</sup> La primera ventaja estructural, es el uso del toxoide tetánico como proteína acarreadora, el cual es una proteína altamente inmunogénica y al mismo tiempo es una proteína cuyo uso en humanos está regulado y permitido por la FDA. La otra ventaja que posee dicha vacuna es la presencia en su estructura química, de un brazo espaciador formado por una cadena alifática de residuos de átomos de carbono, el cual es lo suficiente largo como para separar y al mismo tiempo unir en forma covalente la morfina a la proteína acarreadora, usando dos puentes amida los suficientemente estables.

Aunque recientes estudios sugieren que la vacuna M-TT representa un atractivo candidato para ser usado en pruebas clínicas de fase I para evaluar su seguridad e inmunogenicidad como posible medicamento contra la adicción a la heroína y/o morfina, se deberían de realizar estudios adicionales dirigidos a evaluar los posibles efectos tóxicos que dicha vacuna pudiera llegar a tener en otras especies de animales experimentales, como por ejemplo conejos o primates. Sin embargo, se debería implementar un programa de ensayos clínicos con el fin de evaluar la eficacia y la seguridad inmunogénica de la vacuna de M-TT en pacientes que voluntariamente desearan ser expuestos a estos tipos de pruebas.<sup>4</sup>

Debido a que los anticuerpos generados después de la inmunización con la vacuna M-TT no pueden cruzar la barrera hematoencefálica, se esperaría que los efectos de este tipo de anticuerpos no fueran de naturaleza psicoactiva. Es por eso que el uso de la vacuna M-TT pudiera servir como una alternativa dentro de la gama de tratamientos relacionados con la adicción y la prolongada abstinencia a este opioide, donde se usan agentes farmacológicos clásicos

como la metadona, el levo- $\alpha$ -acetilmetadiol (LAA) o la buprenorfina, que mimetiza la acción de la heroína a nivel de los receptores para opioides.

El uso de la vacuna M-TT en combinación con las terapias farmacológicas existentes, podría ser útil para reducir la duración del uso de los sustitutos adictivos, donde se ha observado que desarrollan nocivos efectos secundarios cuando se administran en periodos a largo plazo, lo que finalmente contribuye a la alta incidencia en el abandono de este tipo de tratamientos y consecuentemente a la recaída en el consumo de la heroína.

La vacuna M-TT podría ser usada como una terapia alternativa para el tratamiento de la adicción a la heroína, en países donde la prescripción médica y la autorización de los agentes farmacológicos como la metadona y la buprenorfina/naloxona aún no estuvieran disponibles.<sup>4</sup>

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.**

En el laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, se desarrolló un proyecto de investigación orientado hacia la formulación, evaluación, determinación e identificación del formulado más óptimo y adecuado para la vacuna de M-TT, la cual se ha probado en grupos experimentales de ratones BALB-C hembras y se ha observado con anterioridad que es una vacuna capaz de estimular una respuesta inmunológica lo suficientemente robusta y por lo tanto capaz de formar inmunoglobulinas G, capaces de reconocer epítopos de la molécula de morfina.<sup>4</sup> Sin embargo, después de haber sido sintetizada y purificada, la vacuna M-TT es congelada en alícuotas a -20°C para su almacenaje y conservación hasta el momento en que es usada.

Debido a que se proyecta el escalamiento piloto de la síntesis de la vacuna de M-TT, se presentó la necesidad de generar nuevas formas de almacenar y formular a la vacuna, para así poder facilitar el proceso de manufactura e industrialización de la misma, y al mismo tiempo optimizar su posible uso a futuro en pacientes que se encuentren incorporados a un tratamiento anti adictivo o para uso en el ámbito clínico.

Para desarrollar el objetivo general del proyecto sobre la formulación, identificación y determinación del formulado farmacéutico óptimo para llevar a cabo la preparación de la vacuna M-TT, fue necesario plantear un esquema de vacunación activa para tres grupos diferentes de 8 sujetos experimentales cada uno, que en este caso fueron ratones hembra BALB-C de 6 semanas de nacidas al momento de iniciar dicho protocolo experimental. Por otra parte, se sintetizó un lote de vacuna M-TT con el que se prepararon cada uno de los distintos formulados que fueron estudiados en este trabajo. La cuantificación y monitoreo de la respuesta inmunológica que levantaron cada uno de los formulados farmacéuticos se determinó mediante la realización de ensayos de ELISA por captura de anticuerpo, mismos que fueron ensayados conforme se obtuvieron cada una de las muestras provenientes de los sangrados realizados a todos y cada uno de los sujetos de experimentación.

#### **IV. OBJETIVOS.**

##### **OBJETIVO GENERAL:**

- El objetivo de este trabajo de tesis de licenciatura, es el de cuantificar por medio de ensayos de ELISA por captura de anticuerpo la respuesta inmunológica que desarrollan tres distintos formulados de la vacuna de M-TT.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Estudiar la respuesta inmunológica que presentan los distintos formulados que se prepararon para la vacuna de M-TT.
- Determinar si el proceso de liofilización, resuspensión con agua estéril y posterior alícuotado y congelamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  de la vacuna M-TT, afecta la potencia inmunológica de la misma, en comparación con la fracción de vacuna M-TT que solamente se alícuotó y se congelo a  $-20^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de su síntesis.
- Determinar si el formulado que presenta la vacuna de M-TT en forma de suspensión conteniendo timerosal como agente preservativo, es capaz de generar una respuesta inmunológica igual o mejor que la que genera la vacuna de M-TT que se encuentra en alícuotas congeladas listas para descongelarse y formularse al momento de ser utilizadas.
- Determinar si el formulado que presenta la vacuna de M-TT en forma de liofilizado para ser re suspendido con agua estéril al momento de usarse, es capaz de generar una respuesta inmunológica igual o mejor a la que genera la vacuna de M-TT que se encuentra en alícuotas congeladas listas para descongelarse y formularse al momento de ser utilizadas.
- Determinar finalmente cual de los tres formulados que se prepararon para la vacuna de M-TT, es el óptimo para fines de almacenaje, envasado y manufactura a nivel industrial para la posible comercialización de dicha vacuna.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

En el laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de adicciones se llevó a cabo la síntesis de un lote de vacuna M-TT la cual quedó disuelta en solución PBS y conservado en alícuotas a -20°C. Dichas alícuotas de vacuna M-TT disuelta en solución PBS, se usaron para la creación de las diversas formulaciones que se estudiaron. Posteriormente se procedió a determinar mediante una serie de ensayos de ELISA por captura de anticuerpo la potencia inmunogénica de dicho lote de vacuna bivalente morfina-heroína (M-TT), en un grupo de ocho ratones BALB-C hembras de 6 semanas de edad, que fueron inmunizadas en seis ocasiones con dosis de 100 µg de M-TT/100 µL, empleando como adyuvante hidróxido de aluminio (IMJECT ALUM PIERCE®), realizándose la colecta de muestras sanguíneas cada catorce días. Los resultados obtenidos a partir de dichos ensayos indicaron que la potencia inmunogénica de dicha vacuna es lo suficientemente robusta como para poder generar una respuesta inmune en el organismo de cada uno de los sujetos sometidos a dicho ensayo y generar altos títulos de anticuerpos capaces de reconocer a la molécula de la morfina-heroína.

A partir de lo anterior, se planteó la necesidad de determinar la formulación óptima para poder cumplir con el objetivo de almacenar, transportar, y manufacturar a dicha vacuna, y al mismo tiempo, conservar íntegramente las propiedades inmunológicas que posee. De esta cuestión nació la idea y la propuesta del proyecto experimental para llevar a cabo este trabajo de tesis de licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biológico.

### **A. Justificación y Planteamiento de las diversas formulaciones de vacuna MTT.**

Con el fin de cumplir satisfactoriamente con los objetivos planteados para este proyecto experimental de tesis de licenciatura, se procedió a formular las siguientes propuestas de presentaciones farmacéuticas para la vacuna M-TT.

- a) Se sintetizó la vacuna, se alícuotó en solución, preservándose mediante congelación a -20°C.

- b) Se liofiliza una fracción de dicha vacuna, se re-suspende con agua estéril, y se alícuota en solución, preservándose mediante congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- c) Se formula y se adiciona un agente preservativo (timerosal), se alícuotan las dosis, cerrándose al vacío y sellando con tapa de aluminio. Preservándola mediante refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- d) Se formula y liofiliza en alícuotas como vacuna individual para ser posteriormente reconstituida con agua estéril, y se almacena a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- e) Se contemplo también un grupo control constituido por solución PBS 0.1 M, pH= 7.4 + IMJECT ALUM PIERCE® + solución de timerosal al 0.05%.

Así mismo, para determinar la potencia inmunogénica de dichos formulados farmacéuticos, se requirió usar ratones BALB-C hembras de 6 semanas de edad. Conformándose grupos de 8 sujetos de experimentación cada uno. Todos los grupos (incisos a –d) recibieron dosis de  $100\mu\text{g}$  de M-TT / $100\mu\text{L}$  solución. El número total de inmunizaciones por cada sujeto de experimentación fue de seis inoculaciones. En relación al segundo grupo control sobre toxicidad del timerosal, estuvo constituido por un grupo de 6 ratones, y también cada sujeto experimental recibió un total de seis vacunaciones cada 14 días, conforme a lo acordado en el protocolo experimental.

Las tomas de muestras sanguíneas se realizaron de la siguiente manera:

- a) Sangrado preinmune.
- b) Se tomaron muestras sanguíneas cada catorce días posteriores a la correspondiente inmunización.
- c) Centrifugado de las muestras para separar el coagulo del suero, e identificación de los mismos y posterior almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Una vez obtenidos los sueros de cada una de las inmunizaciones, se llevó a cabo el correspondiente ensayo de ELISA por captura de anticuerpo, para determinar la potencia inmunogénica de cada uno de los distintos formulados preparados para la vacuna M-TT.

Por último, una vez que se hubieron realizado los ensayos de ELISA por captura de anticuerpo, las placas de 96 pozos en donde se realizaron dichos ensayos, se llevaron al lector de placas de ELISA, donde se leyeron a una longitud de onda de 490 nm con el fin de determinar las densidades ópticas correspondientes a cada una de estas placas, y así obtener los datos que se usaron en la elaboración de los gráficos para determinar el título de Abs de cada una de las muestras experimentales, por medio de programas computacionales como MICROSOFT Excel® y ORIGIN®.

Con la elaboración de dichos gráficos y la posterior obtención del título de Abs correspondiente a cada muestra obtenida, se monitoreó la capacidad inmunogénica de los formulados preparados para la vacuna M-TT, que se estudiaron durante la realización de este protocolo experimental.

A continuación se describirá la forma en que fue preparado cada formulado farmacéutico, exponiendo las cantidades usadas de vacuna M-TT, coadyuvante y solución salina estéril utilizada en cada grupo, así como también se mencionan las dosis que se administraron a cada sujeto experimental, según el grupo correspondiente.

**Grupo 1. (Control A)** La vacuna M-TT que se encontraba alicuotada en solución y preservada a -20°C, se descongeló para su debida formulación, conforme al siguiente esquema:

Número de ratones, n= 8

Dosis de vacuna por ratón: 100 µg Vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10) /100 µL

Relación Vacuna M-TT/IMJECT ALUM PIERCE® 2:1 en 100 µL de solución

$100/3 = 33.33$

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10): 874.3 µg / 350 µL por alícuota.

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10) 874.3 µg ----- 350 µL

100 µg ----- X= 40 µL

Formulación:

➤ Para n=1

40 µL vac. M-TT (Lote: L=19Feb10) + 26.7 µL SSE + 33.33 µL IMJECT ALUM  
PIERCE® = 100 µL

➤ Para n=10

400 µL vac. M-TT Lote:L=19Feb10 + 267 µL SSE + 333.3 µL IMJECT ALUM  
PIERCE® = 1000 µL

**Grupo 2.** Se liofilizó una fracción de la vacuna M-TT, posteriormente se resuspendió con agua estéril y se alícuotó en solución, conservándose en congelación a -20°C.

Número de ratones, n= 8

Dosis de vacuna por ratón: 100 µg M-TT /100 µL

Relación Vacuna M-TT/ IMJECT ALUM PIERCE®, 2:1 en 100 µL de solución

100/3 = 33.33

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10): 874.3 µg / 350 µL por alícuota.

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10) 874.3 µg ----- 350 µL

100 µg ----- X= 40 µL

Para diez alícuotas se tiene: 8743 µg / 3500 µL, que fueron segmentadas en tres tubos viales, conteniendo cada uno de ellos aproximadamente: 2914.3 µg /1166.7 µL; mismos que fueron congelados a -80°C y posteriormente sometidos a un proceso de liofilización.

El lote de Vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10) que fue liofilizado, se resguarda en congelación a -20°C hasta su posterior resuspensión con agua estéril.

Finalmente, se formaron siete alícuotas conteniendo cada una de ellas 1000  $\mu\text{g}$  de Vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10) liofilizada, en un volumen de 1000  $\mu\text{L}$ , los cuales se almacenaron en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Conforme las alícuotas de Vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10) se utilizaron, fueron descongeladas alícuota por alícuota a intervalos de 14 días, para poder formular así las dosis de vacuna con las que fueron administrados los ocho sujetos experimentales del grupo, hasta completar un ciclo de seis inmunizaciones; previo a cada inmunización se tomaron muestras sanguíneas.

**Nota:** Con el fin de favorecer una mejor adsorción de la vacuna a las partículas de hidróxido de aluminio del adyuvante, una noche antes de la administración, dicha formulación se dejó en agitación continua y a temperatura ambiente todo el conjunto de dosis que fueron administradas.

**Grupo 3.** Se formuló la vacuna M-TT y se le adicionó un agente preservativo que en este caso fue timerosal, posteriormente se alicuotaron las dosis, cerrando los frascos al vacío y sellándolos con tapa de aluminio. Preservándolos en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Número de ratones,  $n=8$

Dosis de vacuna por ratón: 100  $\mu\text{g}$  M-TT /100  $\mu\text{L}$

Relación Vacuna M-TT/ IMJECT ALUM PIERCE® 2:1 en 100  $\mu\text{L}$  de solución

$$100/3 = 33.33$$

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10): 874.3  $\mu\text{g}$  / 350  $\mu\text{L}$  por alícuota.

