



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**LA VACUNA M-TT GENERA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA EN
RATONES INMUNODEPRIMIDOS POR CONSUMO CRÓNICO DE
MORFINA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARTÍNEZ JUÁREZ ADRIANA CONCEPCIÓN



MÉXICO, D.F.

15 DE MARZO DEL 2013



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:	Naranjo Rodríguez Elia Brosla
VOCAL:	Profesor:	Moreno Eutimio Mario Adán
SECRETARIO:	Profesor:	Martiñón Gutiérrez Silvia Susana
1er. SUPLENTE:	Profesor:	Martínez Álvarez Julio César
2° SUPLENTE:	Profesor:	Pérez Rojas Jazmín Marlén

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ**

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROBIOLOGÍA DE ADICCIONES

ASESOR DEL TEMA: Dra. Martiñón Gutiérrez Silvia Susana

CO- ASESOR: Dr. Antón Palma Benito

SUSTENTANTE: Martínez Juárez Adriana Concepción

AGRADECIMIENTOS

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

Secretaria de Salud

NIDA

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
- FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DE OPIOIDES	4
- INMUNODEPRESIÓN POR OPIOIDES	8
- VACUNAS	13
- VACUNA M-TT	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	20
PREGUNTA	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	24
- EL EFECTO DE LA MORFINA SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO (NÚMERO DE CÉLULAS DE POBLACIONES T Y B)	24
- REACCIÓN HUMORAL DE RATONES PRE- EXPUESTOS A MORFINA	27
- RESPUESTA CELULAR A LA VACUNA M-TT DE RATONES PRE- EXPUESTOS A MORFINA	29

DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO 1	VII
ANEXO 2	VIII
ANEXO 3	IX
ANEXO 4	XII

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ÍNDICE DE POBLACIÓN DE CÉLULAS T Y B DE BAZO DE RATONES SOMETIDOS A UN TRATAMIENTO CRÓNICO DE MORFINA CON DOSIS INMUNODEPRESIVAS.	26
FIGURA 2. RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE RATONES INMUNIZADOS CON LA VACUNA M-TT	29
FIGURA 3. ÍNDICE DE POBLACIÓN DE CÉLULAS T INMADURAS (CD3+ CD4+ CD8+) PROVENIENTES DE BAZO DE RATONES SOMETIDOS A UN ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN MÚLTIPLE CON LA VACUNA M-TT	31
FIGURA 4. ÍNDICE DE POBLACIÓN DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS (CD3+ CD8+) PROVENIENTES DE BAZO DE RATONES SOMETIDOS A UN ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN MÚLTIPLE CON LA VACUNA M-TT.	34
FIGURA 5. ÍNDICE DE POBLACIÓN DE CÉLULAS T COOPERADORAS (CD3+ CD4+) PROVENIENTES DE BAZO DE RATONES SOMETIDOS A UN ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN MÚLTIPLE CON LA VACUNA M-TT.	36
FIGURA 6. ÍNDICE DE POBLACIÓN DE CÉLULAS B ACTIVADAS (CD19+I/A-I/E+) PROVENIENTES DE BAZO DE RATONES SOMETIDOS A UN ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN MÚLTIPLE CON LA VACUNA M-TT.	38
FIGURA 7. ÍNDICE DE POBLACIÓN DE CÉLULAS B DE MEMORIA (CD19+ CD27+) PROVENIENTES DE BAZO DE RATONES SOMETIDOS A UN ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN MÚLTIPLE CON LA VACUNA M-TT.	40 VI

RESUMEN

El abuso del consumo de sustancias adictivas con acción psicotrópica es un problema serio de salud pública tanto a nivel mundial como nacional, en este contexto, existe la necesidad de desarrollar programas gubernamentales de salud más eficaces para combatir la adicción a sustancias de abuso. Uno de los factores farmacocinéticos importantes que comparten las drogas con alta potencia farmacológica es su eficiente cinética de permeación hematoencefálica, el cual parece ser esencial para ejercer sus acciones de generación de recompensa placentera, por lo tanto, de desarrollar efectos reforzantes importantes al consumo reiterado de estas sustancias, el antagonismo de permeación hematoencefálica por anticuerpos específicos contra drogas adictivas ha demostrado efectos inmunoprotectores para mantener la abstinencia del consumo adictivo de drogas como la cocaína y la nicotina en el modelo animal del roedor. El desarrollo de vacunas anti sustancias adictivas para uso humano, capaz de inducir la síntesis de anticuerpos policlonales contra morfina a través de esquemas de vacunación múltiple, se lleva a cabo en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones, en el que han desarrollado la vacuna M-TT para tal uso, de acuerdo con estudios anteriores, ratones naïve para el opioide morfina tratados con la vacuna M-TT presentan una respuesta inmunológica humoral caracterizada por la presencia de altos y

sostenidos títulos de anticuerpos policlonales circulantes, con especificidad a la morfina y además presenta capacidad de reconocimiento inmunológico cruzado para la heroína y otros análogos estructurales, evitando así, la permeación hematoencefálica al tejido nervioso cerebral, esta vacuna presenta inmunogenicidad con respuesta inmunitaria de memoria de largo plazo. En este protocolo se investigó si en ratones inmunodeprimidos por el consumo crónico de este opioide, la respuesta inmunitaria presentada ante la inmunización con la vacuna M-TT era eficaz, evaluando el índice poblacional de células T y B esplénicas por medio de citometría de flujo, también se evaluó la respuesta inmunitaria a lo largo del protocolo determinando el título de Anticuerpos (Ab's) anti-morfina mediante ensayos de ELISA, en suero sanguíneo de ratones inmunizados en un esquema de vacunación semanal de 6 aplicaciones de la vacuna M-TT tanto pre-expuestos como no pre-expuestos a morfina.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de salud pública tanto a nivel nacional como internacional sigue siendo el abuso de sustancias psicotrópicas. De acuerdo con estudios epidemiológicos, afecta a individuos de cualquier género, condición social y edad, sin embargo se presenta con mayor frecuencia en jóvenes, atentando contra la salud, el bienestar y la seguridad de la población del país. Los últimos resultados de la encuesta nacional de adicciones indican que el consumo de drogas ilegales y médicas en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años de edad ha aumentado de un 5% observado en 2002 a un 5.7% en este periodo (ENA-INPRF, 2008). Las drogas ilegales (mariguana, heroína, metanfetaminas, alucinógenos, inhalables, cocaína y sus derivados y otras drogas) aumentaron de 4.6 a 5.2%; el consumo de drogas médicas con potencial adictivo, usadas fuera de prescripción, mantuvieron los niveles observados en 2002 (ENA-INPRF, 2008). En los grupos poblacionales, se observa que, si bien el consumo de drogas ilegales es mayor en los hombres (en una proporción de 4.6 hombres por cada mujer), el índice de crecimiento es mayor en las mujeres entre las cuales el consumo de drogas ilegales se duplicó, aumentando de 1% en 2002 a 1.9% en 2008, mientras que el consumo en hombres solamente se incrementó de 8 a 8.8% (ENA-INPRF, 2008). Como científicos comprometidos tenemos la obligación de desarrollar nuevas

terapias de apoyo para solucionar los problemas de adicción reflejados en los recientes resultados de los diferentes estudios epidemiológicos, los que muestran incrementos significativos en el uso de sustancias adictivas (ENA-INPRF, 2008).

- *Farmacocinética y farmacodinamia de opioides*

Tras la caracterización de las encefalinas (Met-encefalina y Leu-encefalina), se han descubierto muchos péptidos con actividad opioide como la β -endorfina de la pituitaria. La mayor parte de los péptidos opioides aislados hasta el momento, salvo las endorfinas 1 y 2, presentan una característica en común, la presencia de los mismos cuatro residuos en el extremo N-terminal (Tyr-Gly-Gly-Phe). La gran similitud en la estructura en el amino terminal de estos péptidos con la morfina (un anillo aromático hidroxilado con un grupo alquilo de dos átomos de carbono que poseen en posición 2 y un grupo amino terciario en posición para) explica por qué la morfina puede activar los receptores opioides como si se tratase de un ligando endógeno (Antón et al, 2008). Los receptores opioides están involucrados con la percepción de estímulos dolorosos (inflamación aguda o crónica, lesiones en los nervios por estímulos nocivos de tipo mecánico, térmico o químico) e implican la participación de varias estructuras neurales, desde los terminales periféricos hasta las zonas somatosensoriales de la corteza cerebral, cada uno de los cuales participa de mecanismos moduladores

muy diversos (Eisenstein TK, 2011). Un agonista exógeno, de los receptores opioides es la morfina, de naturaleza alcaloide y con estructura química fenantrénica, derivado del extracto lechoso (goma de opio) de la planta *Papaver somniferum*, es el compuesto mayoritario (> 10%) de este extracto junto con otros compuestos estructuralmente análogos como la codeína, tebaína y papaverina (O'Brien CP, 2001). Es en su mayoría metabolizada por conjugación enzimática, fundamentalmente en hígado, con el ácido glucurónico en las posiciones de los grupos hidroxilo 3 y 6 de su estructura fenantrénica, formándose los intermediarios morfina 3, morfina 6 y en menor proporción, morfina 3-6-glucurónico. No obstante que estos intermediarios catabólicos son las formas estructurales de excreción (principalmente urinaria) de la morfina, todos ellos y más notoriamente la morfina-6- glucurónico, poseen importantes capacidades analgésicas y psicotrópico-adictivas, ya que una vez generados por sistemas enzimáticos específicos en el hígado, permean rápidamente la barrera hematoencefálica y activan el subtipo de receptor opioide mu (μ) (Kamendulis et al, 1996; Hutto et al, 1997; Halliday et al, Life Sci., 1999). La heroína, es un derivado semisintético de la morfina, el cual a diferencia de ésta última que posee un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo fenólico y otro hidroxilo alcohólico en la posición 6, tiene condensados dos grupos acetilo en estas mismas posiciones de la estructura anillada fenantrénica opiácea

(Selley et al, 2001). Ambas son absorbidas a partir de diferentes compartimientos, como son el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, la mucosa bucal, así como el espacio subcutáneo, intramuscular, intravascular e intratecal. En el caso de la morfina, esta se une al receptor μ con una alta afinidad y presenta una afinidad baja por los receptores δ y κ . Como consecuencia de la activación de los receptores μ , este agonista puro produce analgesia, euforia, depresión respiratoria, estreñimiento, náuseas, vómito y retención urinaria. La administración repentina de los fármacos opiáceos, se acompaña de tolerancia, la velocidad con que se desarrolla no es homogénea para todos los efectos, sino que afecta más rápidamente a las acciones depresoras (analgesia, depresión respiratoria, sedación e hipotensión). Con el aumento de la dosis administrada de morfina además de aumentar el efecto analgésico, se potencian los efectos adversos (Kosten et al, 2003). Sin embargo, existen estudios farmacocinéticos (Halliday et al, 1999) que exponen la idea de que las acciones analgésicas y/o adictivas de la morfina no son ejercidas predominante y directamente por ella misma al nivel central del sistema nervioso, sino por sus metabolitos producto de su biotransformación final como compuestos glucorónicos.