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10) 874.3  $\mu\text{g}$  ----- 350  $\mu\text{L}$

$$100 \mu\text{g} \text{ ----- } X = 40 \mu\text{L}$$

Formulación:

➤ Para  $n=1$

40  $\mu\text{L}$  vac. M-TT (Lote: L=19Feb10) + 26.7  $\mu\text{L}$  SSE + 33.33  $\mu\text{L}$  IMJECT ALUM PIERCE® + 50  $\mu\text{g}$  Timerosal = 100  $\mu\text{L}$

➤ Para n=10

400 µL vac. M-TT Lote:L=19Feb10 + 267 µL SSE + 333.3 µL IMJECT ALUM PIERCE® + 500 µg Timerosal = 1000 µL

Se preparó un volumen equivalente a siete inmunizaciones de la vacuna de M-TT (Lote: L=19/Feb10), para la inoculación de los ocho sujetos experimentales del grupo, debido a que por cada inmunización se utiliza un mililitro de la formulación (10 dosis), el volumen total a preparar fue de 7.0 mL. Al que se le adicionaron 3.5 mg de timerosal, el cual quedó finalmente en una concentración de 0.05% p/v. Esta formulación se agitó durante la tarde/noche en forma continua, posteriormente se realizaron las siete alícuotas conteniendo cada una de ellas las diez dosis. El preparado fue cerrado al vacío y se le colocó un collarín de aluminio, para ser finalmente resguardado en refrigeración a 4°C. Se tomó una alícuota para realizar el esquema de inmunización en intervalos de 14 días, hasta completar un ciclo de seis inmunizaciones. Posterior a cada inmunización se realizó la debida toma de muestra sanguínea.

**Grupo 4.** Se formuló la vacuna M-TT, liofilizada en alícuotas como vacuna individual para ser reconstituida con agua estéril, y por último se almacenó a 4°C.

Número de ratones, n = 8

Dosis de vacuna por ratón: 100 µg Vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10) /100 µL

Relación Vacuna M-TT/IMJECT ALUM PIERCE® 2:1 en 100 µL de solución

$100/3 = 33.33$

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10): 874.3 µg / 350 µL por alícuota.

[VACUNA M-TT] (Lote; L=19Feb10) 874.3 µg ----- 350 µL

100 µg ----- X= 40 µL

Formulación:

➤ Para n=1

40  $\mu\text{L}$  vac. M-TT (Lote: L=19Feb10) + 26.7  $\mu\text{L}$  SSE + 33.33  $\mu\text{L}$  IMJECT ALUM PIERCE® = 100  $\mu\text{L}$

➤ Para n=10

400  $\mu\text{L}$  vac. M-TT Lote:L=19Feb10 + 267  $\mu\text{L}$  SSE + 333.3  $\mu\text{L}$  IMJECT ALUM PIERCE® = 1000  $\mu\text{L}$

Se preparó un volumen equivalente a siete inmunizaciones de la vacuna de M-TT, para la inoculación de los ocho ratones del grupo, debido a que por cada inmunización grupal se utiliza un mililitro de la formulación (10 dosis), el volumen total a preparar fue de 7.0 mL. La formulación se agitó durante la tarde/ noche en forma continua, posteriormente se realizaron las siete alícuotas conteniendo cada una de ellas las diez dosis, mismas que fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y al día siguiente se sometieron a un proceso de liofilizado. Después de ser liofilizadas, cada una de las alícuotas se colocó en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se tomó una alícuota para resuspender la formulación e inocular conforme al esquema de inmunización en intervalos de 14 días, hasta completar un ciclo de seis inmunizaciones.

**Grupo 5. (Control B)** Se preparó un grupo control constituido por solución buffer de PBS+alum+ Timerosal equivalente al 0.05%.

Formulación:

➤ Para n=1

66.66  $\mu\text{L}$  PBS + 33.33  $\mu\text{L}$  IMJECT ALUM PIERCE® + 50  $\mu\text{g}$  Timerosal = 100  $\mu\text{L}$

➤ Para n=10

666.6  $\mu\text{L}$  PBS +333.3 $\mu\text{L}$  IMJECT ALUM PIERCE® + 500  $\mu\text{g}$  Timerosal= 1000 $\mu\text{L}$

Se preparó un volumen equivalente a siete inmunizaciones, para la inoculación de los ocho sujetos experimentales, debido a que por cada inmunización grupal se utiliza un mililitro de la formulación (10 dosis), el volumen total a preparar fue

de 7.0 mL. Al que se le adicionaron 3.5 mg de timerosal, el cual quedó finalmente en una concentración de 0.05% p/v. La formulación se sometió a agitación durante la tarde/noche en forma continua, y posteriormente se realizaron las siete alícuotas conteniendo cada una de ellas las diez dosis. El preparado se cerró al vacío y se le colocó un collarín de aluminio, para ser resguardado en refrigeración a 4°C. Se tomó una alícuota para realizar el esquema de inmunización correspondiente en intervalos de 14 días, hasta completar un ciclo de seis inmunizaciones.

**B. Monitoreo de la respuesta inmune humoral contra la morfina/heroína: Determinación de títulos de anticuerpos contenidos en los antisueros de animales inmunizados activamente contra este opiáceo, por ensayos de ELISA por captura de anticuerpo.**

Para poder efectuar el monitoreo de los anticuerpos obtenidos al vacunar a nuestros sujetos de experimentación, con los diferentes formulados para la Vacuna M-TT y así poder caracterizar finalmente el comportamiento inmunoquímico de cada uno de estos formulados, se procedió a realizar una serie de ensayos de de ELISA por captura de anticuerpo para poder analizar y determinar el título de anticuerpos obtenidos para cada una de las muestras provenientes de los sangrados realizados a cada uno de nuestros sujetos experimentales.

A continuación se describirá brevemente el fundamento del ensayo de ELISA, mediante el cual está sustentada la mayor parte de los resultados obtenidos para este proyecto de investigación.

El ensayo de ELISA por captura de anticuerpo se basa en el uso de antígenos o anticuerpos, que en este caso estuvieron marcados con la enzima HRP, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima y fijado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato

especifico que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Cabe mencionar que básicamente existen tres tipos de ensayos de ELISA:

- ❖ Ensayo de ELISA directo
- ❖ Ensayo de ELISA indirecto y
- ❖ Ensayo de ELISA “en sandwich”

De estos tres tipos de ensayos, el que se uso durante todo el proceso de esta investigación fue el ensayo de ELISA del tipo indirecto, el cual a grandes rasgos consta de las siguientes etapas experimentales:

- I. Fijación al soporte insoluble de antígenos, los cuales corresponden a conjugados proteicos de la morfina unida covalentemente a la proteína BSA, la cual es una proteína heteróloga distinta en composición química y estructura molecular al toxoide tetánico que se utiliza para sintetizar la vacuna de M-TT. Este tipo de antígenos son muy específicos para los anticuerpos objeto de estudio (los cuales provienen de los sueros obtenidos al sangrar a cada uno de los sujetos de experimentación). Una vez fijados los antígenos denominados de fase sólida a la placa de 96 pozos, se procede a realizar una serie de lavados para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
  
- II. Adición del suero problema, que es el suero que se obtuvo una vez centrifugadas las muestras sanguíneas obtenidas para cada sujeto experimental, de tal forma que los anticuerpos contenidos en dichos sueros reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. De nuevo, una vez que se ha dejado el tiempo suficiente para que estos anticuerpos contenidos en las muestras experimentales interactúen con los antígenos fijados a la base de los pozos de las placas se procede a realizar de nuevo una serie de lavados para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado.

III. Inmediatamente después de los lavados de los anticuerpos que no reaccionaron, se procede a adicionar los denominados segundos anticuerpos los cuales son una serie de anticuerpos anti murínicos conjugados con una enzima, que en este caso corresponde a la enzima HRP, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Una vez terminado el tiempo de incubación de estos segundos anticuerpos, se precede a realizar una última serie de lavados para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

IV. La etapa posterior a la incubación de los segundos anticuerpos, es la adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora, que en este caso es el correspondiente al OPD, el cual es el sustrato que reacciona con la enzima HRP y es el encargado de generar la reacción colorimétrica en los pozos de las placas de ELISA.

V. Por último, la etapa final del ensayo de ELISA indirecto, corresponde a la lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.<sup>30</sup>

A continuación, se describirá con detalle los pasos que se siguieron durante el protocolo experimental, para realizar cada uno de los ensayos de ELISA en este proyecto experimental.

### **C. Protocolo general para realizar el ensayo de ELISA por captura de anticuerpo.<sup>29</sup>**

1) Fijación de la Fase Sólida (BSA-Mor) a los pozos de la micro placa para ensayo de ELISA.

En este caso se agrega la cantidad de 1µg de Fase Sólida a cada uno de los pozos de la micro placa de ELISA (100 µg), disuelta en un volumen de 10 mL, de una solución de PBS 0.1 M, pH=8.0 (100 µL de solución fase sólida/PBS por cada uno de los pozo de la micro placa).

2) Cantidades de reactivos a utilizar para preparar un volumen de **1.0 L** de solución PBS:

- Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ): 3.1 g
- Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ): 10.9 g
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ): 9.0 g

3) Se hace el ajuste de pH con el uso del potenciómetro, el cual deberá asegurarse que esté debidamente calibrado y limpio antes de uso.

4) Agregar 1  $\mu\text{g}$  F. sólida / pozo. Para 100 pozos entonces se necesitan 100  $\mu\text{g}$  de F. sólida.

- Caso hipotético donde tenemos una concentración dada de fase sólida y deseamos conocer el volumen a utilizar de la misma para hacer el ajuste de la cantidad necesaria a utilizar en nuestro ensayo:

$$[\text{BSA-Mor}] = 833 \mu\text{g} \text{ ----- } 250 \mu\text{L}$$

$$100 \mu\text{g} \text{ ----- } X = 30 \mu\text{L}$$

5) Tratamiento de la solución de fase sólida BSA-Mor. Previo a su correspondiente uso:

- Esperar a que el tubo que contiene a la solución de fase sólida BSA-Mor. Se descongele y alcance la temperatura ambiente.
- Una vez que la solución de fase sólida BSA-Mor ha alcanzado la temperatura ambiente, se lleva a un baño de agua a  $40^\circ\text{C}$  para dejar en agitación moderada a dicha solución por un lapso de 15 a 30 min.
- Paso seguido, se lleva el tubo con la solución de fase sólida de BSA-Mor. A centrifugación a una velocidad de 8000 rpm por 6 min.
- Todo esto, con el fin de asegurar que la fase sólida BSA-Mor. Se encuentre perfectamente en solución, y evitar la formación de grumos y agregados dentro del mismo tubo contenedor.

5) Aplicar 100  $\mu$ L/ pozo de solución de PBS 0.1 M, pH= 8.0/Fase sólida. Para 100 pozos, entonces se necesitan 10, 000  $\mu$ L (10.0 mL) de la misma solución PBS 0.1 M.

6) Adicionar el volumen requerido de solución de Fase Sólida BSA-Mor a 10.0 mL de solución PBS 0.1 M pH= 8.0.

7) Aplicar a la placa de ensayo de ELISA según corresponda, 100  $\mu$ L de solución de solución PBS 0.1 M pH= 8.0 + BSA-Mor. Con una octapipeta.

8) Se cubre la placa con parafilm y se deja incubando en refrigeración a 4° C, por toda la noche.

9) Al día siguiente a la incubación, se realiza el lavado de las placas de ensayo 5 veces con Buffer de ELISA (solución de PBS 0.1 M, pH=7.4 + Tween 20 marca SIGMA al 0.3% y gelatina de teleostean marca SIGMA al 1.0%).

10) El 5to lavado se deja incubando y se recubren las placas con parafilm.

11) Incubación a temperatura ambiente y agitación para el bloqueo con gelatina de teleostean al 1.0% de los sitios no activados, por 30 minutos.

12) Preparación del tren de dilución.

- Suero Preinmune (Spl). Dilución 1:100. Se toman 5  $\mu$ L del suero preinmune y se llevan a un volumen final de 500  $\mu$ L con Buffer de ELISA.

- 1er Ab: Para la dilución 1:100.

1-----100

X=5  $\mu$ L antisuero-----500  $\mu$ L dilución  
(5 $\mu$ L antisuero + 495  $\mu$ L de Buffer de ELISA)

Para la dilución 1:1000.

Tomar 50  $\mu$ L de la dilución 1:100 + 450  $\mu$ L de Buffer de ELISA.

Para la dilución 1: 10, 000.

Tomar 50  $\mu$ L de la dilución 1:1000 + 450  $\mu$ L de Buffer de ELISA.

etc. Hasta llegar a la dilución 1: 1 000, 000.

13) Al término del bloqueo de los sitios no activados, se retira exceso de Buffer de ELISA y se aplican 100  $\mu$ L de cada dilución de antisueros (tren de dilución) por triplicado.

14) Al término de la adición de las diluciones de antisueros se cubre cada placa con parafilm y se lleva a refrigeración a 4 °C por toda la noche.

15) Lavado de las placas 5 veces con Buffer de ELISA, se reserva el 5to lavado.

16) Preparación del 2° Ab anti-ratón (ANTI-MOUSE IgG [whole molecule] Peroxidase Conjugate, Marca SIGMA. CAT. No.: A4416, LOT: 067 K6004).

1 placa  $\rightarrow$  100 pozos, y 100  $\mu$ L / pozo, entonces necesitamos 10,000  $\mu$ L totales.

Dilución: 1 ----- 5000

X=2  $\mu$ L Ab anti-ratón ----- 10, 000  $\mu$ L

Por lo tanto, en 10 mL de Buffer de ELISA frío se adicionan 2  $\mu$ L de 2° Ab anti-ratón.

17) Con octapipeta se aplican 100  $\mu$ L de dilución 1:5000 del 2° Ab, a temperatura ambiente y se agita por 2 horas continuas.

18) Preparación del buffer para OPD (SIGMAFAST™ OPD), se coloca una tableta de dicho buffer en 20 mL de agua grado Milli-Q y se agita en el vortéx.

19) Al término de la incubación se lava cada placa 5 veces con PBS para quitar residuos de la solución del 2° Ab anti-ratón.

20) Adicionar 1 tableta de OPD al buffer para OPD y agitar con vortéx.

21) En condiciones de semioscuridad se aplica con octapipeta a cada placa 100  $\mu$ L de solución de OPD y se cubre la placa con papel aluminio.

22) Tomar lectura de las absorbancias a 490 nm por encima de los pozos a los 20 y 60 minutos de haber aplicado la solución de OPD, y realizar las debidas gráficas con los valores de las absorbancias obtenidas, para determinar el valor aproximado del título de Abs, de cada una de las muestras.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

Durante todo el proceso de experimentación, cada uno de los grupos de estudio fue expuesto a un esquema de inmunización de 6 vacunaciones en total, en donde a cada sujeto se le tomaron muestras sanguíneas al término de los 14 días posteriores a la última vacunación a la que se le sometió. Acto seguido, se alicuotaron los sueros correspondientes a cada muestra obtenida y se procedió a continuar con la realización de los ensayos de ELISA por captura de anticuerpo, que nos permitieron monitorear los títulos de anticuerpos generados por el sistema inmunológico de los sujetos experimentales sometidos a dicho esquema de vacunación activa.

A continuación se muestran los gráficos que exponen el valor numérico aproximado del título de inmunoglobulinas IgG que se obtuvieron después del esquema de vacunación activa usando tres distintos formulados que contenían a la vacuna M-TT, correspondientes a los sujetos experimentales de cada uno de los grupos formados para este proyecto de tesis.

- Gráficos de títulos de anticuerpos obtenidos durante el primer esquema de vacunación.

### **6.1 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 01 de sujetos de estudio.**

Este grupo es denominado grupo control porque es el grupo que nos permitirá hacer las comparaciones pertinentes con los demás grupos experimentales, debido a que a diferencia de ellos, este grupo en especial es el que no posee una presentación farmacéutica como tal, es decir, es el grupo experimental que fue tratado con la vacuna de M-TT en su forma convencional de uso, que es la que hasta el momento se había manejado y trabajado tradicionalmente en el laboratorio de neurobiología de adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente.”

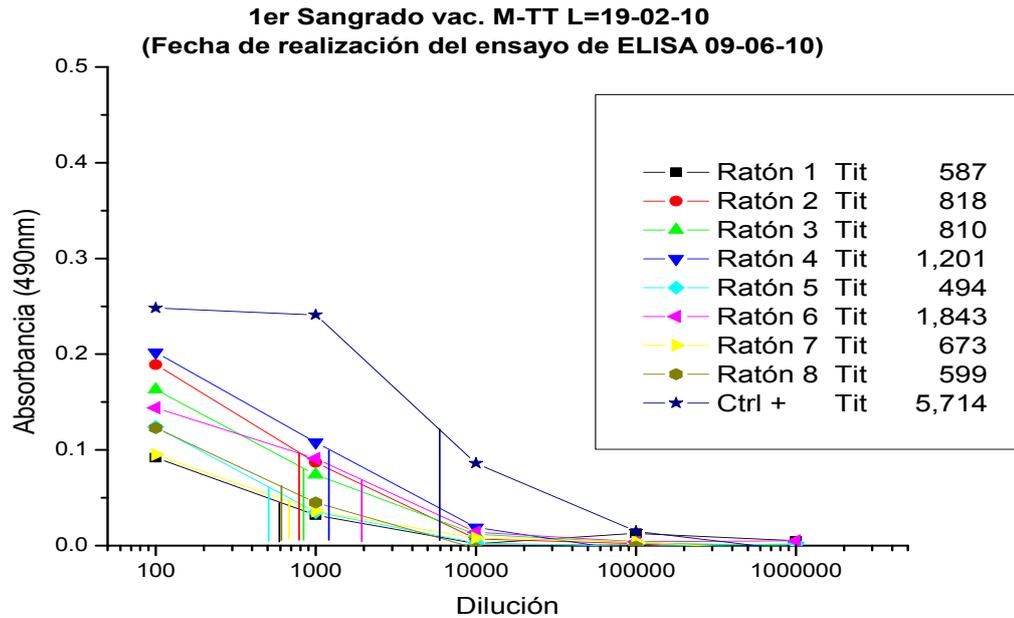


Figura 2.a. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 6,200.

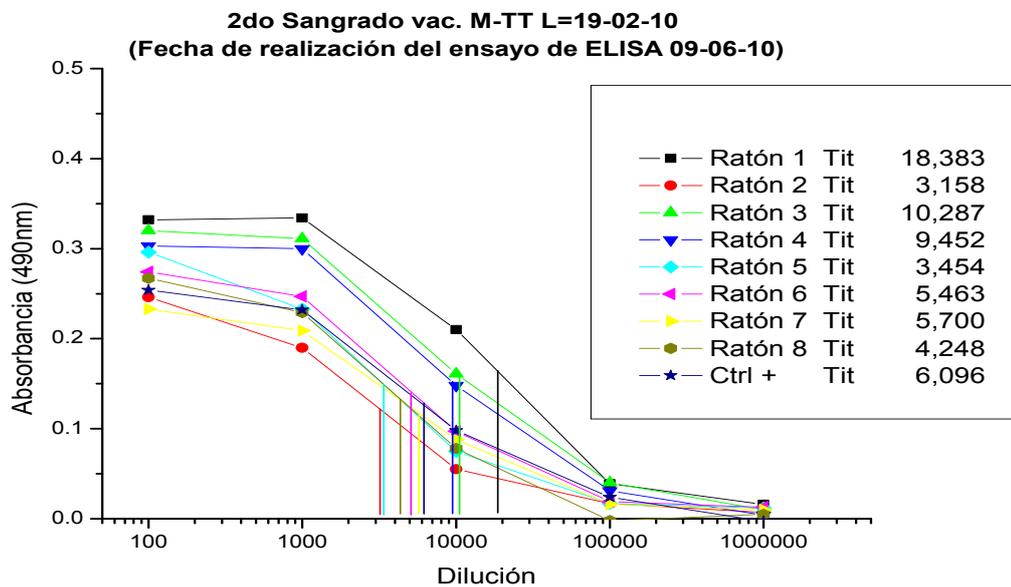


Figura 2.b. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 6,200.

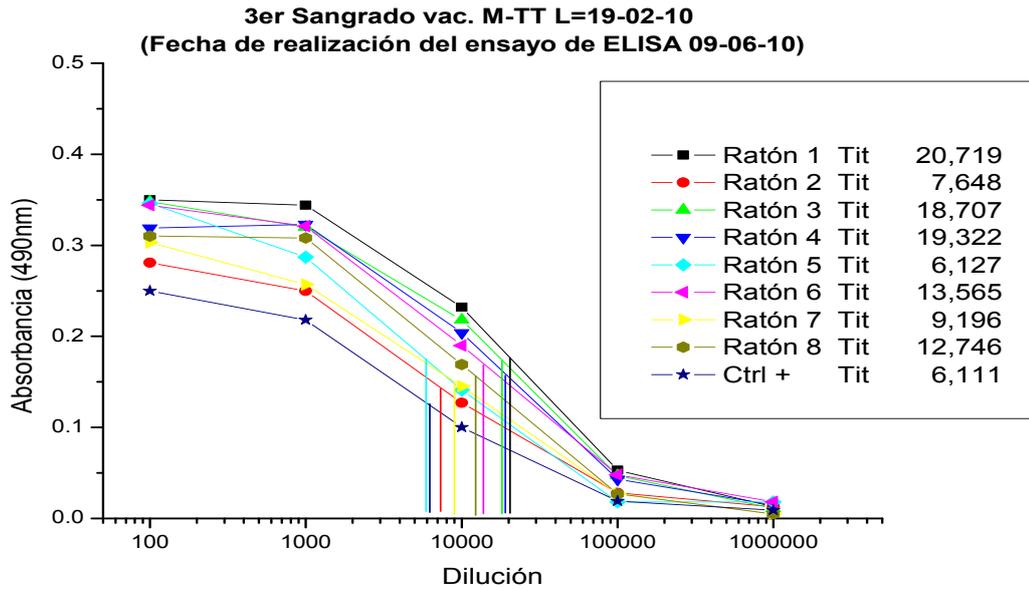


Figura 2.c. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 6,200.

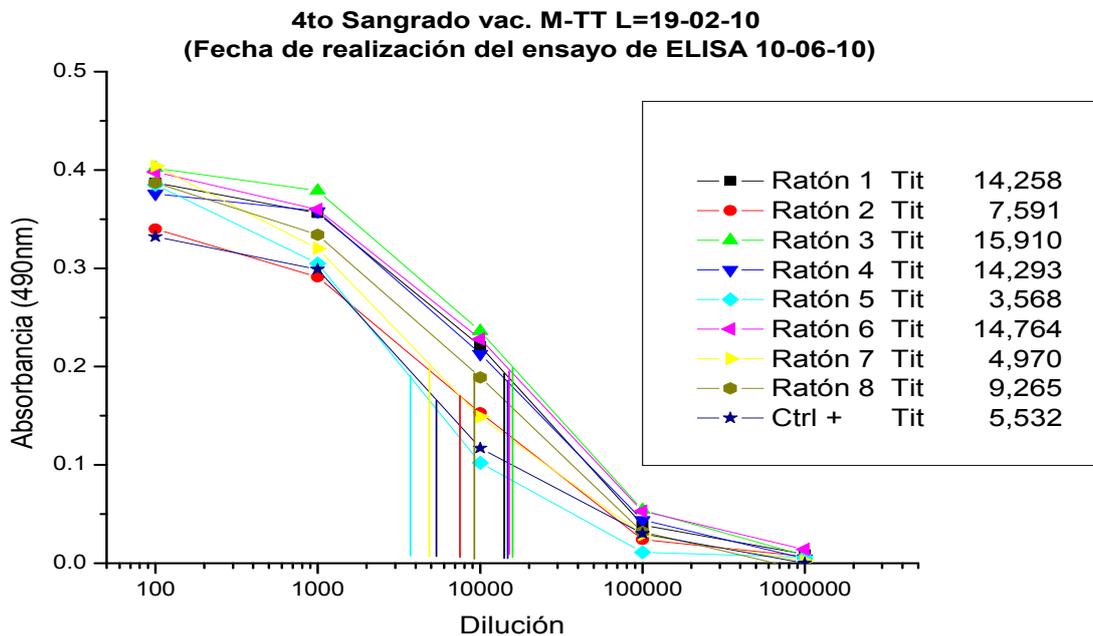


Figura 2.d. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 6,200.

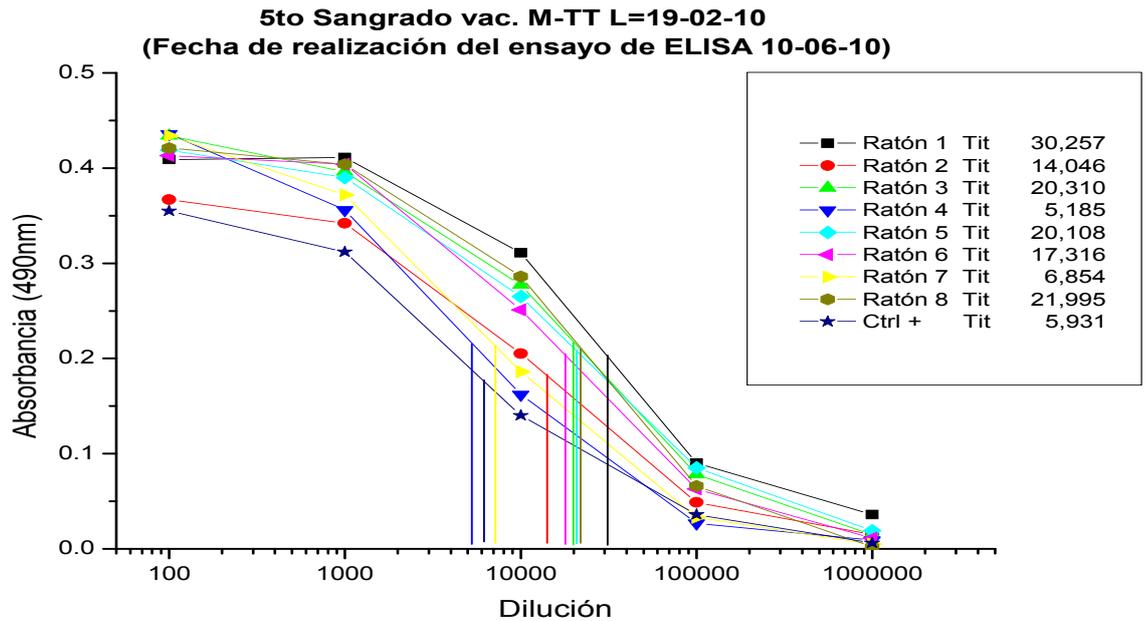


Figura 2.e. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el quinto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 6,200.

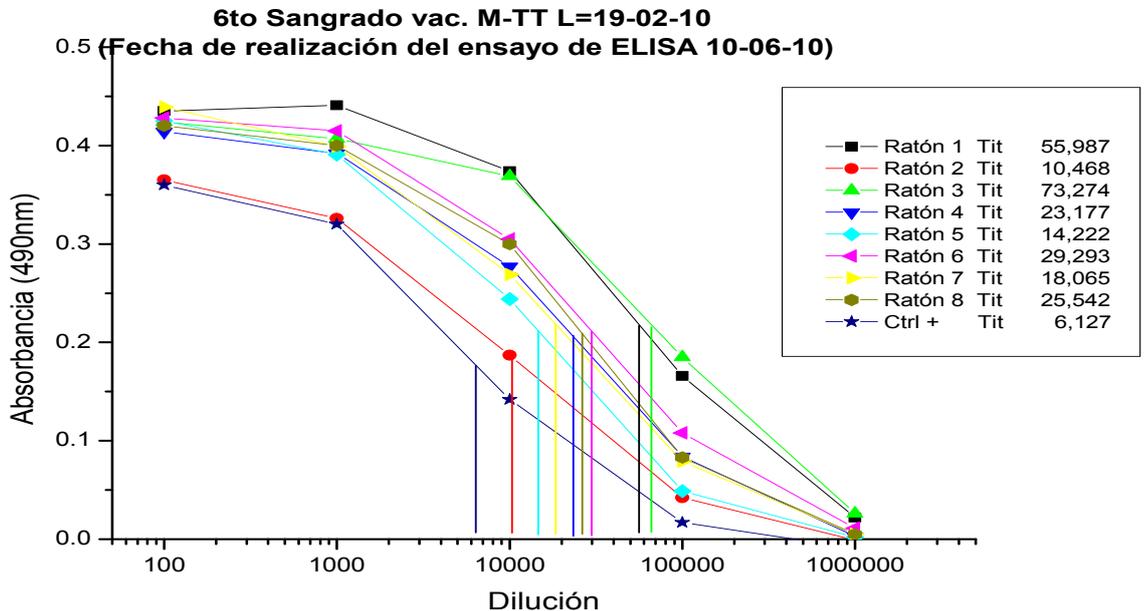


Figura 2.f. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 01 (CONTROL A. Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó y se conservó en alícuotas a -20°C para su uso posterior.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 6,200.