Uno de los factores farmacocinéticos importantes que comparten las drogas con alta potencia farmacológica es su alta cinética de permeación

hematoencefálica, el cual parece ser esencial para ejercer sus acciones de generación de recompensa placentera y, por lo tanto, de desarrollar efectos reforzantes importantes al consumo reiterado de estas sustancias, el antagonismo de permeación hematoencefálica por anticuerpos específicos contra drogas adictivas ha demostrado efectos inmunoprotectores para mantener la abstinencia del consumo adictivo de drogas como la cocaína y la nicotina en el modelo animal del roedor (Sevarino et al, 2000; Walters et al, 2003).

La tolerancia es una neuroadaptación presente en el síndrome adictivo a opiáceos, es causada por la acción repetida de la morfina o la heroína sobre las neuronas de áreas cerebrales específicas, como son el *locus coeruleus*, el hipocampo, el hipotálamo lateral, el área ventral-tegmental, el complejo amigdalino, el núcleo *acumbens*, y la corteza prefrontal. Estas áreas cerebrales forman, en conjunto, el sustrato neuroanatómico donde los opiáceos y otras drogas adictivas como la cocaína ejercen sus acciones biológicas de recompensa y reforzamiento al consumo de éstas sustancias. En general, la administración crónica sistémica de un opiáceo como la heroína o morfina, provoca el desarrollo de una serie de mecanismos homeostáticos sobre las neuronas de estas áreas cerebrales, provocando cambios en el funcionamiento neuronal al nivel electrofisiológico, bioquímico y genómico, cambios que en forma global están destinados a recuperar el

nivel funcional previo a la acción de la droga (Ghodse H, 1995). Una vez producida la tolerancia, si se deja de consumir la droga en forma abrupta, se produce una nueva serie de alteraciones en estas neuronas, dando lugar a la neuropatología del síndrome de abstinencia durante la adicción. El síndrome de abstinencia a opiáceos del tipo de la morfina o heroína, a diferencia del producido por psicoestimulantes como la cocaína y anfetaminas, es particularmente intenso a nivel de alteraciones en el funcionamiento físico y mental del adicto a estas drogas (Koob GF., 2000; Stein et al, 2003).

- *Inmunodepresión por opioides*

A nivel del sistema nervioso central, existe una variedad de células inmunocompetentes neuronales y no neuronales que contribuyen en la presentación de un estado fisiológico de homeostasis, este llamado centro de señalización inmune afecta a todos los tipos de células en el sistema nervioso central, pero la ruptura de esa homeostasis puede generar un estado patológico provocado por la liberación excesiva, o bien la supresión de sustancias inmunoactivas como son las citocinas y las quimiocinas, lo cual en su conjunto puede llevar a un estado de inmunodepresión (Flores LR et al, 1996).

Se ha reportado que los opioides no solo tienen una acción en los receptores cerebrales y de la médula espinal, sino también en las

neuronas sensoriales periféricas, lo que llevó a detallar la vía de actuación de esas sustancias fuera del sistema nervioso central (SNC) (Stein et al, 2009; Singhal et al, 2002). Experimentos *in vitro* han demostrado que la morfina y otros opiáceos perjudican la función quimiotáctica y fagocítica de los neutrófilos y monocitos y reducen las respuestas efectoras de linfocitos B y T, como también aumentan la apoptosis de linfocitos y células fagocíticas (Singhal et al, 1999; Mellon et al, 1998).

Los estudios *in vivo* también han demostrado un efecto indirecto de los opioides, especialmente de la morfina, que envuelve la reducción de la función de células Asesina Natural o Natural Killer (NK) y de la actividad proliferativa linfocítica en respuesta a mitógenos, supresión de citocinas inflamatorias, además de la activación del sistema nervioso simpático que promueve elevados niveles de noradrenalina y que está relacionada con la inmunodepresión (Flores et al, 1996; McCarthy et al, 2001). Esos efectos parecen estar relacionados con la regulación descendente de la proteincinasa C, con acciones mediadas por la somatostatina, con la participación de enzimas proapoptóticas y con la alteración de la liberación de óxido nítrico (Walters I, 2003; Bhaskaran et al, 2001).

Ensayos donde se realizaron administraciones subcutáneas de 40 mg/kg de morfina en ratones durante 24 horas, provocaron un daño en la actividad de macrófagos y después de tres días, hubo bacteriemia, y

crecimiento bacteriano en el líquido peritoneal, hígado, bazo, riñones, corazón y pulmón. Esos efectos fueron bloqueados cuando se administró la naloxona, antagonista puro de los opiáceos, antes de cada dosis de morfina, lo que implica un mecanismo dependiente del receptor opioide μ (Rahim et al, 2004; Selley et al, 2001).

Se ha reportado que la respuesta inmunitaria en bazo de ratones tratados con morfina disminuyó al presentar un proceso de abstinencia de la droga, esto debido a un déficit en el funcionamiento de los macrófagos de bazo, además, las células de bazo pueden inhibir la respuesta inmunitaria normal por la actividad del óxido nítrico producido por los macrófagos y las células B; por su parte los macrófagos presentan la liberación de óxido nítrico (NO) como un efecto de la morfina mediado a través de los receptores μ -opioides presentes en su superficie. Esta inmunosupresión posiblemente sea mediada por la disminución de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, disminución de moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras y disminución de citocinas como son IL-1, IL-2, IL-5, TNF- α (Nelson et al, 1997).

Además, la morfina inhibe la función de los linfocitos T en ratones. En dosis bajas la morfina puede activar las caspasas 3 y 8 de los linfocitos T en el ganglio linfático a través de la activación del receptor μ -opioide, causando muerte de estas células por apoptosis (Wang et al, 2001).

Los tratamientos farmacológicos disponibles actualmente, modifican las acciones farmacodinámicas de los opiáceos sobre las neuronas del tejido nervioso. Durante el síndrome de abstinencia no se deben administrar opiáceos que produzcan una demanda crónica, requiere de ingreso hospitalario y cuidados clínicos especializados, por lo cual, el proceso es de alto costo económico. Sin embargo, una variedad de tratamientos se enfocan a la desintoxicación durante la abstinencia, así como a prevenir las recaídas en la adicción a la morfina o heroína, pero no se ha reportado una eficacia óptima y los distintos fármacos empleados para estos fines terapéuticos, desarrollan efectos colaterales tóxicos en los pacientes en tratamiento, sobre todo en aquellos sometidos a largos periodos de abstinencia y prevención de recaídas. Por lo tanto, existe la urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas anti-adictivas, a través del proceso de preparación y uso de nuevos fármacos con más eficacia y menos toxicidad colateral durante su administración a largo plazo en estas terapias (Grilly DM, 2002).

En 1960, se introdujo la terapia basada en la unión específica a los receptores de fármacos en el cerebro, como la metadona (MMT), que hace frente a la dependencia a opiáceos, la cual tuvo resultados superiores al tratamiento por desintoxicación. Sin embargo, la MMT está relacionada con sobredosis, altas tasas de deserción dentro del primer mes y el alto costo de las clínicas en las que se realiza la administración

diaria. Otra alternativa farmacéutica es la buprenorfina, la cual tiene un menor riesgo de sobredosis que la metadona, un menor número de interacciones con otros medicamentos, en comparación con la metadona y es mucho más accesible para los pacientes, pero hay informes que sugieren que la buprenorfina no ha superado a la metadona en su eficacia en el proceso de abstinencia (Stotts et al, 2002). Tanto la metadona (agonista opioide) y buprenorfina (un agonista opioide parcial) son susceptibles al abuso y sobredosis con reacciones adversas varias, tales como depresión respiratoria y muerte súbita (Maxwell et al, 2002; Maxwell et al, 2011; Kreek et al, 2010). Por lo tanto, los tratamientos agonistas no son óptimos para todos los pacientes. Una alternativa es el tratamiento con naltrexona, un antagonista de los opioides, de larga acción, que no produce euforia y no es adictivo. Es especialmente adecuado para evitar una recaída en el consumo de opioides y después de la desintoxicación de heroína, tratamiento que en administración inyectable ha sido ya aprobado por la FDA (Stotts et al, 2002; Minozzi et al, 2011; Sullivan MA, 2013).

En general, los programas para el control de la adicción a la heroína son costosos. En la actualidad se carece de tratamientos que combatan adicciones tan presentes en la sociedad, como son a la cocaína y metanfetaminas o existen otros tratamientos que han tenido poco éxito, como para la heroína y nicotina. Estas limitaciones en los tratamientos

han abierto la oportunidad al desarrollo de alternativas como las vacunas para el abuso de drogas. La historia de las vacunas contra adicción comienza hace casi 40 años, con las vacunas contra la adicción a opiáceos (Berkowitz et al, 1972; Bonese 1974). Sin embargo, el desarrollo se interrumpió con el desarrollo de la metadona y naltrexona para tratar la adicción a la heroína.