## 6.2 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 02 de sujetos de estudio.

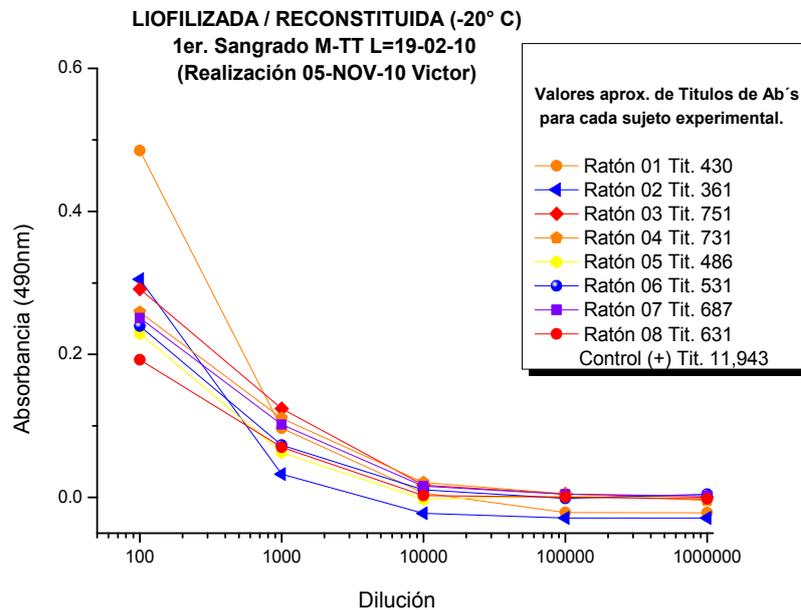


Figura 3.a. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

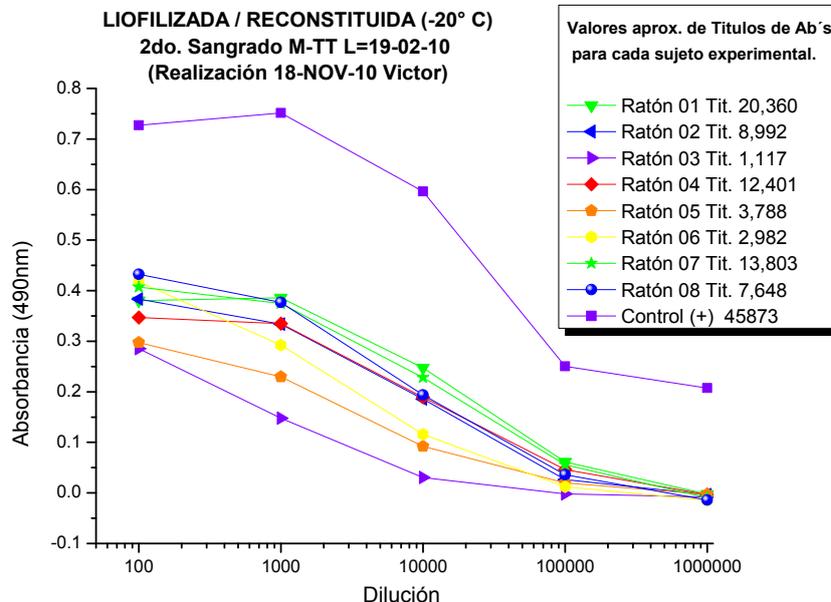
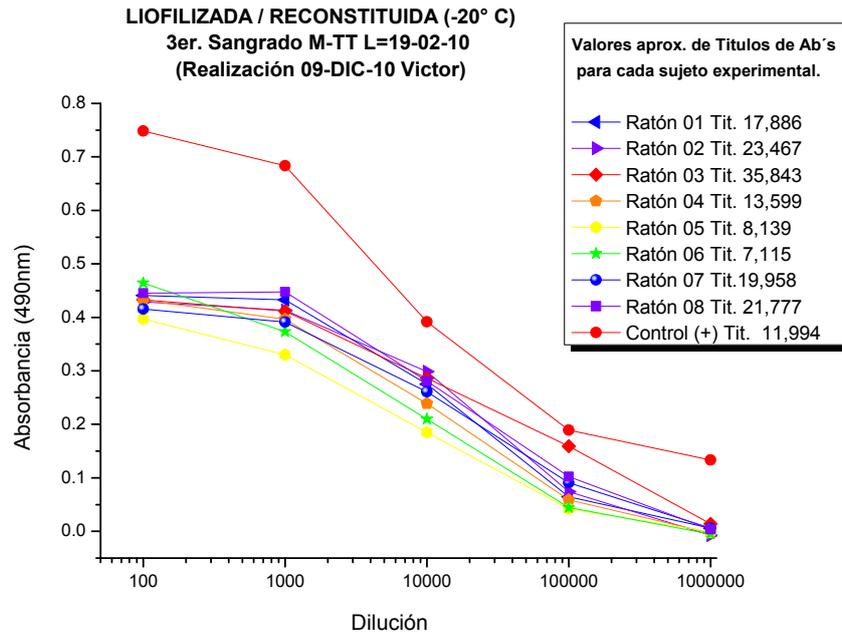
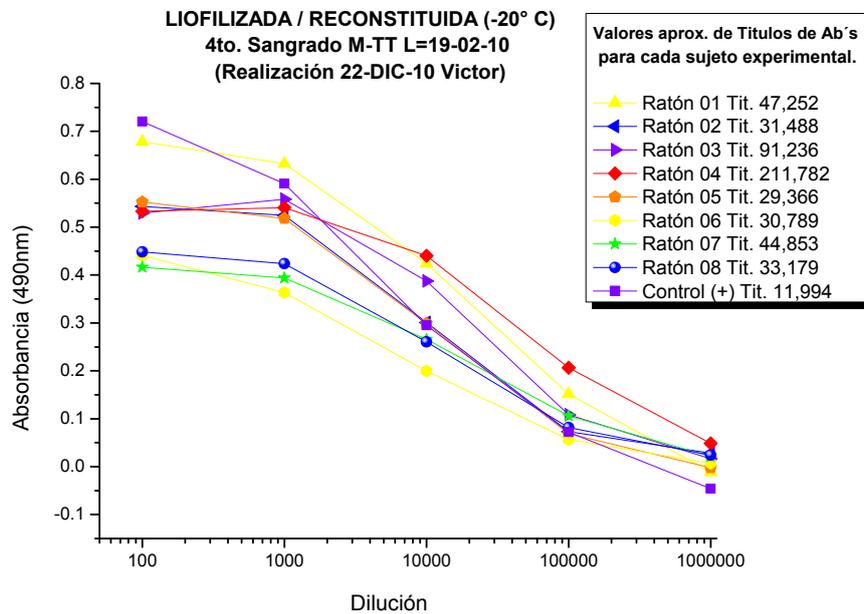


Figura 3.b. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 46, 000.



**Figura 3.c.** Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500.



**Figura 3.d.** Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500.

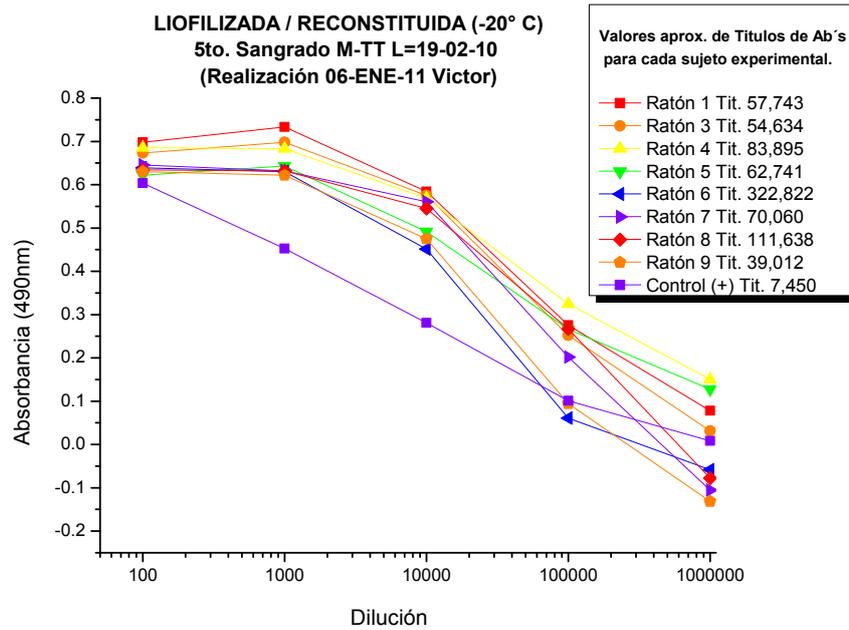


Figura 3.e. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el quinto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 7, 500.

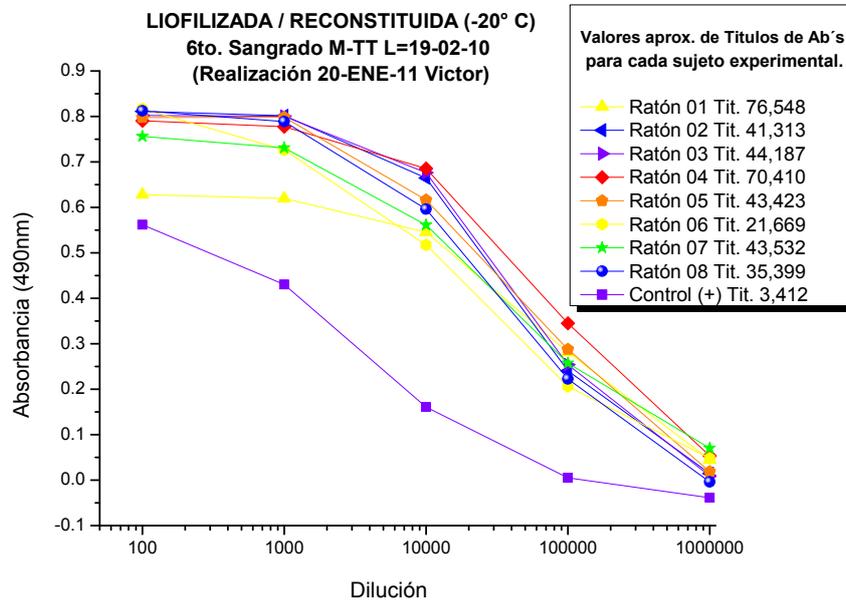


Figura 3.f. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 02 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se liofilizó, se resuspendió y se almacenó a -20°C.) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 7, 500.

### 6.3 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 03 de sujetos de estudio.

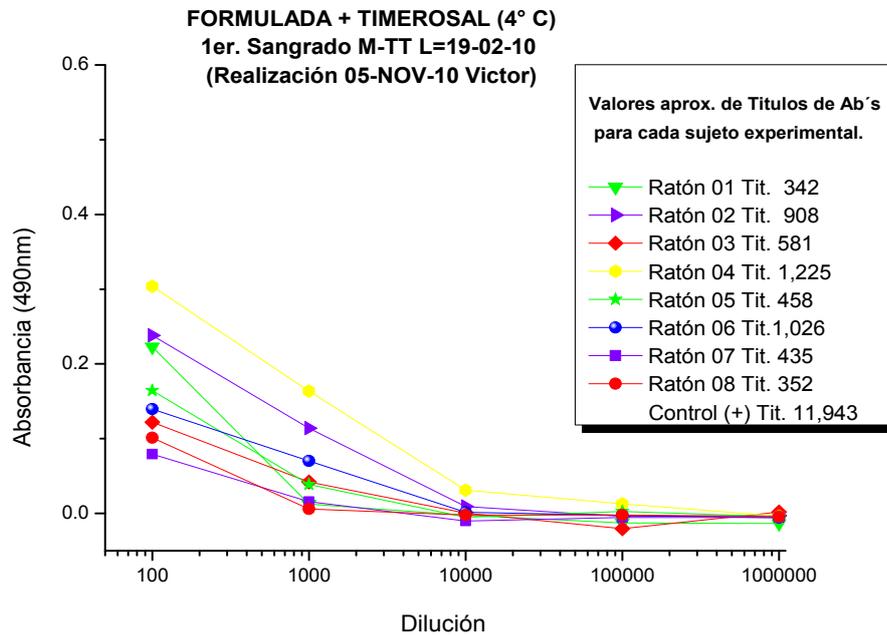


Figura 4.a. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

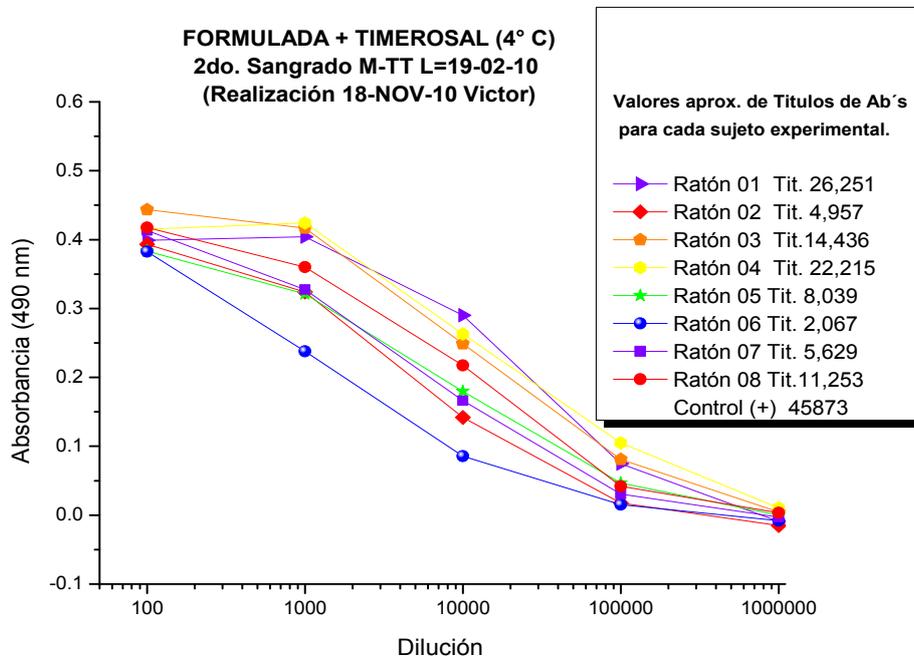


Figura 4.b. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 46, 000 (El gráfico no aparece en la figura).