- *Vacunas*

A lo largo del siglo pasado, los programas de vacunación han llevado a la eliminación o control de diferentes enfermedades infecciosas, como son la viruela, la poliomielitis, el sarampión, las paperas, la rubéola, influenza tipo B, tos ferina, el tétanos y la difteria. La mayor parte de estas vacunas clásicas fueron desarrolladas utilizando metodologías tecnológicas basadas en microorganismos o estructuras específicas de éstos, tales como bacterias o virus fisicoquímicamente inactivados. Las vacunas, además de contener organismos inactivos o productos derivados de ellos, purificados, actualmente se producen de forma sintética, por lo que no emplean componentes inactivados o atenuados de microorganismos, sino péptidos, carbohidratos, o antígenos, por lo que son más seguras (Hieda et al, 1997). Las vacunas son un preparado de antígenos, el cual despierta una respuesta inmunológica humoral y celular cuando entran en el organismo, esta respuesta generada, se mantiene a lo largo del tiempo por medio del desarrollo de una memoria

inmunológica, que produce una inmunidad prolongada frente a una enfermedad. La vacunación es una forma de medicina preventiva, tiene como objetivo proteger a las personas y comunidades de las enfermedades infecciosas, por medio de la inmunización, funcionando así, como un sistema de alerta temprana que prepara al organismo para luchar contra la infección (Hieda et al, 1997).

Una vez que el cuerpo ha sido expuesto a una infección, el sistema inmunológico "reconoce" al agente causante y produce anticuerpos para destruir la infección o al inmunógeno. El cuerpo tiene que estar expuesto a la infección una primera vez para que el sistema inmunitario adquiera la capacidad de reconocerlo. Esto se logra artificialmente a través de la inmunización (Carrera et al, 2004). La inmunización activa implica la administración repetida de un inmunógeno con el fin de estimular al sistema inmune para producir anticuerpos específicos contra éste (por ejemplo, vacunación). La inmunización pasiva implica la producción de anticuerpos en algún otro organismo (por ejemplo, conejos) o bien *in vitro*, que son después purificados y se administran a los sujetos en estudio. Cada método tiene ventajas y desventajas, la vacunación requiere relativamente pocas administraciones para producir un alto nivel de anticuerpos, el cual persiste durante varios meses. Entre las principales desventajas de la vacunación están, el lapso de tiempo que se requiere para alcanzar los niveles de anticuerpos necesarios y la

incapacidad para controlar esos niveles. La inmunización pasiva logra el nivel sérico necesario de anticuerpos casi inmediatamente, en comparación con los meses necesarios para la vacunación, se puede controlar la dosis de anticuerpos y así estudiar las relaciones dosis-respuesta, con lo que se pueden examinar los efectos de las dosis alta de anticuerpos que no se pueden conseguir únicamente vacunando; entre las desventajas de la inmunización pasiva son que requiere inyecciones más frecuentes para mantener los niveles de anticuerpos requeridos y es más caro que la vacunación. Algunas de las características relevantes de las vacunas, en el tratamiento de abuso de drogas, incluyen la inmunogenicidad, la afinidad y la especificidad del anticuerpo que se busca producir. La inmunogenicidad se refiere a la concentración sérica de anticuerpos específicos que se logra. Con el fin de presentar la máxima efectividad, una vacuna debe promover y mantener y sostener una alta concentración en suero del anticuerpo, ya que a mayor nivel de anticuerpos, mayor cantidad de sustancia de abuso se unirá a éste. La afinidad se refiere a la fuerza con la que un sitio activo del anticuerpo se une a una determinante antigénica del antígeno, en este caso la droga. La especificidad se refiere a la medida en que los anticuerpos se unen a un determinante antigénico en comparación con los otros compuestos presentes, una mayor especificidad reduce la competencia de otros compuestos en su

capacidad de unión, mejorando la seguridad y reduciendo la probabilidad de efectos secundarios adversos. La formulación de vacuna puede influir en estas propiedades (Sanderson et al, 2003).

Dentro de la respuesta inmunitaria se da el reconocimiento del antígeno y su presentación por las células presentadoras de antígenos profesionales (APC) en el sistema inmunológico tales como células dendríticas y macrófagos que tienen la capacidad de reconocer antígenos, procesarlos y presentarlos a través de la molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), presentándolos a los receptores de antígeno ya sea del linfocito T-cooperador o del linfocito B (TCR o BCR, respectivamente) con el fin de que produzca una respuesta inmunitaria humoral en contra de estos determinantes antigénicos (Abbas et al, 2007; Antón et al, 2009).

- *Vacuna M-TT*

Las estrategias que involucran vacunas contra las drogas adictivas incluyen la conjugación de moléculas pequeñas adictivas, como haptenos, con macromoléculas proteínicas como la KLH, la toxina del cólera y toxina tetánica, por medio de un enlace covalente con dicha proteína externa, permitiendo la expresión de las moléculas de anticuerpo por las células B, así como la inducción de la ayuda de células T que se requiere para provocar respuestas de anticuerpos de alto nivel (Falugi et al, 2001). El desafío de desarrollar una vacuna

dirigida a medicamentos adictivos es que las drogas son pequeñas moléculas y por sí solas no inducen una respuesta inmunitario, también se requiere la generación de un alto título de anticuerpos de alta afinidad contra las drogas para lograr secuestrar en la sangre a la molécula. Uno de los primeros informes sobre una estrategia inmunoterapéutica para evitar los efectos de las drogas de abuso fue el resultado de la inmunización con una vacuna de morfina que disminuyó la auto-administración de heroína en un mono *rhesus* (Bonese et al, 1974). Desde entonces, la inmunoterapia como tratamiento contra el abuso de drogas y su adicción se ha desarrollado para numerosas drogas de abuso. Una vacuna contra la nicotina fue desarrollada y probada en animales de laboratorio y continúa con los ensayos clínicos (Cerny, 2005; Keyler et al, 2008; Moreno et al, 2010).

Las vacunas contra metanfetamina han sido desarrolladas para el tratamiento potencial contra la adicción a la metanfetamina (Duryee et al, 2009; Gentry et al, 2009; Xu et al, 2007). También se han desarrollado varias vacunas contra la cocaína, algunas de las cuales se encuentran ya en fase de ensayos clínicos (Carrera et al, 1995; Haney et al, 2004; Kosten et al, 2002; Orson et al, 2009).

El interés en las vacunas contra drogas inició nuevamente a partir de 1992, cuando se informó de una vacuna contra la cocaína (Bagasra et

al, 1992). Y en 2001, se reportó un preparado hapténico para uso en la fabricación de vacunas contra la nicotina (Isomura et al, 2001).

Entre las vacunas anti sustancias adictivas para uso en humano, capaz de inducir la síntesis de anticuerpos policlonales contra la morfina e incluso su análogo estructural, la heroína, a través de esquemas de vacunación múltiple, se encuentra la vacuna M-TT. El diseño estructural de esta vacuna consiste en la síntesis inicial y haptización del derivado morfina- β -hemisuccinato a una fracción peptídica del toxoide tetánico como proteína acarreadora, a través de un brazo molecular espaciador sintetizado secuencialmente a partir de una condensación covalente. La respuesta inmunológica humoral luego de la inmunización se caracteriza por la presencia de altos y sostenidos títulos de anticuerpos policlonales circulantes, con especificidad a la morfina y además presenta capacidad de reconocimiento inmunológico cruzado para la heroína y metabolitos como son el 3-glucorónido y 6-glucorónido dentro del torrente circulatorio, evitando así, la permeación hematoencefálica al tejido nervioso cerebral, esta vacuna se caracteriza por su inmunogenicidad con respuesta inmunitario de memoria de largo plazo (Kantak et al, 2003; Antón et al, 2006; Antón et al, 2009).

La vacuna M-TT administrada a organismos inmunodeprimidos por la pre-exposición a morfina producirá una respuesta inmunitaria tan eficaz como en el caso de los ratones no pre-expuestos. Por tanto, con los

resultados obtenidos en este protocolo se busca que en ratones pre-expuestos a este opiáceo, por lo tanto inmunodeprimidos, la respuesta inmune que se presente sea eficaz. Se evaluó el índice poblacional de células T y B esplénicas por medio de citometría de flujo. Para evaluar la respuesta inmune a lo largo del protocolo se determinó el título de Anticuerpos (Ab's) anti-morfina mediante ensayos de ELISA, tanto en ratones pre-expuestos como en los no pre-expuestos a este opiáceo los cuales se sometieron a un esquema de vacunación semanal de 6 aplicaciones de la vacuna M-TT.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La problemática que existe a nivel de salud pública respecto al consumo de sustancias adictivas, como es la morfina, va en aumento, por lo que es primordial el desarrollo de una alternativa terapéutica para los consumidores en tratamiento. En la actualidad sigue siendo una prioridad para el área de producción de vacunas el generar una respuesta inmunológica humoral suficientemente robusta que promueva la producción de títulos altos y sostenidos de anticuerpos. La vacuna M-TT ha demostrado tener estas características, sin embargo no ha sido demostrada su eficacia en individuos con un trasfondo de inmunodepresión por consumo de morfina, situación que se propicia en este trabajo.

JUSTIFICACIÓN

Dado que la inmunización con la vacuna M-TT induce un título de anticuerpos significativo en ratones que no han recibido tratamiento previo con morfina confiriéndoles inmunidad anti- morfina, se dio pauta al desarrollo de protocolos donde se sometió dentro de un esquema de vacunación con la vacuna M-TT a ratones previamente inmunodeprimidos por el consumo crónico de morfina.

PREGUNTA

¿Tendrá la vacuna M-TT la misma inmunogenicidad en ratones inmunodeprimidos por el consumo crónico de morfina que en ratones que no han tenido consumo previo de morfina?

HIPÓTESIS

La inmunización con la vacuna M-TT será tan eficiente en ratones inmunodeprimidos por el consumo previo de morfina como en ratones que no han recibido tratamiento previo con morfina.

OBJETIVOS

- GENERAL.

- Evaluar la respuesta inmunitaria que la vacuna M-TT genera en ratones inmunodeprimidos por la exposición previa a morfina.
- Evaluar la respuesta inmunitaria de ratones inmunodeprimidos por la exposición previa a morfina y tratados con la vacuna M-TT.

- PARTICULARES

- Demostrar el efecto inmudepresor de la morfina.
- Determinar el título de Anticuerpos (Ab's) contra morfina en ratones inmunizados con la vacuna M-TT, pre-expuestos a morfina y compararlo con el de ratones inmunizados no pre-expuestos.
- Evaluar el efecto de la inmunización sobre la respuesta inmunitaria en las poblaciones celulares de linfocitos T y B, en muestras de bazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La *Tabla 1* presenta los grupos en los que se evaluará la respuesta inmunitaria posterior al tratamiento recibido, con la finalidad de analizar un modelo que presente inmunodepresión por la exposición a morfina, primero se formaron dos grupos: ratones pre-expuestos y ratones no pre-expuestos, posteriormente se conjuntaron en grupos que fueron tratados, ya sea con la vacuna M-TT, Toxina tetánica (TT), TT+ Alúmina y solución salina. (Anexo 1)

El tamaño de la muestra (n=128) fue calculada mediante el método de Tang segunda variante (Kuehl, 2001).

Se trabajó con ratones hembra Balb/c de 18-20g de peso.

La *Tabla 2* presenta el diseño experimental que se siguió para responder la pregunta planteada, por ello, se planteó realizar dos fases, inicialmente se llevó a cabo la pre-exposición a morfina, posteriormente se realizó el tratamiento con la vacuna M-TT y los controles. (Anexo2)

Inmunodepresión:

Para demostrar la inmunodepresión se llevó a cabo la obtención de los bazo de los ratones, dos días después de terminar el tratamiento con morfina y se evaluó la población de células T y B por citometría de flujo.

Ensayos de ELISA:

Los anticuerpos anti-morfina fueron monitoreados mediante ensayos de ELISA. Un día antes de cada inmunización previa con la vacuna M-TT se tomaron muestras de suero, las cuales se congelaron a -20°C hasta su uso. (Anexo 3) * Este inmunoensayo se realizó utilizando Pool's de las muestras de suero sanguíneo.

Citometría de Flujo:

Se evaluó la población de células T y B en bazo por citometría de flujo. El modelo de inmunodepresión se evaluó en células de bazo. Se realizó la obtención de bazos 2 días post-tratamiento de morfina, así como cada 7 días luego segunda, cuarta y sexta reinmunización para evaluar la respuesta celular.

Los resultados de la citometría de flujo se reportaron como índices de población, para lo cual, se calculó el correspondiente índice de población de cada grupo, dividiendo los resultados de cada observación entre el promedio del grupo control, posteriormente se calculó el promedio y desviación estándar con los índices de cada grupo. Los anticuerpos que se utilizaron y su fluoróforo se presentan en el Anexo 4.

RESULTADOS

El efecto de la morfina sobre el sistema inmunológico (Índice de población de células T y B):

Efecto depresor en la inmunidad por la administración de morfina se demostró a través de un esquema de aplicación de dosis escalonadas, con una duración de 16 días, la cual inició con 5 mg/kg y terminó con 40 mg/kg (Tabla 2), dos días después de la última aplicación, se obtuvieron los bazo de los animales tratados y de los controles y se midió el índice de población de las células T inmaduras (CD3⁺ dobles positivas para CD4⁺ y CD8⁺), células T citotóxicas (CD3⁺, CD8⁺) y células T cooperadoras (CD3⁺, CD4⁺), así como de las células B activadas (CD19⁺ A/I-E/I⁺) y las células B de memoria (CD19⁺ CD27⁺).

Las células T inmaduras de ratones pre-expuesto a morfina presentaron una diferencia significativa con respecto a las células T inmaduras de los ratones del grupo de control ($p < 0,05$ Mann-Whitney U) (Figura 1 paneles A, B), mientras que las células T citotóxicas (Figuras 1 paneles C, D) y las células T helper (Figuras 1 paneles E, F) no mostraron diferencias significativas estadísticamente ($p > 0,05$ Mann-Whitney U). En el caso de los índices de población de células B activadas (Figura 1 paneles G, H) y las células B de memoria (Figuras 1 paneles I, J) se

observaron resultados similares. Los grupos tanto de pre-expuestos a morfina como de no pre-expuestos, Toxina tetánica (TT)+Alúmina (Alum) y Alúmina no presentaron diferencia significativa con respecto del control (U de Mann-Whitney $p < 0.05$) (Datos no mostrados).

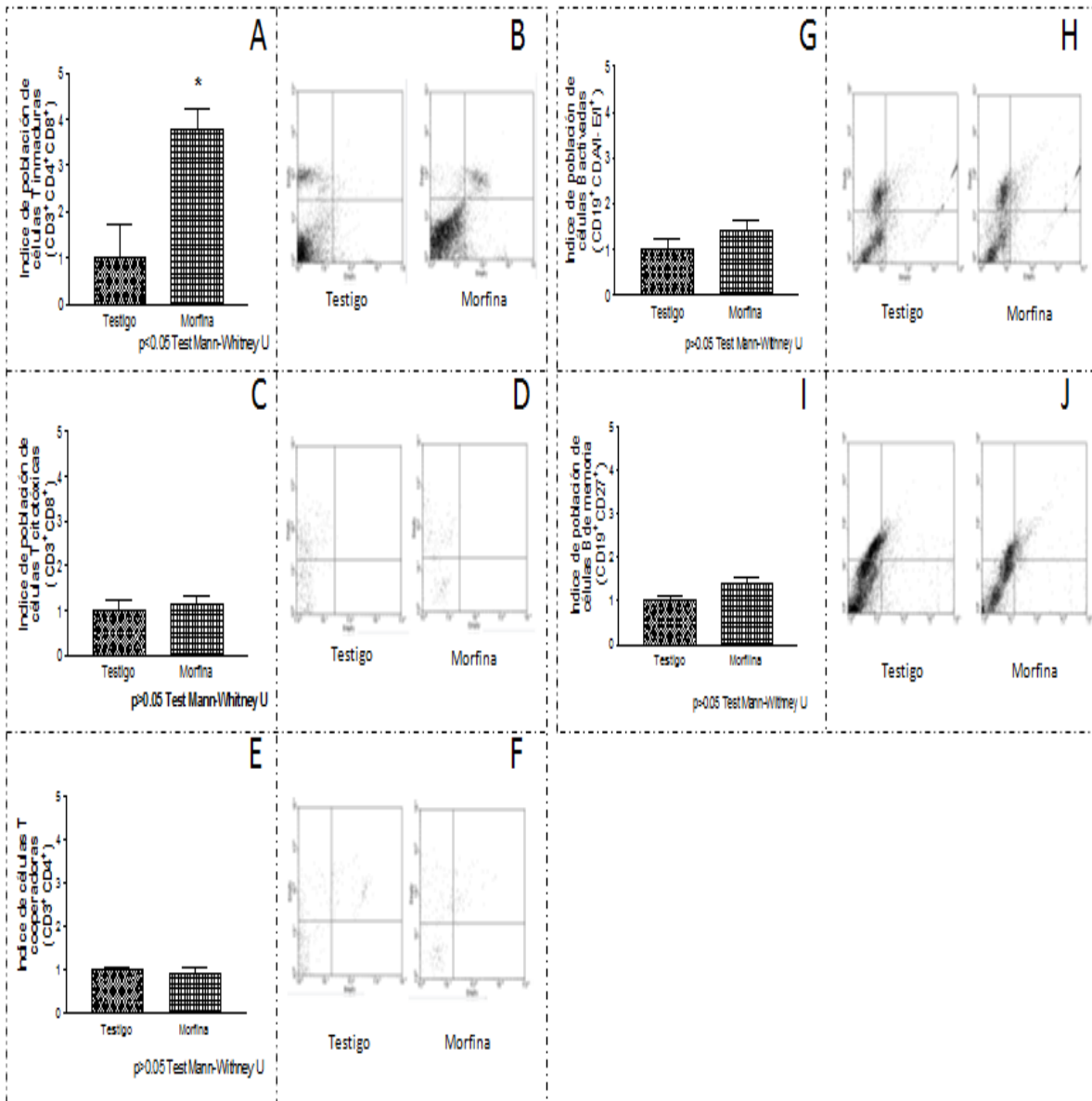


Figura 1 Índice de población de células T y B de bazo de ratones sometidos a un tratamiento crónico de morfina con dosis inmunodepresivas. Ratones hembra cepa Balb/c fueron sometidos a un tratamiento con morfina durante 16 días a dosis escalonadas para inducir inmunodepresión, dos días después se tomaron muestras de bazo y mediante citometría de flujo se obtuvo el índice de población de células T y B. El índice de población de células T inmaduras (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) muestra un aumento significativo en la población (Paneles A-B) (U de Mann-Whitney p < 0.05). Mientras que el índice de población de células T citotóxicas (CD3⁺ CD8⁺) (Paneles C-D), células T cooperadoras (CD3⁺ CD4⁺) (Paneles E-F), células B activadas (CD19⁺ I/A-I/E⁺) (Paneles G-F) y células B de memoria (CD19⁺ CD27⁺) (Paneles H-I) no mostraron diferencia significativa con respecto al testigo (U de Mann-Whitney, p > 0.05).