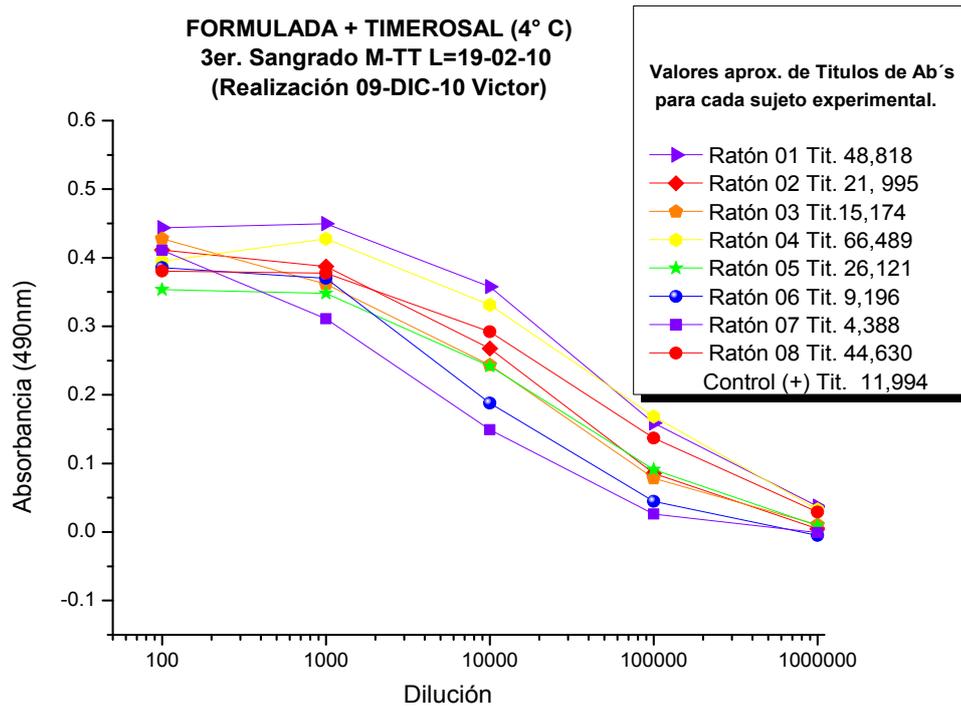


Figura 4.c. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

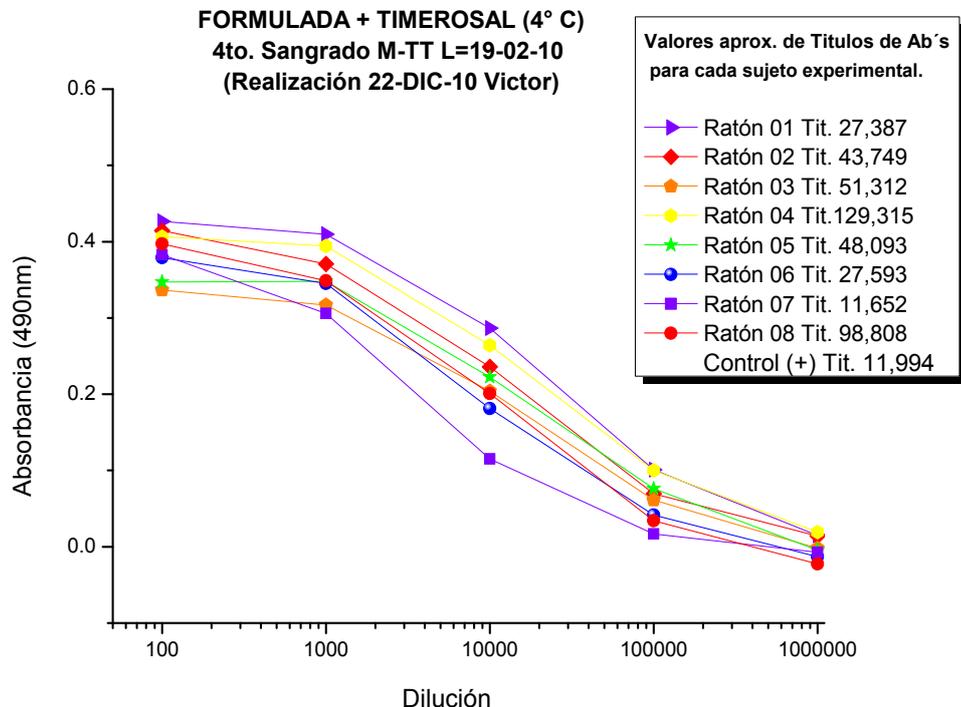


Figura 4.d. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

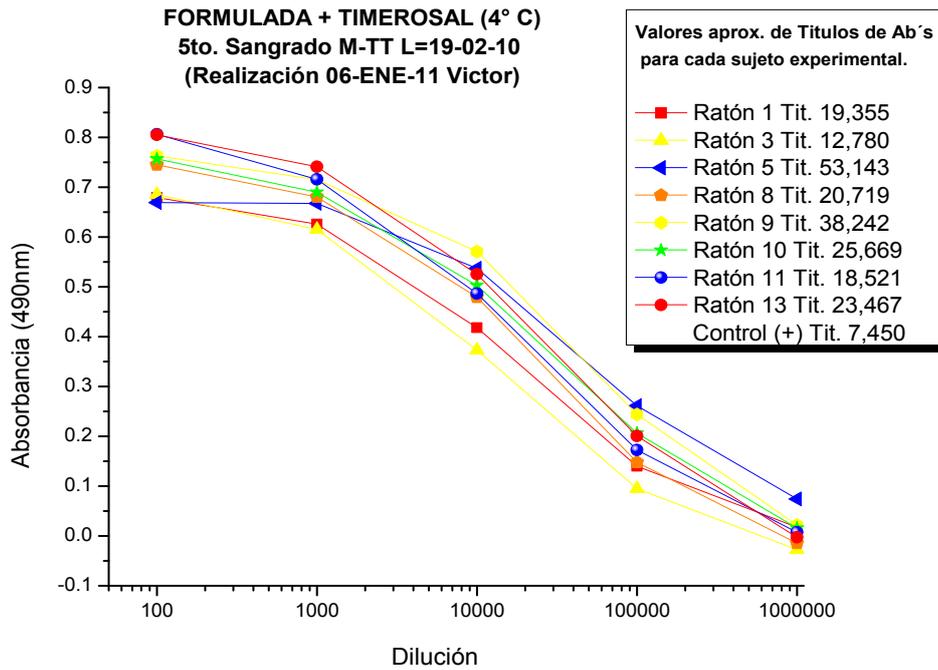


Figura 4.e. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el quinto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 7, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

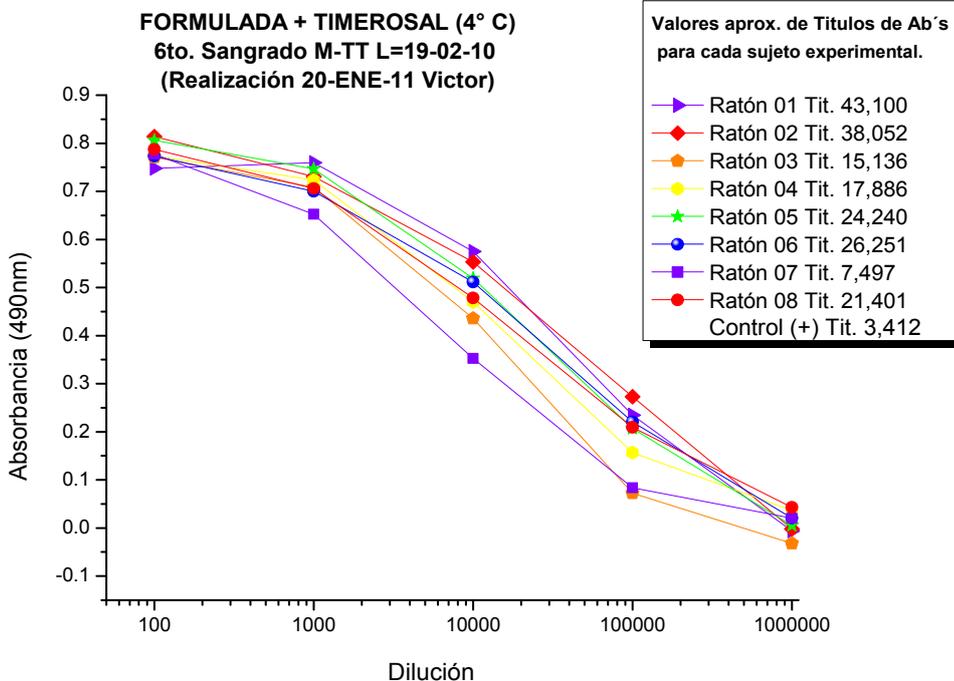


Figura 4.f. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 03 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se adicionó TIMEROSAL como agente preservativo al 0.05%, almacenándose en forma de suspensión a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 7, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

### 6.4 Gráficos de titulación de anticuerpos del primer al sexto sangrado para el grupo 04 de sujetos de estudio.

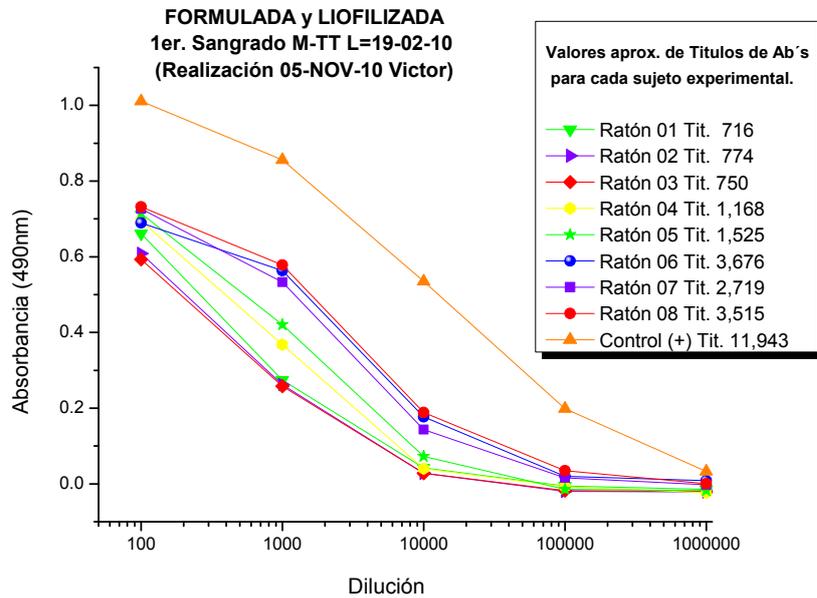


Figura 5.a. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el primer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500.

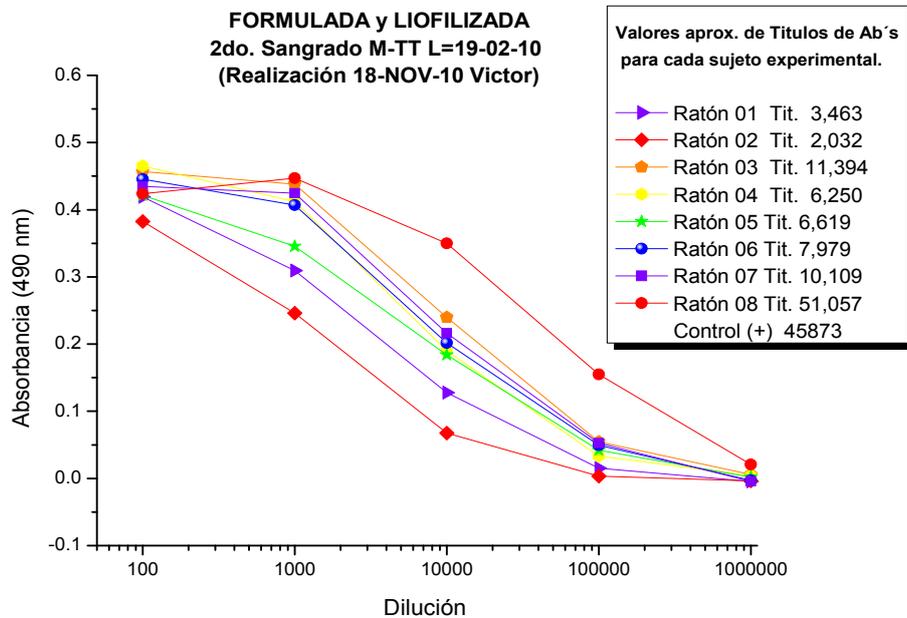


Figura 5.b. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el segundo sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 46, 000 (El gráfico no aparece en la figura).

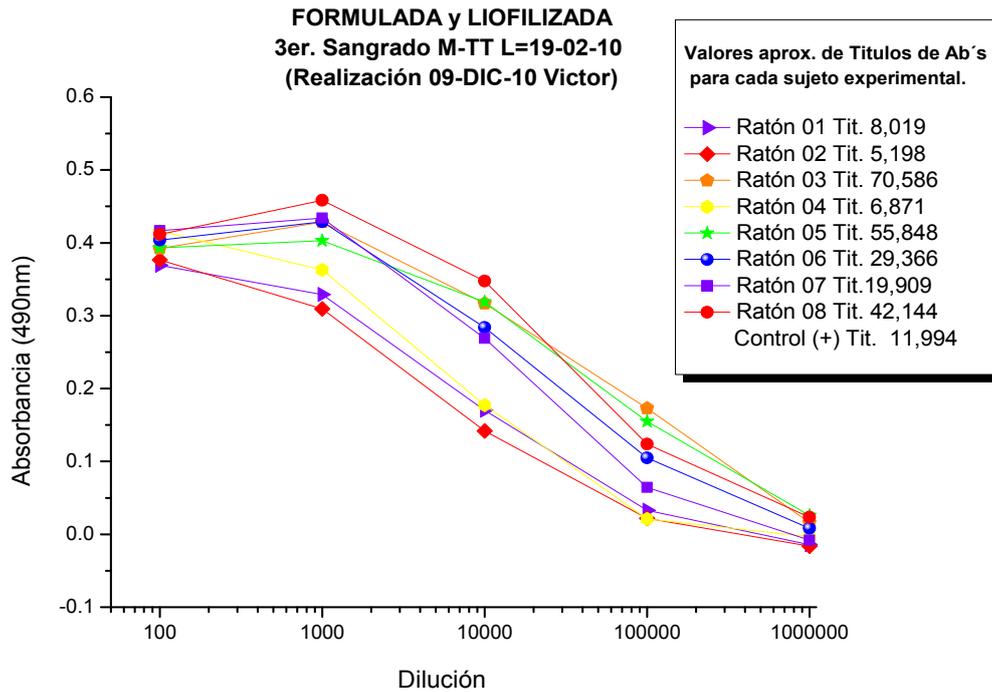


Figura 5.c. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el tercer sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

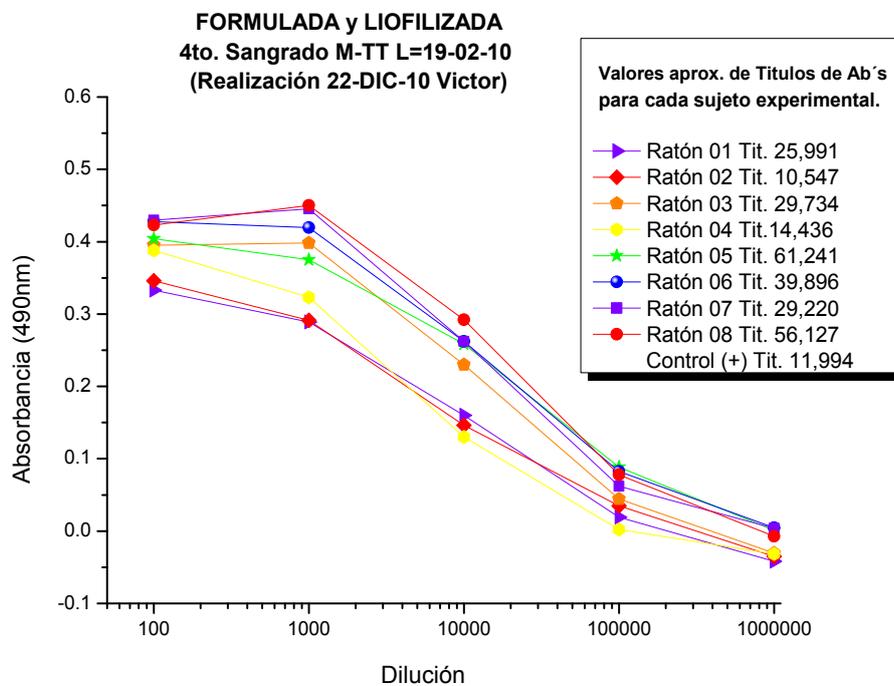


Figura 5.d. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el cuarto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 12, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

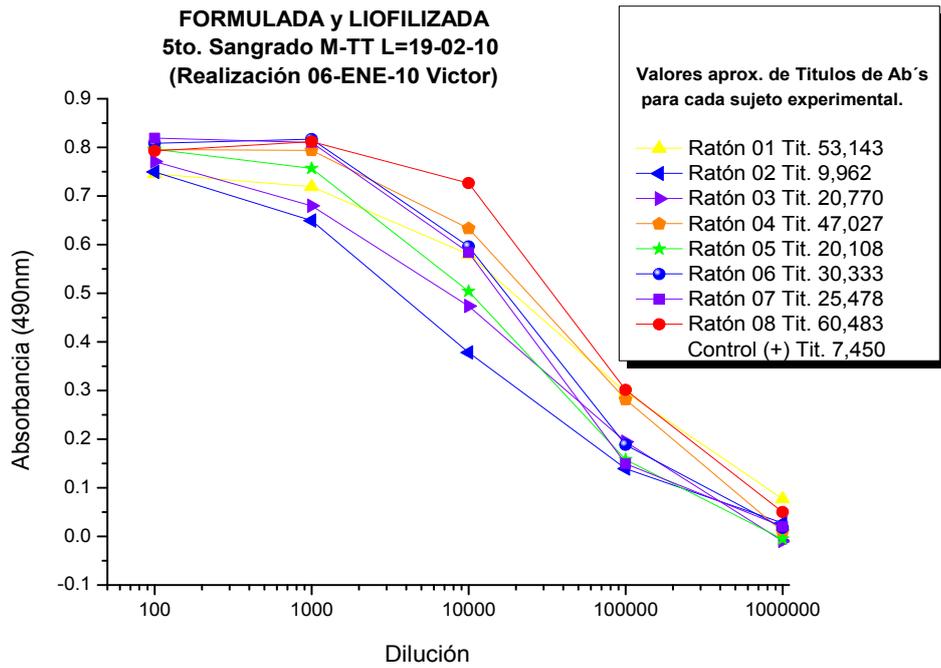


Figura 5.e. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el quinto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 7, 500 (El gráfico no aparece en la figura).