Respuesta humoral de ratones pre-expuestos a morfina:

En los ratones pre-expuestos a morfina y los ratones no expuestos pero que fueron inmunizados con la vacuna M-TT (controles) y sangrados cada 7 días los anticuerpos anti-morfina se evaluaron mediante ensayos de ELISA. Se observó un aumento progresivo en el título de anticuerpos específicos durante los seis muestreos (Figura 2 panel A) y la respuesta fue similar en ambos grupos, pre-expuestos a morfina y control. Se alcanzaron títulos de anticuerpos sostenidos máximos ($\approx 1:60\ 000$) después de seis refuerzos y permaneció sostenido durante un período de cuatro meses sin nuevas inmunizaciones.

A partir de este punto, se presentó la disminución progresiva de los títulos de anticuerpos anti-morfina en animales no inmunizados. Los títulos de anticuerpos mostraron una disminución significativa de una manera dependiente del tiempo, alcanzando su nivel más bajo ($\approx 1:15,000$ en el control sin morfina e inmunizados con M-TT y $\approx 1:45,000$ en ratones inmunizados con la vacuna M-TT y pre-expuestos a morfina), 150 días después de la última inmunización (Figura 2 panel B). Los títulos de anticuerpos fueron similares en ambos grupos, los pre-expuestos a morfina e inmunizados con la vacuna M-TT y los controles sin la morfina pero vacunados, después de 210 días de la última inmunización. Los grupos tanto de pre-expuestos a morfina como de no pre-expuestos, Toxina tetánica (TT)+Alúmina (Alum) y Alúmina (Alum)

no presentaron diferencia significativa con respecto del control (Datos no mostrados).

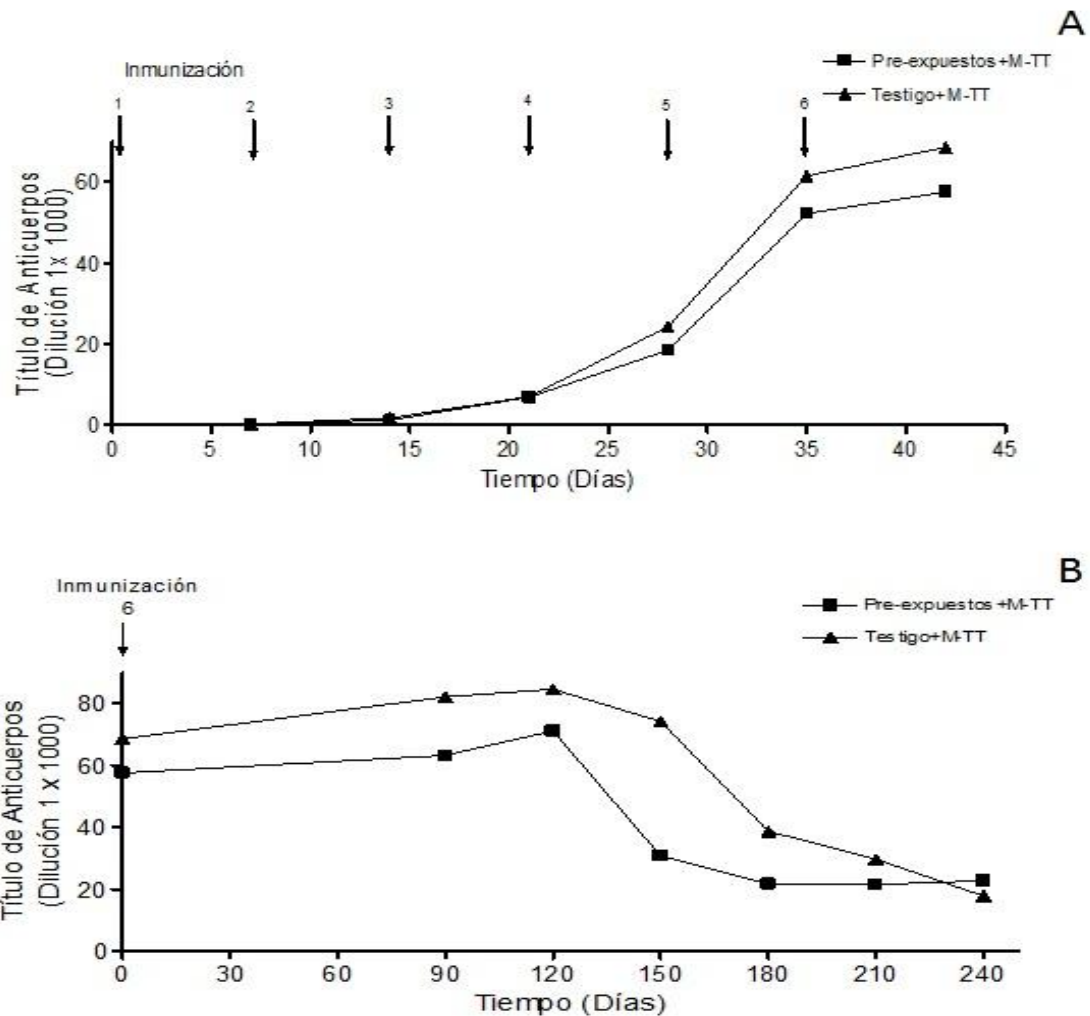


Figura 2 **Respuesta inmune humoral de ratones inmunizados con la vacuna M-TT.** A ratones previamente inmunizados con morfina durante 16 días y 2 días de abstinencia, se les sometió a un esquema de inmunización múltiple con la vacuna M-TT, en el que se realizaron 6 aplicaciones con una semana de diferencia cada una, posteriormente se obtuvieron los sueros y se les realizó el ensayo de ELISA para la determinación del título de anticuerpos que se generó con la vacuna. Como podemos observar en el panel A, la inmunización con la vacuna M-TT produjo títulos de anticuerpos específicos a morfina con la misma tendencia a aumentar a lo largo del tiempo, tanto en ratones pre-expuestos como en los no pre- expuestos, obteniéndose el máximo valor luego de la sexta reinmunización. En el panel B, para el día 120 observamos el inicio en el descenso del título de anticuerpo.

Respuesta celular a la vacuna M-TT de ratones pre-expuestos a morfina:

Siete días después de las segunda, cuarta y sexta inmunización (Anexo 2) con la vacuna M-TT, se obtuvieron los bazos de ratones pre-expuestos a morfina e inmunizados con la vacuna M-TT, de los pre-expuestos pero no inmunizados y de los controles no pre-expuestos pero inmunizados y de los no tratados, y se evaluaron los índices de población de células T y B. Los grupos tanto de pre-expuestos a morfina como de no pre-expuestos, Toxina tetánica (TT)+Alúmina (Alum) y Alúmina (Alum) no presentaron diferencia significativa con respecto del control (Datos no mostrados).