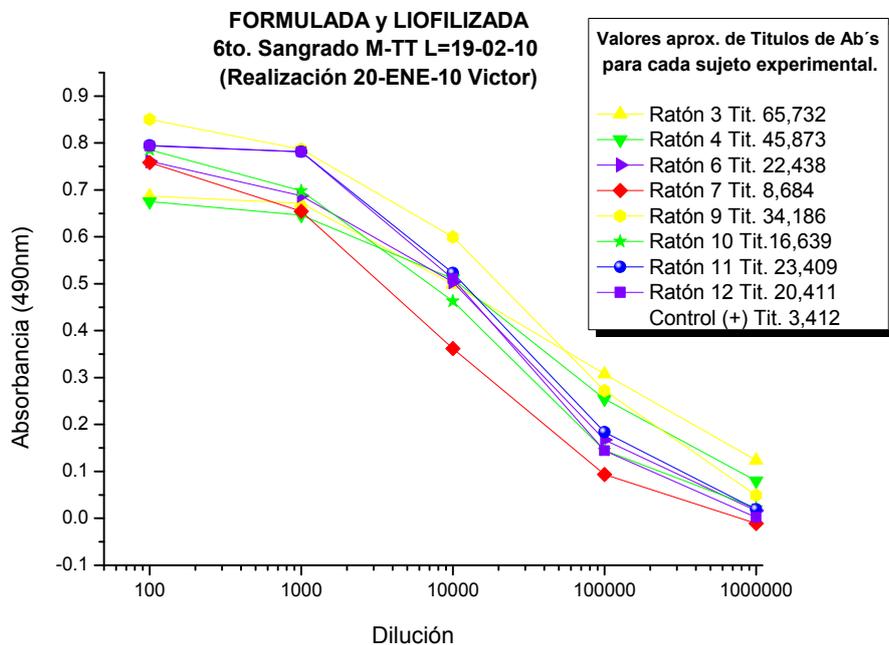


Figura 5.f. Valores aproximados del título de Abs obtenidos durante el sexto sangrado de los 8 sujetos del grupo experimental 04 (Fracción de la vacuna M-TT que se sintetizó, se formulo y se sometió a un proceso de liofilización para ser resuspendida con agua estéril al momento de ser administrada, almacenándose a 4°C) Valor reportado del título de Abs. para el Control (+) utilizado 1: 7, 500. (El gráfico no aparece en la figura).

6.5 Gráfico resumen en donde se expresa el promedio del título de anticuerpos obtenidos en cada sangrado, por cada grupo de experimentación.

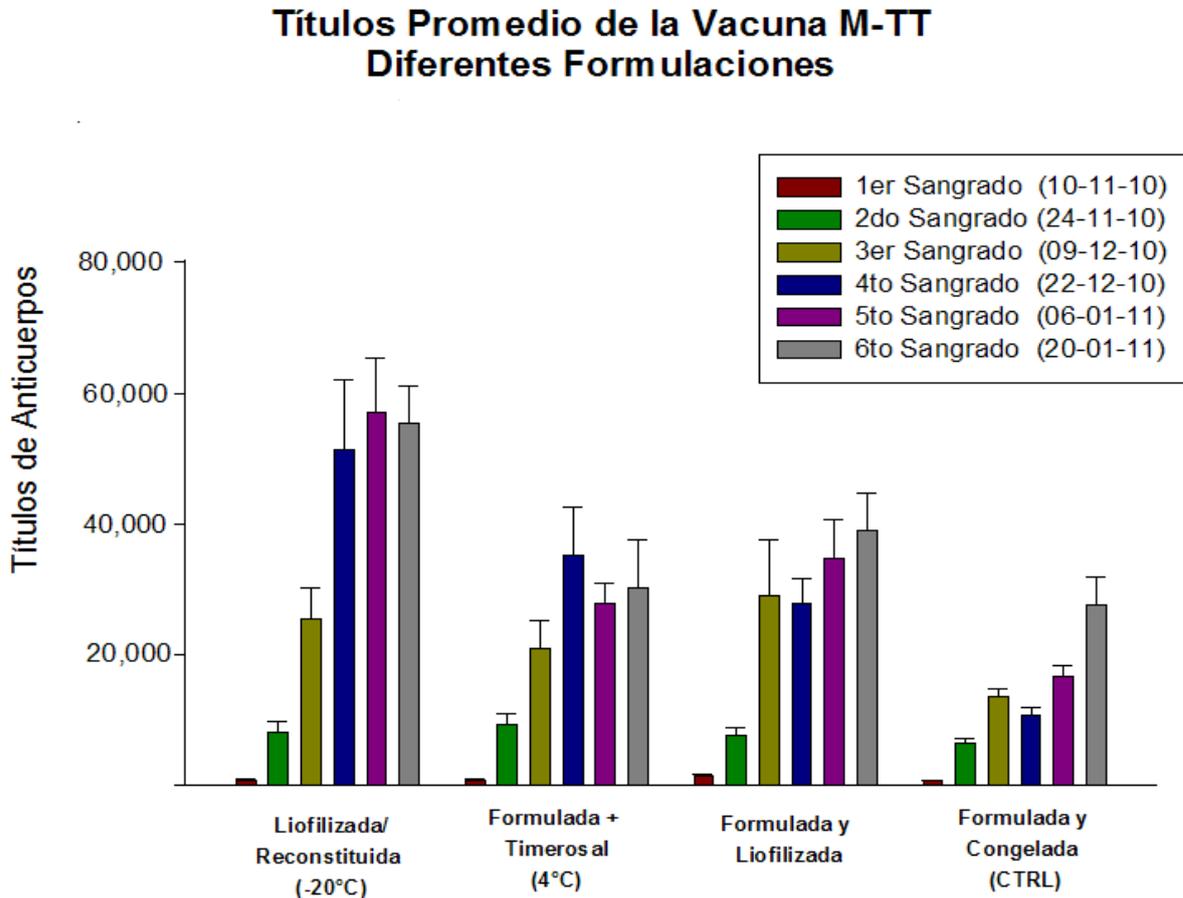


Figura 6. Gráfico de barras que indica los valores promedio de los títulos de Abs obtenidos en los seis sangrados del esquema de inmunización, para cada uno de los grupos experimentales en donde se estudiaron los diferentes formulados de la vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10)

### 6.6 Análisis estadístico de resultados por medio de programas computacionales.

Una vez terminado el esquema de inmunización para cada uno de los grupos experimentales donde se probó la potencia inmunogénica de los diversos formulados que se prepararon para la vacuna M-TT(Lote: L=19Feb10), y se determinó el valor aproximado del título de anticuerpos generado por cada sujeto de experimentación durante los seis sangrados correspondientes a cada una de las inmunizaciones realizadas, se procedió a analizar dicho conjunto de

datos, con la ayuda del programa computacional especializado en realizar pruebas estadísticas, Statistics v.3.1<sup>®</sup>.

Con el fin de facilitar el procedimiento y manejo de los datos que se ingresaron al programa computacional para realizar las pruebas estadísticas, se decidió tomar en cuenta los siguientes criterios en los cuales se basó todo el análisis estadístico de los resultados.

- I. Criterio para determinar el grado de estabilidad inmunogénica de cada uno de los formulados de la vacuna M-TT: **“Que en el valor promedio de los títulos de Abs correspondiente al de las últimas tres inmunizaciones, el coeficiente de variación no sea mayor del 10% (CV <10%).”**
  
- II. Criterio para determinar el valor máximo de título de Abs generado por cada formulación de vacuna M-TT: **“El valor máximo de título de Abs, será aquél valor promedio de título de Abs significativamente más alto, independientemente del número de inmunización al cual se logre”**
  
- III. Criterio para determinar la velocidad en la que se obtiene el valor de título de Abs más alto: **“Que el valor significativamente más alto sea obtenido en el menor número de inmunizaciones”.**

En base a los criterios anteriores, podemos resumir entonces que la mejor formulación para la vacuna M-TT, será aquella que genere los títulos más altos de Abs en el menor número de inmunizaciones y que en las tres últimas inmunizaciones el coeficiente de variación no sea mayor del 10%.

En cuanto al tipo de pruebas estadísticas que se realizaron, se procedió a realizar una ANOVA de 1 VÍA para poder hacer las comparaciones entre los títulos promedio del primero al sexto sangrado de cada uno de los grupos experimentales en cuestión. Para poder comparar entre cada uno de los distintos grupos experimentales de este proyecto, se procedió a realizar una

ANOVA de 2 VÍAS. Cabe señalar, que así mismo se realizó una prueba de Tukey (Tukey Test), con la que se determinaron los grados de libertad y las diferencias significativas de los resultados obtenidos para las ANOVAS tanto de una como de dos VÍAS.

A continuación se describirán los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas, para determinar la formulación de la vacuna M-TT que cumple con la mayoría de los criterios establecidos con anterioridad, es decir, cuál de todos los formulados estudiados para la vacuna M-TT es el mejor.

### **6.7 Resultados de las pruebas estadísticas, realizadas al conjunto de resultados obtenidos, para cada uno de los grupos experimentales.**

**Grupo 1. (Control A)** Fracción de vacuna M-TT que se encontraba alicuotada en solución y preservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Con los resultados obtenidos durante el análisis estadístico de los datos correspondientes a dicho grupo se determinó que, a partir del 3er sangrado los valores del promedio de título de Abs son significativamente diferentes del valor promedio del título de Abs obtenido durante la primera inmunización.  $F = (5,66) 22.57 p > .00001$

El análisis estadístico de la ANOVA de una vía, obtenido mediante la prueba de Tukey nos indica que, el valor del promedio de los títulos de Abs del sexto sangrado es significativamente diferente de los valores de títulos promedio del tercer (Tukey test  $p > .0001$ ), cuarto (Tukey test  $p > 0.0001$ ) y quinto sangrado (Tukley test  $p > 0.002$ ) correspondientemente.

**Grupo 2.** Fracción de la vacuna M-TT que se liofilizó, y posteriormente se resuspendió con agua estéril y se alícuotó en solución, conservándose en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los resultados de las pruebas estadísticas realizadas para dicho grupo experimental sugieren que, a partir del cuarto sangrado los valores promedio de los títulos de Abs son significativamente diferentes del valor promedio de

títulos de Abs inicial, correspondiente al obtenido durante la primera inmunización.  $F = (5,54) 13.00 p > .00001$

El análisis estadístico de la ANOVA de una vía, obtenido mediante la prueba de Tukey nos indica que, no hay diferencias significativas entre los valores del título promedio de Abs correspondiente al cuarto, quinto y sexto sangrado. (Tukey Test  $p=1$ )

**Grupo 3.** Formulación de la vacuna M-TT y se le adicionó un agente preservativo que en este caso fue timerosal, posteriormente se alicuotaron las dosis, cerrando los frascos al vacío y sellándolos con tapa de aluminio. Preservándolos en refrigeración a 4°C.

La ANOVA de una vía realizada a los datos de este grupo experimental, indicó que a partir del cuarto sangrado, los valores del promedio del título de Abs, son significativamente diferentes del valor inicial (promedio del título de Abs correspondiente al primer sangrado)  $F = (5,60) 6.96 p > .00003$ .

Así mismo, la prueba de Tukey realizada a dichos resultados de la ANOVA de una vía, indica que no hay diferencias entre los valores promedio de Abs del cuarto, quinto y sexto sangrado, correspondientemente. (Tukey Test  $p=1$ )

**Grupo 4.** Fracción de la vacuna M-TT, que fue liofilizada en alícuotas como vacuna individual para ser reconstituida posteriormente con agua estéril al momento de ser administrada, almacenada a 4°C.

La ANOVA de una vía realizada a los datos obtenidos para dicho grupo experimental, muestra que a partir del tercer sangrado, los valores de los promedios del título de Abs, son significativamente diferentes del valor inicial correspondiente al promedio del título de Abs del primer sangrado.  $F = (5,60) 6.07 p > .00001$ . La prueba de Tukey que analizó los valores de esta ANOVA de una vía muestra que no hay diferencias entre los valores de los promedios de títulos de Abs para el cuarto, quinto y sexto sangrado. (Tukey Test  $p=1$ ).