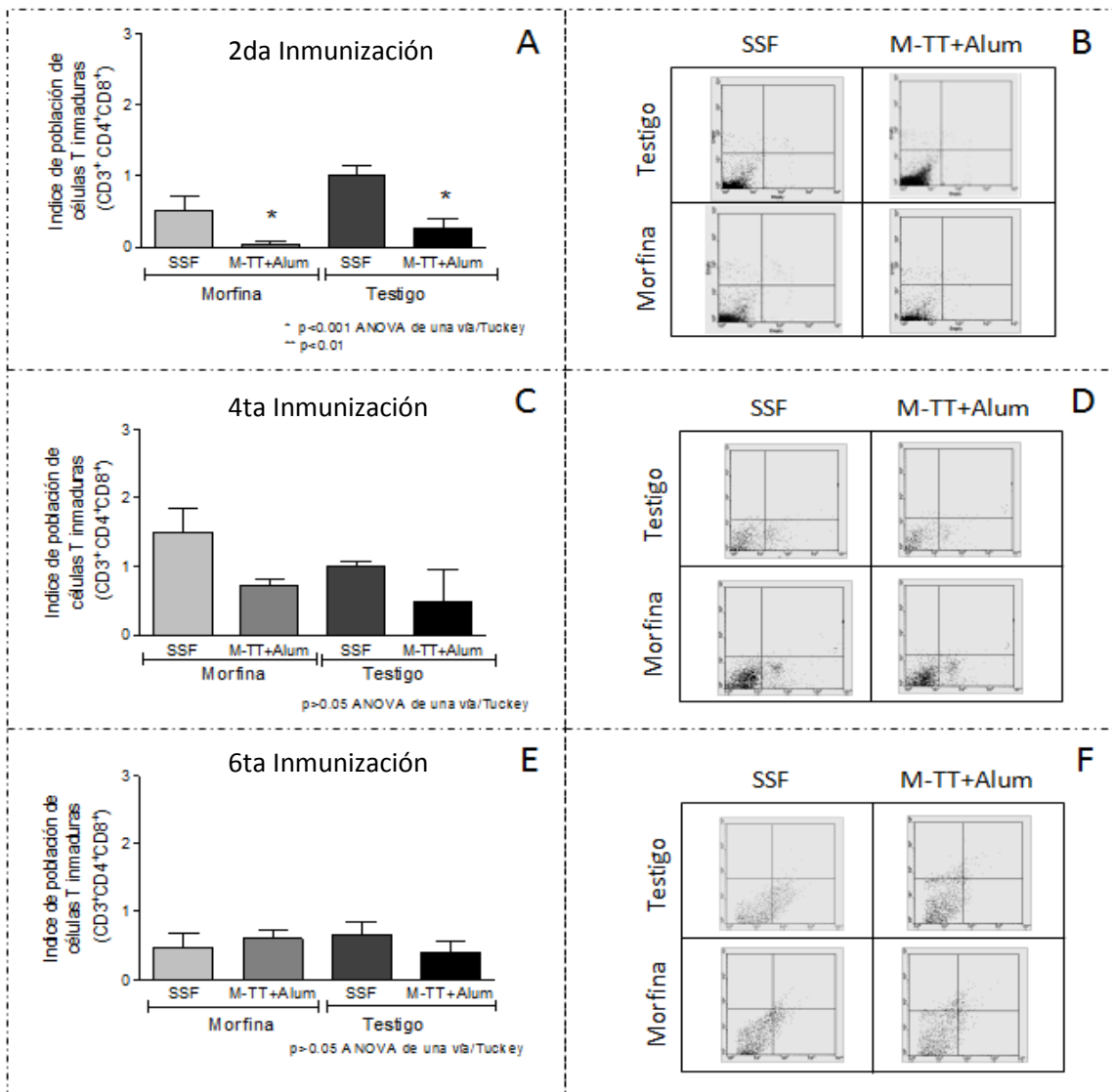


Figura 3 Índice de población de células T inmaduras (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) provenientes de bazo de ratones sometidos a un esquema de inmunización múltiple con la vacuna M-TT. Ratones hembra cepa Balb/c previamente tratados con dosis inudepresoras de morfina, fueron inmunizados semanalmente con la vacuna M-TT, durante 6 semanas, para inducir inmunidad contra morfina, se tomaron muestras de bazo una semana después de la segunda, cuarta y sexta inmunización respectivamente y mediante citometría de flujo se obtuvo el índice de población de células T inmaduras. Para la segunda reinmunización el índice de población de células T inmaduras (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) fue menor en los ratones pre-expuestos a morfina e inmunizados que en los no pre-expuestos e inmunizados y que en los no re-expuestos y no inmunizados (Paneles A-B) (ANOVA de una vía/ Tuckey *p<0.001, **p<0.01), los índices de población de la cuarta (Paneles C-D) y sexta (Paneles E-F) reinmunización fueron similares tanto en los grupos pre expuestos a morfina con respecto a su control y los testigos (ANOVA de una vía/ Tuckey p>0.05).

Después de la segunda inmunización el índice de población de células T inmaduras de ratones pre-expuestos a morfina e inmunizados con la vacuna M-TT fueron significativamente menores que los ratones control sin morfina e inmunizados con la vacuna M-TT ($p < 0,001$ ANOVA de una vía/ Tuckey), mientras que el índice de población celular en los ratones no pre-expuestos e inmunizados fue menor que los controles no pre-expuestos y no inmunizados, pero la diferencia fue menor con respecto a los ratones pre-expuesto e inmunizados con M-TT ($p < 0,01$ ANOVA de una vía / Tuckey) (Figura 3 paneles A, B). En la cuarta inmunización la población de células T inmaduras no mostró diferencias significativas en ningún grupo ($p > 0,05$ ANOVA de una vía/ Tuckey) (Figura 3 paneles C, D). Se observaron resultados similares después de la sexta inmunización ($p > 0,05$ ANOVA de una vía / Tuckey) (Figura 3 paneles E, F). Los grupos tanto de pre-expuestos a morfina como de no pre-expuestos, Toxina tetánica (TT)+Alúmina (Alum) y Alúmina (Alum) no presentaron diferencia significativa con respecto del control (Datos no mostrados).

El índice de población de las células T citotóxica no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$ ANOVA de una vía/ Tuckey) después de la segunda inmunización, pero podemos ver una tendencia de aumentar la población de células en los dos grupos vacunados (Figura 4 paneles A, B). Sin embargo, esta tendencia desaparece después de cuatro inmunizaciones ($p > 0,05$ ANOVA de una vía / Tuckey) (Figura 4

paneles C, D) y persiste la homogeneidad en el índice poblacional de células T citotóxicas después de la sexta inmunización ($p > 0,05$ ANOVA de una vía / Tuckey) (Figura 4 paneles E, F). Los grupos tanto de pre-expuestos a morfina como de no pre-expuestos, Toxina tetánica (TT)+Alúmina (Alum) y Alúmina (Alum) no presentaron diferencia significativa con respecto del control (Datos no mostrados).

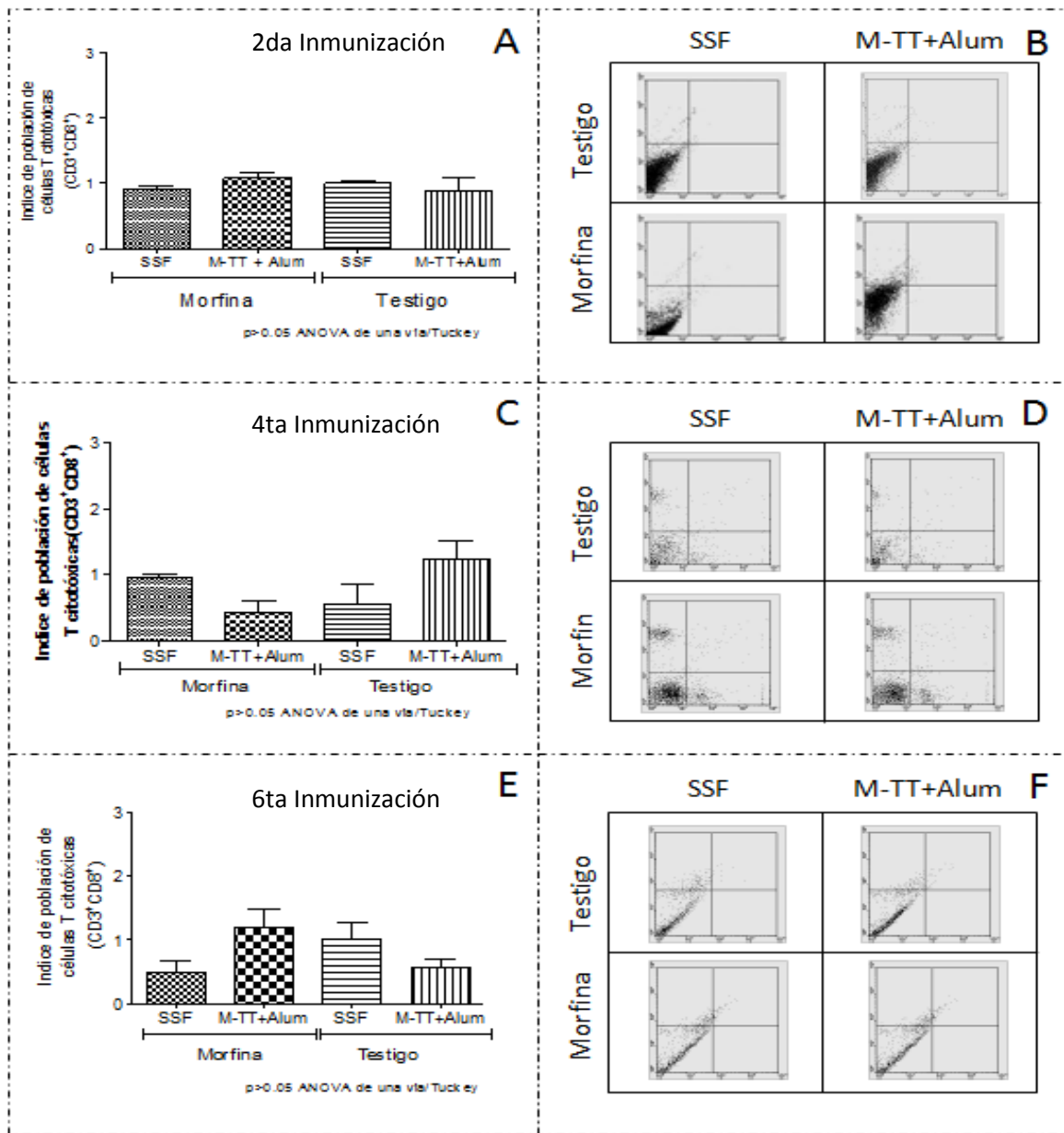


Figura 4 Índice de población de células T citotóxicas ($CD3^+ CD8^+$) provenientes de bazo de ratones sometidos a un esquema de inmunización múltiple con la vacuna M-TT. Ratones hembra cepa Balb/c previamente tratados con dosis inmudepresoras de morfina, fueron inmunizados semanalmente con la vacuna M-TT, durante 6 semanas, para inducir inmunidad contra morfina, se tomaron muestras de bazo una semana después de la segunda, cuarta y sexta inmunización respectivamente y mediante citometría de flujo se obtuvo el índice de población de células T citotóxicas. La población de células T citotóxicas de ratones tanto pre-expuestos a morfina e inmunizados como no pre-expuestos e inmunizados no presentaron una diferencia a lo largo de las tres reinmunizaciones analizadas (Panel A-B, C-D, E-F) ($p > 0,05$ ANOVA de una vía/ Tuckey).

En cuanto a los índices en la población de las células T cooperadoras (Th) no se presentaron diferencias luego de la segunda inmunización (Figura 5 paneles A, B) y cuarta inmunización (Figura 5 paneles C, D) ($p > 0,05$, prueba de ANOVA de una vía/Tuckey), pero después de la sexta inmunización existe diferencias significativas entre los ratones inmunizados y ratones no inmunizados, sin importar si los ratones fueron expuestos a la morfina o no (Figura 5 paneles E, F) ($p = 0,03$ ANOVA de una vía/Tuckey).

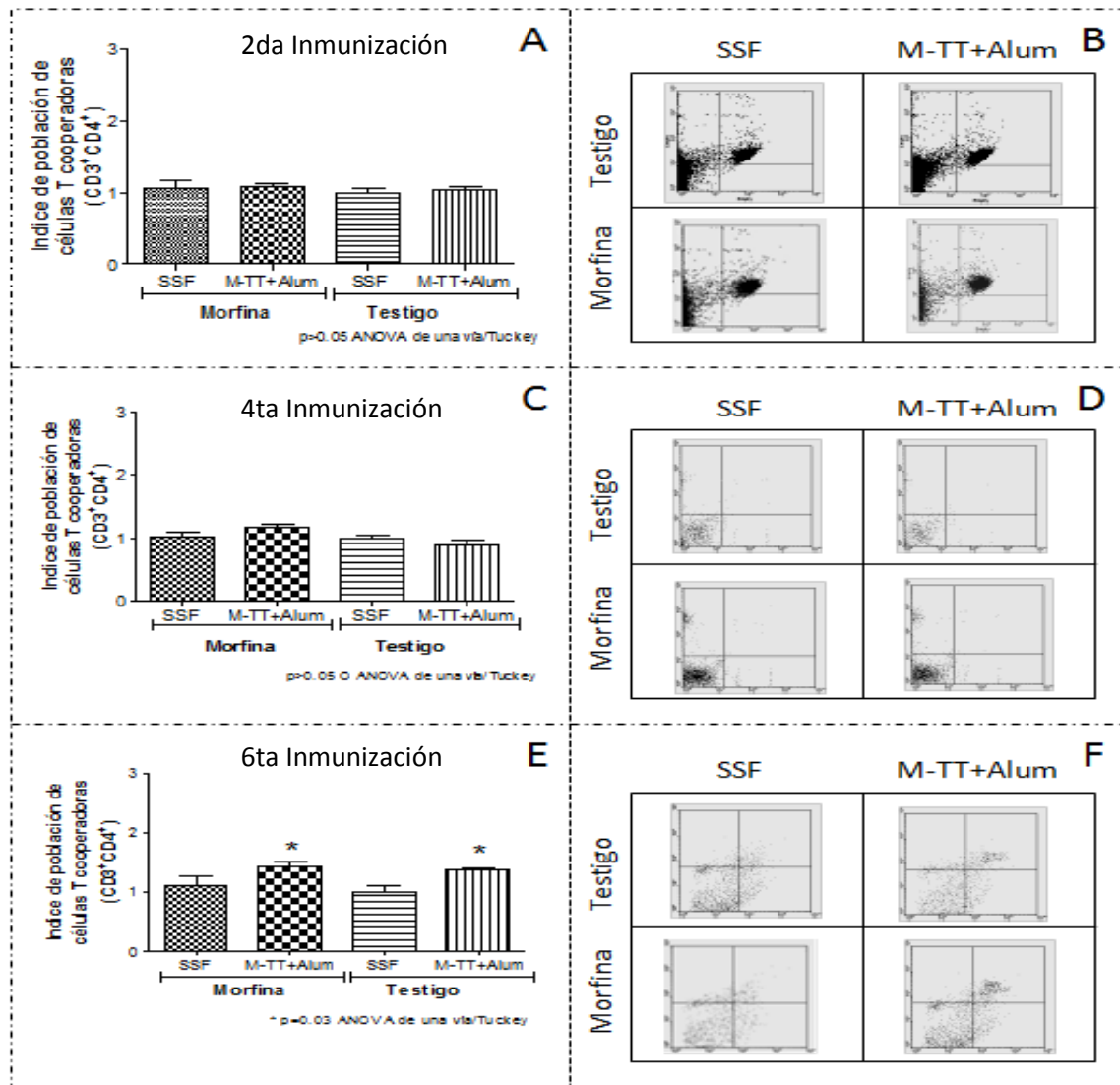


Figura 5 Índice de población de células T cooperadoras (CD3⁺ CD4⁺) provenientes de bazo de ratones sometidos a un esquema de inmunización múltiple con la vacuna M-TT. Ratones hembra cepa Balb/c previamente tratados con dosis inmudepresoras de morfina, fueron inmunizados semanalmente con la vacuna M-TT, durante 6 semanas, para inducir inmunidad contra morfina, se tomaron muestras de bazo una semana después de la segunda, cuarta y sexta inmunización respectivamente y mediante citometría de flujo se obtuvo el índice de población de células T cooperadoras. El índice de población de las células T cooperadoras no presentó diferencia en los grupos inmunizados ya sea pre-expuestos o no a la morfina para la segunda inmunización (Panel A-B), sin embargo para la cuarta inmunización el índice de población fue mayor en los ratones inmunizados con o sin morfina y sexta reinmunización esta diferencia fue mayor. (Panel C-D) (ANOVA de una vía, *p* > 0,05) y (Panel E-F) (ANOVA de una vía/Tuckey, *p* = 0,03).

El análisis de los índices de población de las células B activadas (Figura 6) no mostró diferencias significativas después de la segunda, cuarta y sexta inmunización (ANOVA de una vía/ Tuckey, $p > 0,05$,). Los grupos tanto de pre-expuestos a morfina como de no pre-expuestos, Toxina tetánica (TT)+Alúmina (Alum) y Alúmina (Alum) no presentaron diferencia significativa con respecto del control (Datos no mostrados).

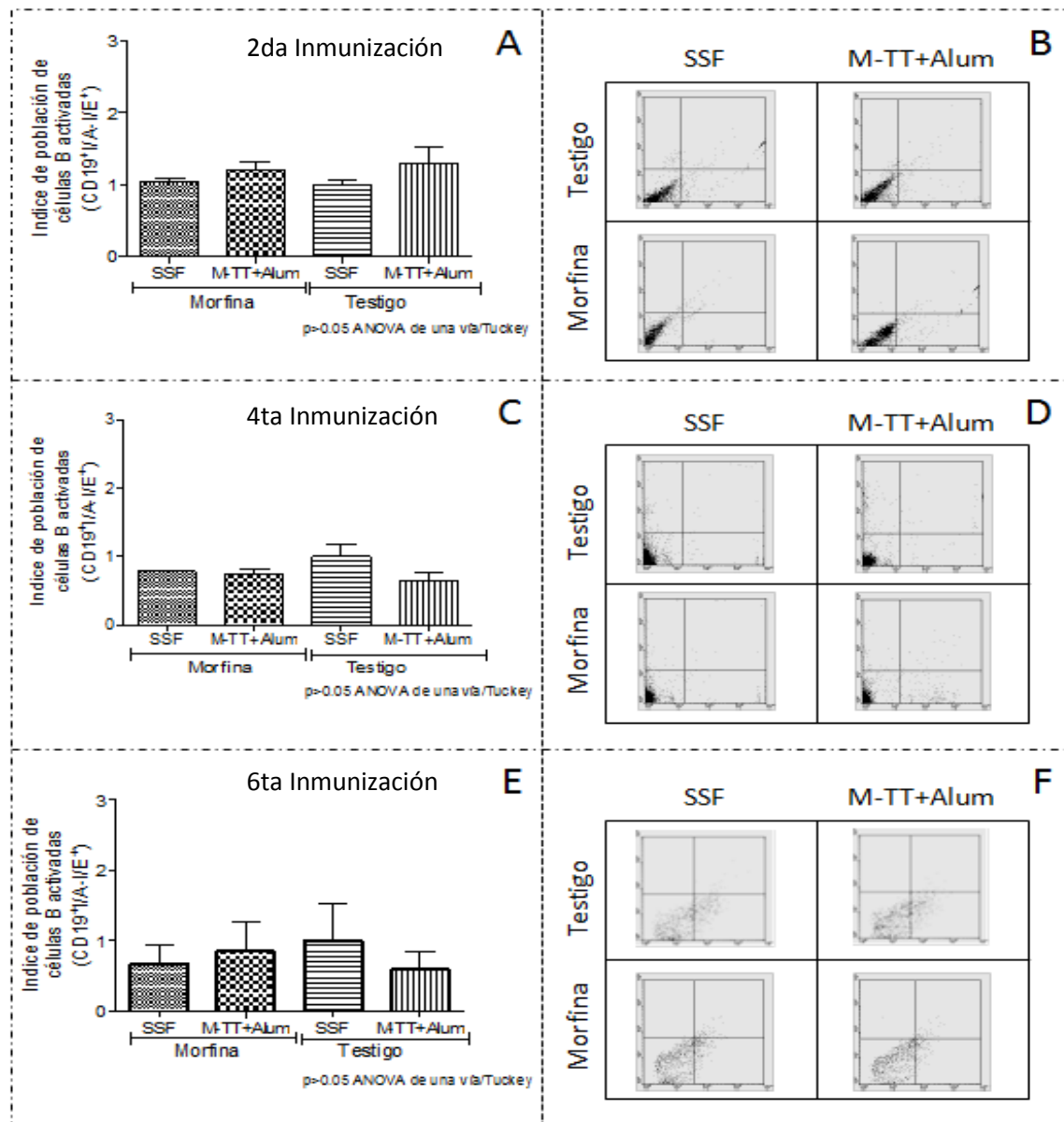


Figura 6 Índice de población de células B activadas (CD19⁺I/A-I/E⁺) provenientes de bazo de ratones sometidos a un esquema de inmunización múltiple con la vacuna M-TT. Ratones hembra cepa Balb/c previamente tratados con dosis inmudepresoras de morfina, fueron inmunizados semanalmente con la vacuna M-TT, durante 6 semanas, para inducir inmunidad contra morfina, se tomaron muestras de bazo una semana después de la segunda, cuarta y sexta inmunización respectivamente y mediante citometría de flujo se obtuvo el índice de población de células B activadas. Las inmunizaciones con la vacuna M-TT en los grupos tanto pre-expuestos o no a la morfina no presentaron un efecto directo sobre la población de células B activadas a lo largo de las tres reinmunizaciones (Panel A-B, C-D, E-F) (ANOVA de una vía/Tuckey, $p > 0,05$).

El índice poblacional de las células B de memoria mostró una diferencia significativa después de la sexta inmunización (Figura 7 paneles E, F), lo que se sugiere que la vacuna M-TT genera respuesta inmunitaria de memoria. Los grupos tanto de pre-expuestos a morfina como de no pre-expuestos, Toxina tetánica (TT)+Alúmina (Alum) y Alúmina (Alum) no presentaron diferencia significativa con respecto del control (Datos no mostrados).