Con respecto a los resultados que se obtuvieron de la ANOVA de dos vías, se determinó finalmente que el valor máximo de títulos de Abs se presenta en la

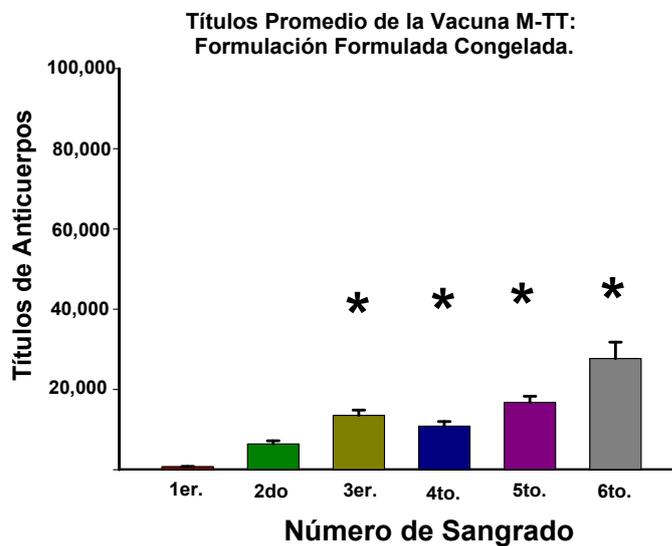
formulación correspondiente al grupo experimental 02, (Tukey Test  $p > 0.01$ ) que es significativamente diferente con respecto al valor máximo del grupo control (Grupo 01)  $F = (3,40) 3.28 p > .03$ . No obstante, dicho valor máximo no es significativamente diferente del valor máximo del promedio de los títulos de Abs obtenidos para los grupos experimentales 03 y 04. Adicionalmente la formulación correspondiente al grupo experimental 03, alcanza los valores máximos de títulos de Abs en menos tiempo (durante el cuarto sangrado). La formulación del grupo experimental 04 generó títulos promedio mayores que los generados por el grupo 03, pero no más altos que los generados por el grupo 02. Por último, el formulado del grupo control (Grupo 01) generó títulos significativamente menores, con respecto a los demás formulados de vacuna M-TT.

Del conjunto de resultados obtenidos durante el análisis estadístico de los resultados experimentales, se concluye que la mejor formulación de la vacuna M-TT, desde el punto de vista estadístico, es la que corresponde a la formulación del grupo experimental 03, que es la de la fracción de vacuna M-TT que se mantuvo en suspensión más adición de Timerosal como agente preservativo, seguida de la formulación correspondiente al grupo 02, que es la formulación de la fracción de la vacuna M-TT que se liofilizó una vez sintetizada, y se resuspendió con agua estéril, manteniéndose en alícuotas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ahora bien, de aquí en adelante se continuará con la discusión de dichos análisis de resultados, pero antes, se mostrarán los gráficos que resumen el análisis de las pruebas estadísticas a cada uno de los grupos experimentales, con el fin de facilitar la comprensión de dicho análisis y la discusión de los mismos.

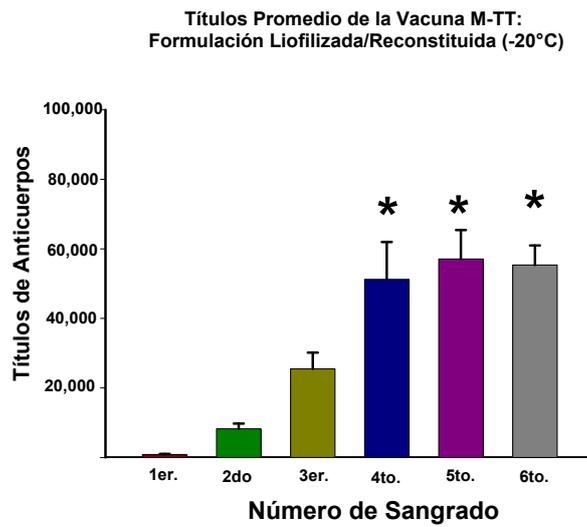
**6.8 Gráficos que resumen los resultados de las pruebas estadísticas realizadas a cada uno de los grupos experimentales que conforman este protocolo experimental.**

	Títulos promedio de Abs correspondiente a cada uno de los grupos experimentales.			
No. Sangrado	Grupo 01	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 04
1er	781.33	872.30	869.18	1569.27
2do	6434.00	8247.00	9336.27	7598.45
3er	13530.67	25475.90	21076.18	29123.55
4to	10856.83	51243.11	35140.27	27739.82
5to	16771.50	57093.56	27732.18	34661.18
6to	27714.33	55354.00	30272.36	39009.55

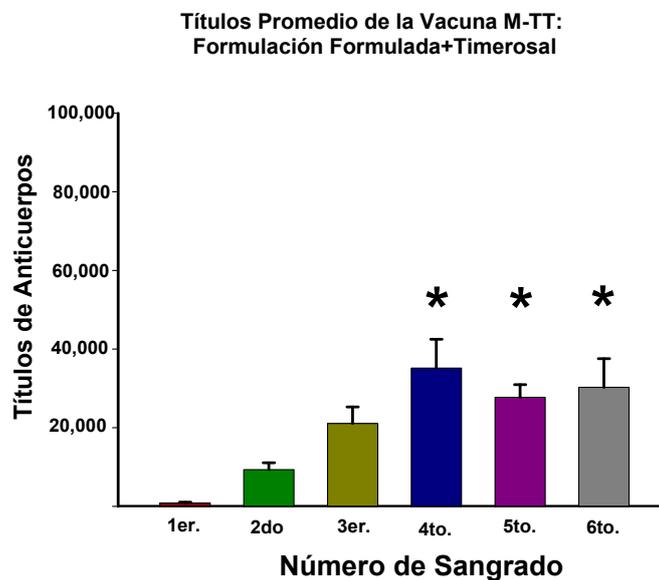
**Tabla 1. Promedio de títulos de Abs, obtenido para cada grupo experimental durante los seis sangrados correspondientes al esquema de inmunización que se siguió durante este proyecto experimental.** Los datos dentro de las casillas amarillas indican a partir de que sangrado los promedios de títulos de Abs, ya no son significativamente diferentes entre sí. Los datos dentro de las casillas rojas, indican el valor máximo del promedio de título de Ab's de cada uno de los grupos experimentales.



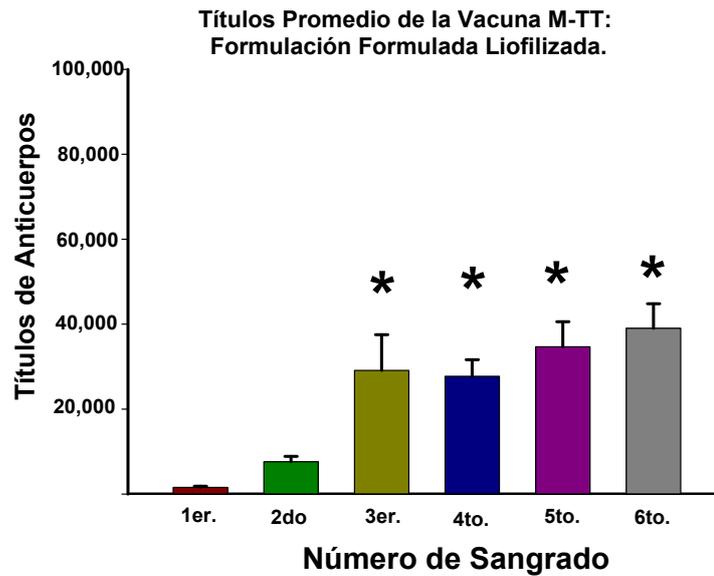
**Figura 7. Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del Grupo 01** Las barras con asterisco (\*) representan los valores promedio de título de Abs que no son significativamente diferentes entre sí, como se observa, en este grupo experimental, a partir del cuarto tercer ya no hay diferencias significativas entre ellos, por lo que se infiere que es a partir de este sangrado que la formulación obtiene estabilidad inmunogénica.



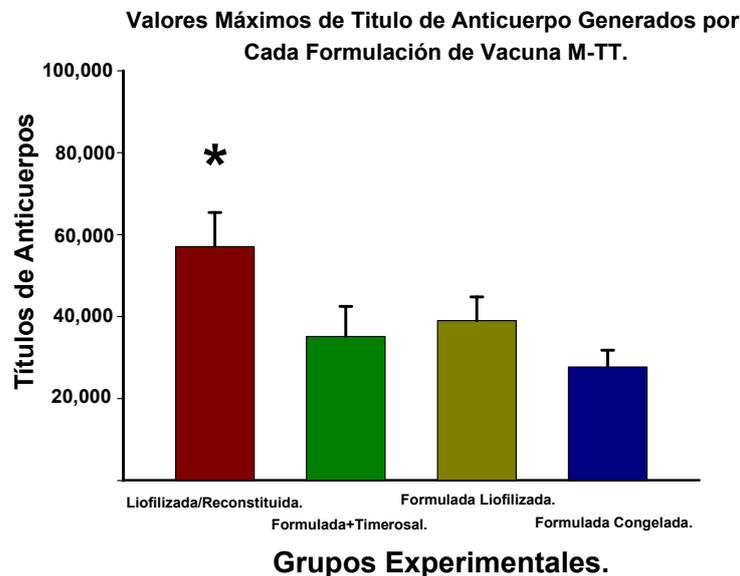
**Figura 8. Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del Grupo 02** Las barras con asterisco (\*) representan los valores promedio de título de Abs que no son significativamente diferentes entre sí, como se observa, en este grupo experimental, a partir del cuarto sangrado ya no hay diferencias significativas entre ellos, por lo que se infiere que es a partir de este sangrado que la formulación obtiene estabilidad inmunogénica.



**Figura 9. Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del Grupo 03** Las barras con asterisco (\*) representan los valores promedio de título de Abs que no son significativamente diferentes entre sí, como se observa, del mismo modo que para el grupo experimental anterior, a partir del cuarto sangrado ya no hay diferencias significativas entre ellos, infiriendo con esto que a partir de este sangrado la formulación obtiene estabilidad inmunogénica.



**Figura 10. Valores promedio de los títulos de Abs obtenidos desde el primer al sexto sangrado para los sujetos experimentales del grupo 04** Las barras con asterisco (\*) representan los valores promedio de título de Abs que no son significativamente diferentes entre sí, como se observa en este grupo experimental, a partir del tercer sangrado ya no hay diferencias significativas entre ellos, por lo que se infiere que es a partir de este sangrado que la formulación obtiene estabilidad inmunogénica.



**Figura 11. Gráficos de barras que expresa los valores máximos de título de Abs generados por cada formulado de la vacuna M-TT (Lote: L=19Feb10)** El valor promedio de título de Abs que posee un asterisco (\*) representa el valor promedio que es significativamente diferente de los demás, esto es, que la formulación correspondiente al Grupo 02, posee el valor promedio de títulos de Abs más alto de todas las formulaciones de vacuna M-TT estudiadas.

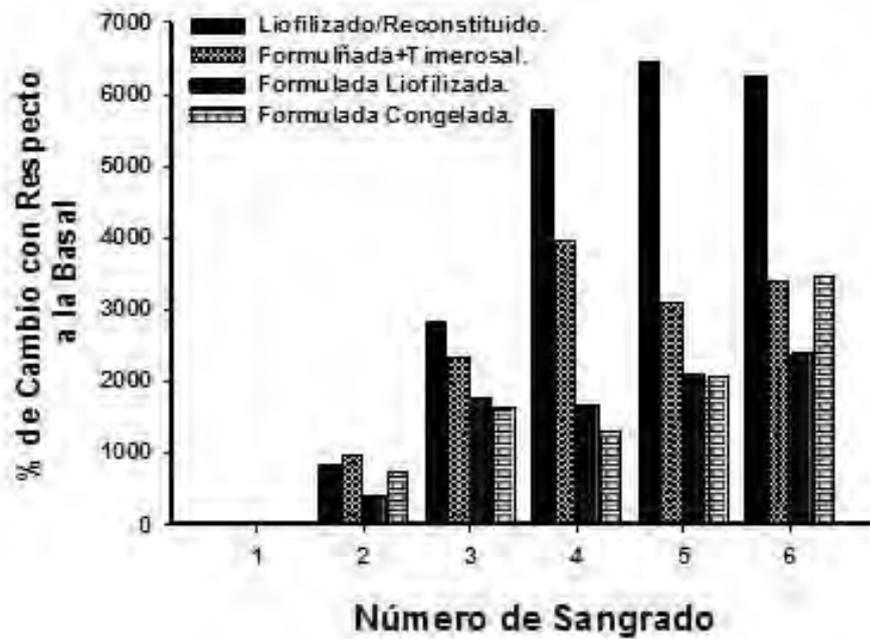


Figura 12. Porcentaje de cambio de promedios de títulos de Abs. para cada formulación, con respecto al promedio de títulos de Abs. obtenido durante el primer sangrado, mismo que se toma como referencia del estado basal para realizar dichas comparaciones. Por medio de este grafico se demuestra en porcentaje el aumento en el título de Abs. obtenido por cada formulado de la vacuna de M-TT durante los seis sangrados del esquema de inmunización, demostrando así que el formulado correspondiente al grupo experimental 02 (Liofilizado/Reconstituido) es el que posee un mayor aumento en el título de Abs. con respecto a las demás formulaciones.

➤ *Discusión de los resultados obtenidos.*

De las pruebas estadísticas realizadas al conjunto de resultados obtenidos, se dedujo que la formulación de la vacuna M-TT correspondiente al grupo experimental 03 fue la que demostró cumplir más eficientemente con los criterios de estabilidad inmunogénica y velocidad para alcanzar el máximo título de Abs. Ciertamente, el valor máximo del promedio de títulos de Abs para esta formulación fue menor en comparación con los valores obtenidos para los grupos 02 y 04 correspondientemente.

Autores como HogenEsch y Gupta han estudiado las características fisicoquímicas que poseen los adyuvantes derivados del hidróxido de aluminio y han reportado que cuando este adyuvante es almacenado a temperatura ambiente, propiedades como el pH, la capacidad de adsorción de la proteína BSA y la amplitud de la altura media de la banda de difracción de los rayos X, disminuyen considerablemente después de un lapso de tiempo mínimo de 15

meses, lo cual se relaciona directamente con el grado de estabilidad de este adyuvante.<sup>12</sup>

En base a lo anterior, se infiere que cuando la formulación de la vacuna M-TT correspondiente al grupo 03, se administró a los sujetos de experimentación, poseía cierto grado de estabilidad fisicoquímica, lo cual se vio reflejado en su grado de estabilidad inmunogénica y la rapidez para alcanzar el valor máximo de títulos de Abs. Por otro lado, debido a que en ninguna formulación se agregaron excipientes que actuaran como agentes estabilizantes del adyuvante o de la misma vacuna de M-TT, como por ejemplo sorbitol, trealosa, sacarosa, dextran o manitol <sup>14</sup>, es probable que las partículas del gel de hidróxido de aluminio o la estructura molecular de la vacuna de M-TT, a pesar de haberse resguardado a 4°C, al cabo de determinado tiempo de almacenaje presentaran cierto grado de degradación química, lo que se reflejó finalmente en una disminución del título máximo de Abs en comparación con las otras formulaciones de los grupos 02 y 04.

Otro resultado a destacar dentro de esta discusión, es el que indica que los valores máximos del promedio de títulos de Abs, para las tres formulaciones utilizadas en el presente estudio fue considerablemente mayor que el reportado para el grupo de estudio 01 o control. Teniendo en cuenta que la principal diferencia entre este grupo control y las tres formulaciones estudiadas, es el tiempo de interacción antígeno-adyuvante a los que se sometió cada formulación, se dice que la formulación correspondiente al grupo 01 estuvo en interacción con el adyuvante por un tiempo aproximado de 5 minutos antes de ser administrado en los sujetos experimentales, en comparación con las demás formulaciones, las cuales estuvieron toda la noche en agitación antes de ser alicuotadas y almacenadas para su posterior administración (en el caso de los formulados para los grupos 03 y 04), permitiendo así una óptima interacción antígeno-adyuvante; con respecto a la formulación correspondiente al grupo 02 en donde se descongeló la fracción de la vacuna M-TT, para ser debidamente formulada, también se dejó en agitación una noche antes de ser administrada, con el fin de permitir de igual manera que en los otros formulados, la interacción óptima del adyuvante con la molécula de la vacuna M-TT.

R.K Gupta y otros autores<sup>15</sup>, han indicado que uno de los principales mecanismos por los cuales los adyuvantes derivados del hidróxido de aluminio ejercen su fuerza como agentes inmunogénicos y así ayudar a estimular de forma favorable la respuesta inmune, es precisamente la adsorción del antígeno a las moléculas preformadas de gel de hidróxido de aluminio. Estos autores han reportado anteriormente que, la adsorción del antígeno a las moléculas del hidróxido de aluminio dependen mayormente de las fuerzas electrostáticas entre el adyuvante y el antígeno, otras interacciones como las fuerzas de van der Waals y puentes de hidrogeno también contribuyen a la adsorción del antígeno a las moléculas del adyuvante. El pH de la solución, la temperatura, el tamaño de la partícula del gel y la fuerza iónica de la mezcla de reacción, son otros factores físicos que afectan la adsorción de los antígenos. No obstante, también se ha demostrado que la adsorción de los toxoides tetánico y diftérico a los geles de hidróxido de aluminio, no se ve afectada a las condiciones de pH y exceso de iones fosfato.

La temperatura de adsorción se ha considerado importante para completar el proceso de adsorción del antígeno a las moléculas del adyuvante, demostrándose que la mayoría de la adsorción del toxoide tetánico (del 80-90%) ocurre en pocos minutos dentro de un rango de 4-45°C.

También se ha demostrado que el hidróxido de aluminio es capaz de adsorber cantidades considerables de toxoide tetánico (aproximadamente 820µg / mg de gel) a pH 6, por lo tanto el hidróxido de aluminio tiene una alta capacidad para adsorber antígenos como el toxoide tetánico y diftérico en particular, principalmente por el hecho de que a pH 6 o neutro el hidróxido de aluminio tiene carga positiva, mientras que los toxoides tetánico y diftérico están cargados negativamente bajo estas condiciones de pH. También la naturaleza amorfa de las partículas de los geles de hidróxido de aluminio, contribuye a que posean un valor elevado de área superficial y por ende una mayor capacidad de adsorción, principalmente por proteínas que se encuentren cargadas negativamente a condiciones de pH fisiológicas.<sup>15</sup>

Debido a lo anterior, se estima que el tiempo en que se deja interactuar el antígeno (que en nuestro caso fue la vacuna de M-TT) con los adyuvantes

derivados del gel de hidróxido de aluminio, es vital y de suma importancia para favorecer el proceso de adsorción, y por lo tanto es muy probable que el incremento en los niveles de título de anticuerpo generados por las formulaciones de la vacuna M-TT, fueron considerablemente más elevados que los que se generaron a partir del grupo 01 o control, que fue el grupo en donde hubo menor tiempo de interacción de la vacuna M-TT con el adyuvante.

Por otro lado, el proceso de liofilización puede hacer que las interacciones entre las moléculas del antígeno y el adyuvante se incrementen al haber un mayor contacto entre estos, no obstante Lena Wolff y sus colaboradores se enfocaron en desarrollar una investigación donde se demostrara lo que ocurre con muestras liofilizadas de adyuvantes derivados de hidróxido de aluminio, y determinaron que el proceso de liofilización para vacunas que son adsorbidas en geles de aluminio, puede resultar perjudicial en términos de disminución de potencia inmunogénica del adyuvante, ocasionando con ello la agregación, precipitación y formación de aglomerados, floculos u otras partículas de agregación que incrementan el grado de agregación y por ende el tamaño de las partículas del gel de hidróxido de aluminio. Debido a esto, dichos autores proponen la adición de ciertos excipientes capaces de estabilizar a las moléculas de hidróxido de aluminio durante el proceso de liofilización y con ello evitar la formulación de aglomerados y sedimentación de estas partículas, siendo la trealosa a una concentración del 15 al 20% p/V, dextran, sacarosa y sorbitol los mejores candidatos para la protección de las moléculas del gel de hidróxido de aluminio mientras es expuesto al proceso de liofilización.<sup>14</sup> Desde el punto de vista inmunológico, se sabe que el diámetro promedio de los macrófagos es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ <sup>12</sup> y que el diámetro promedio de las partículas de hidróxido de aluminio sin ser liofilizadas es de aproximadamente 3.7-8  $\mu\text{m}$ <sup>14</sup>, y una vez liofilizado las partículas del gel de hidróxido de aluminio pueden incrementar su tamaño notablemente (de 11-125  $\mu\text{m}$ ) lo que podría ocasionar dificultades para la presentación y activación de las células especializadas en presentar antígenos (APCs), debido a la incapacidad de fagocitar moléculas de diámetros mayores a las que poseen ellas mismas.<sup>12</sup>

Debido a lo anterior, no es de extrañar que nuestra formulación del grupo experimental 04 que fue expuesta a un proceso de liofilización sin adición de

ningún excipiente que estabilizara a las moléculas del adyuvante durante este proceso, obtuviera el valor máximo de títulos de Abs tardíamente (hasta el sexto sangrado), en comparación con la formulación del grupo 03 que lo alcanza al cuarto sangrado, no obstante el valor del título máximo de Abs, fue mayor para este formulado que fue expuesto a un proceso de liofilización que para el formulado del grupo experimental 03 o el grupo control, lo que indica que pese a las condiciones de liofilización y la carencia de excipientes estabilizantes, el formulado correspondiente al grupo experimental 04 resultó también ser capaz de levantar una respuesta inmunológica lo suficientemente robusta como para hacer detectables niveles considerables de título de Abs.

Finalmente, con los métodos ensayados se pudo determinar la potencia inmunogénica de cada uno de los formulados que se estudiaron para la vacuna de M-TT, demostrándose con ello que dichos formulados son capaces de levantar por si mismos respuestas inmunogénicas lo suficientemente robustas como para ser monitoreadas por inmunoensayos de rutina como lo es el ELISA, así mismo quedaron determinados los factores que intervinieron en el comportamiento inmunogénico de cada uno de nuestros formulados y con ello se estableció un formulado óptimo, que estadísticamente cumplió eficientemente con cada uno de los criterios de estabilidad inmunogénica y velocidad de producción de títulos máximos de anticuerpos.

## **VII. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS A FUTURO.**

Anteriormente se demostró que la vacuna M-TT es capaz de levantar una respuesta inmunológica lo suficientemente robusta, como para hacer cuantificable el título de Abs anti-morfina generados por dicha vacuna en grupos experimentales de ratones BALB-C hembras de 6 semanas de edad.

Durante el desarrollo de este proyecto experimental, se cuantificó y monitoreó la respuesta inmunológica que generan tres distintos formulados para la vacuna de M-TT con el fin de determinar cuál de estos formulados es el óptimo para poder iniciar con la producción piloto de una presentación farmacéutica que convierta a la vacuna M-TT en una vacuna útil y de uso sencillo durante las pruebas de fase preclínicas a las cuales será sometida posteriormente.

Se determinó que de los tres formulados puestos a estudio durante este proyecto, el formulado correspondiente a la presentación de la vacuna M-TT en forma de suspensión más adición de timerosal como agente preservativo, fue el que cumplió más eficientemente con los criterios establecidos para determinar el mejor formulado para dicha vacuna. No obstante, los tres formulados puestos a estudio demostraron ser más inmunogénicos que el mismo formulado control, esto debido probablemente a que cada uno de los formulados fue expuesto durante una cantidad considerable de tiempo a las moléculas del adyuvante, lo que favoreció óptimamente el proceso de adsorción antígeno-adyuvante. Con lo que también queda demostrado que para que un adyuvante actúe eficazmente es necesario favorecer el proceso de adsorción con su debido antígeno.

En relación al uso de timerosal como agente preservativo, se concluye que la dosis a la cual fue usado y que se propuso conforme a lo permitido para formulaciones farmacéuticas de vacunas en donde se usa comúnmente dicha sustancia, fue una dosis que hasta el momento no ha provocado ninguna alteración o daño aparente en los sujetos en donde fue estudiada dicha formulación, por lo que podemos concluir que la cantidad utilizada durante este proyecto experimental fue inocua y cumplió con el objetivo de preservar y mantener a la formulación de vacuna M-TT en condiciones favorables de uso.

No obstante, se propone estudiar de manera formal y detallada las implicaciones de tipo toxicológico que implica usar un derivado mercúrico como lo es el timerosal en este tipo de formulaciones, con el fin de descartar cualquier intervención o reacción adversa a la vacuna por el posible uso de este agente preservativo.

Debido a las facilidades y ventajas que presenta el proceso de liofilización para el transporte, envasado y uso de una vacuna como la que se estudió, el formulado correspondiente al grupo 04 se tenía como uno de los favoritos a elegirse como formulación óptima, sin embargo se determinó que este formulado presento ciertas desventajas en comparación con los formulados 02 y 03 correspondientemente, y por ende no se eligió como la formulación óptima durante este ensayo. Por lo cual, se propone realizar estudios posteriores donde se estudien las potencias inmunogénicas de nuevos formulados que contengan excipientes que estabilicen a la molécula del adyuvante mientras esta es sometida al proceso de liofilización, y con ello se optimicen las condiciones dadas para tal fin.

Se propone también realizar estudios posteriores donde se demuestre la estabilidad de la vacuna de M-TT cuando es almacenada por largos periodos de tiempo en forma de suspensión a 4°C, donde se estudie con distintos agentes estabilizantes que puedan favorecer una mejor respuesta inmunológica que la que se presentó en este trabajo experimental. Por lo que queda abierta la posibilidad de continuar sobre esta línea de investigación, con el fin de determinar las condiciones y excipientes necesarios que conviertan a la vacuna M-TT en un formulado óptimo para su posterior uso y estudio en pruebas de nivel preclínicas y clínicas, favoreciendo ante todo el levantamiento de respuestas inmunológicas robustas en los organismos donde se administre, de forma segura y confiable.

Finalmente, una vez más queda demostrado que la vacuna M-TT es una vacuna confiable en el sentido que puede generar respuestas inmunológicas en los organismos en donde se ha administrado hasta el momento y del mismo modo, es una sustancia que puede tener alto impacto en la salud publica una vez que se haya aprobado para ser estudiada en pacientes adictos bajo tratamientos de desintoxicación.

## **VIII. REFERENCIAS.**

1. T.J. Kind, R.A. Goldsby, B.A. Osbourne.2007. *Inmunología de Kuby*. 6ta. Edición. Mc. Graw Hill, México.
2. M.C., Salinas. 2007. *Inmunología Médica*. Mc Graw Hill, México.
3. Rev. Betzana Zambrano.2004. Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal, y su uso en vacunas pediátricas. *Rev Med Uruguay*; 20: 4-11.
4. Anton, B. & P. Leff. 2006. A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents. *Vaccine* 24: 3232–3240.
5. J.P. Boog, Claire. 2009. Principles of vaccination and possible development strategies for rational design. *Immunology Letters* 122: 104-107.
6. Bonese KF, Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM, Schuster CR.1974. Changes in heroin self administration by a rhesus monkey after morphine immunisation. *Nature*.252:708-10.
7. K. Landsteiner, Heterogenetic Antigen, Verslay Akad. Wetenschappen Amsterdam 29: 1118-21 (1921), Proc. Acad. Sci. Amsterdam 20: 1166 – 9 (1921) según *Chem. Abstr.* 16: 2907, 1922.
8. E. Bartos,1988, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, *Barcelona*, págs. 279-296.
9. M. Guerra, H. Morris, 2003. La conjugación de haptenos a proteínas. Parte I. *Revista cubana de Química*. Vol. 15, No.2: 30-39.
10. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. Immunological notes. XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 1926;29:31–40.
11. Harm HogenEsch, 2002. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminium adjuvants. *Vaccine* 20: 34-39.
12. Stanley L. Hem, Harm HogenEsch, 2007. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Review of Vaccines*, 6:5, 685-698.

13. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. 1985 Modulation of the human immune response by non-toxic and -pyrogenic adjuvant aluminum hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol.* 61:143–51.
14. Wolff L., Flemminf J., Schimtz R., Gröger K., Goymann M., 2008. Protection of aluminum hydroxide during lyophilisation as an adjuvant for freeze-dried vaccines. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 330: 116-126.
15. Gupta R.K, 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 32: 155-172.
16. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* ;2:947–50.
17. Anton B., Salazar A., Flores A., Matus M., Marin R., Hernandez J. & Leff P. 2009. Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors. *Human Vaccines* 5:4, 214-229
18. Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, et al. 1999. Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann N Y Acad Sci.* 897:136-44.
19. Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. 1992. Cloning of a delta opioide receptor by functional expression. *Science.* 258:1952-1955.
20. Gutstein, BH Akil H. Opioid Analgesics, In: Hardman JG, Limbird LE, eds. 2001. The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York NY. *McGraw Hill* . 569-619.

21. Inturrisi CE, Max MB, Foley KM, Schultz M, Shin SU, Houde RW. 1984. The pharmacokinetics of heroin in patients with chronic pain. *N Engl J Med.* 310:1213-7.
22. Sevarino KA, Oliveto A, Kosten TR. 2000. Neurobiological adaptations to psychostimulants and opiates as a basis of treatment development. *Ann N Y Acad Sci.* 909:51-87.
23. Nestler EJ. 2002. From neurobiology to treatment: progress against addiction. *Nat Neurosci.* 5:1076-9.
24. EMCDDA. Annual Report 2006: The State of the Drugs Problem in Europe. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2006.
25. Abbas AK, Lichtman A, Pillai S. B cell activation and antibody production. In: Abbas Ak, Lichtman A and Pillai S, eds. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. Philadelphia PA, USA: Saunders Elsevier 2007; 215-41.
26. Van Regenmortel MHV. 2001. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals.* 29 (3-4): 209-213.
27. Dennehy PH. 2001. Active immunization in the United States: developments over the past decade. *Clin. Microbiol Rev.* 14 (4):872-908.
28. Inturrisi CE, Schultz M, Shin S, Umans JG, Angel L, Simon EJ. 1983. Evidence from opiate binding studies that heroin acts through its metabolites. *Life Sci.* 33:773-6.
29. S. Hockfield, et al., Molecular Probes of the Nervous System vol. 1, 1993. USA.
30. <http://www.docstoc.com/docs/55398916/Fundamentos-y-Tipos-de-ELISAs>
31. Hardman JG, Limbird LE, eds. 2001. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* McGraw Hill, 621-42. New York NY.