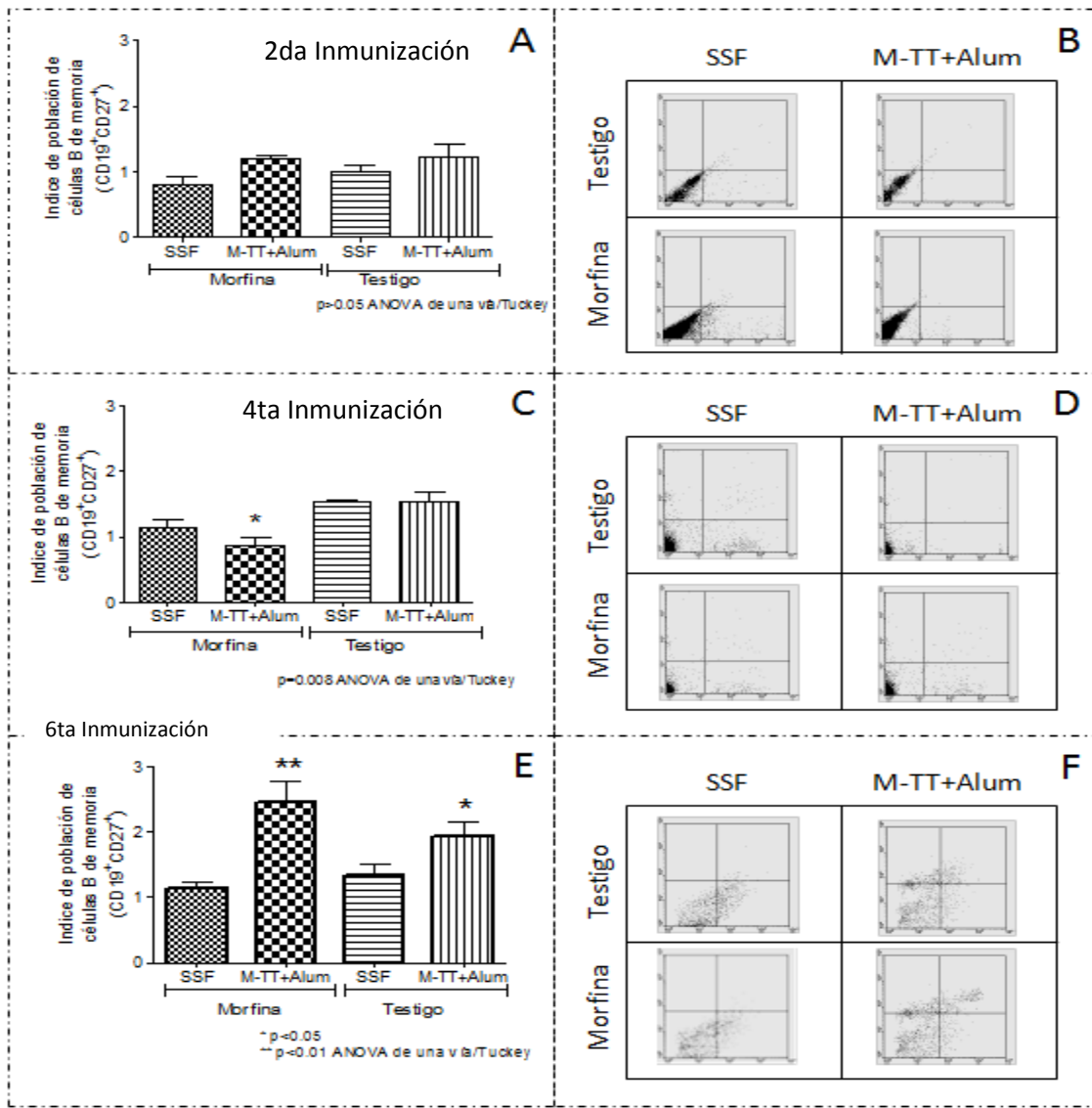


Figura 7 Índice de población de células B de memoria (CD19⁺ CD27⁺) provenientes de bazo de ratones sometidos a un esquema de inmunización múltiple con la vacuna M-TT. Ratones hembra cepa Balb/c previamente tratados con dosis inudepresoras de morfina, fueron inmunizados semanalmente con la vacuna M-TT, durante 6 semanas, para inducir inmunidad contra morfina, se tomaron muestras de bazo una semana después de la segunda, cuarta y sexta inmunización respectivamente y mediante citometría de flujo se obtuvo el índice de población de células B de memoria. El índice de población fue mayor desde la segunda inmunización (Panel A-B) tanto en los grupos de ratones inmunizados pre-expuestos como no pre-expuestos a morfina, para la sexta reinmunización (Panel E-D), persistió esta diferencia en los ratones inmunizados no pre-expuestos (ANOVA de una vía/Tukey, p < 0,05) y fue claramente mayor en los ratones pre-expuestos a morfina e inmunizados (ANOVA de una vía/Tukey, p < 0,01).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos proporcionan evidencia sobre los efectos posteriores a la aplicación del opioide morfina, en un tratamiento crónico para un modelo murino, con el fin de provocar inmunodepresión y analizar los probables efectos en estos animales y los que únicamente se sometieron a la inmunización de la vacuna M-TT, en cuanto a la eficacia y acción protectora que provee el tratamiento.

Diversos estudios científicos tanto en modelos animales como en el monitoreo clínico de pacientes que reciben este tipo de terapia, revelan efectos que pueden llegar a alterar la función normal de varios sistemas en el organismo, tales como el sistema gastrointestinal (provocando constipación u obstrucción intestinal), el sistema respiratorio (presentando apnea, sueño, ataxia, hipoxemia y retención del dióxido de carbono, depresión respiratoria, bradicardia e hipotensión), efectos sobre el sistema cardiovascular (aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares como infarto al miocardio, insuficiencia cardíaca), efectos sobre el sistema nervioso central (causando neurotoxicidad y sedación que puede conducir a depresión respiratoria y apnea) y el sistema endocrino (mostrando un hiperfuncionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, que afecta la liberación de hormonas por parte de la hipófisis anterior, por ejemplo, la hormona del crecimiento, la prolactina, la hormona estimuladora de la tiroides, la hormona

adrenocorticotrópica y disminuyen el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal) (Lin H, 2012; Hjalte F et al., 2010; Yue HJ et al., 2010; Walker JM et al., 2007; Solomon DH et al., 2010; Dennison C et al., 2005; Kwong WJ et al., 2010; Mogri M et al., 2009).

Sin embargo, el efecto de principal interés para esta investigación es la inmunodepresión, que se ha reportado y las posibles alteraciones de ésta en la aplicación de la vacuna M-TT. Puesto que los opioides pueden actuar tanto directamente como indirectamente sobre el organismo, ya sea uniéndose a los receptores μ -opioide que se han observado sobre las células inmunológicas (Mehrishi y Mills, 1983) o ejerciendo efectos adversos sobre los ejes hormonales (Freier and Fuchs, 1994). Por tanto, los opioides pueden mediar acciones, que de manera general, provocan una inmunodepresión, lo cual implica un complejo cuadro de procesos, que aún no se conoce completamente, no obstante, la administración tanto crónica como aguda tiene efectos inhibitorios sobre la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral reportados (Welters ID. Et al., 2003; Vallejo R et al., 2004; Eisenstein TK et a., 2006; Zou W et al., 2007; Roy et al., 2006, 2011).

Existe un amplio repertorio de reportes que detallan los efectos inmunomodulatorios de la morfina sobre los componentes del sistema inmune, algunos de ellos se enfocan en la inducción de la morfina hacia un decremento en el peso de órganos linfoides como son bazo y timo,

que conducen principalmente a un daño en la función de células T (Bryant et al., 1987; Bryant et al., 1991). Además se ve alterada la expresión de citocinas por lo que se suprime la apoptosis de las células T, por lo que posiblemente puede estar afectando la selección negativa de estas células y se modifica su diferenciación (Roy et al., 2001; Wang et al., 2001), lo cual es consistente con investigaciones que sugieren el papel del receptor δ -opioide (DOR) en estos procesos, los cuales coinciden con estudios sobre el receptor κ -opioide (KOR) que muestran que el desarrollo de la línea celular T DPK ($CD4^+/CD8^+$ dobles positivas, el linaje $CD4^+ CD8^-$) se inhibe luego del tratamiento con un agonista KOR (Guan et al., 1998).

En este protocolo, se evaluó a las poblaciones de células T inmaduras, citotóxicas y cooperadoras. En los ratones que recibieron morfina de manera crónica se observó un incremento en el índice poblacional de las células T inmaduras, mientras que las células $CD4^+$, y las células $CD8^+$ no mostraron diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 1 paneles A, B, C, D, E, F) en éstos se observa un índice poblacional similar al control para ambas, marcando, pues una acción directa sobre los primeros estadios de las células T, que posiblemente puede deberse al efecto inmunodepresor en el desarrollo de las células inmaduras, provocando su arresto en este estadio, se podría observar un efecto en las poblaciones tanto de células T citotóxicas como cooperadoras si se

llevara a cabo una exposición a morfina por un lapso de tiempo aún mayor, es decir de años, por lo que se tendría que ajustar a un modelo que satisficiera este requisito, sin embargo, el modelo murino reveló una clara alteración sobre las células T inmaduras. Diversas investigaciones han reportado citocinas que posiblemente pudieran actuar en este arresto. En ratones deficientes de factor de crecimiento tumoral (TGF- β) se reducen las células T CD4⁺ y CD8⁺ mientras que se incrementan tanto las células T inmaduras en desarrollo como las células T maduras CD4⁺ (Boivin et al., 1995).

También se ha observado que la secreción de IL-1 β y TNF- α aumenta la expresión del receptor μ -opioide (MOR) y que su combinación puede regular fuertemente el desarrollo de las células T inmaduras (Zlotnik et al., 1995; Zuniga-Pflucker et al., 1995).

Finalmente se ha hipotetizado que la inducción de la expresión de MOR fue promovida por la IL-7, una citocina que tiene la habilidad de promover la diferenciación, crecimiento y supervivencia de las células T inmaduras (Ma A. et al., 2006). De hecho, la IL-7 es requerida para el desarrollo de las células T en estadios más tempranos de desarrollo y en el paso a timocito CD4⁺/CD8⁺ el receptor de IL-7 es bloqueado (Nakajima et al., 2000).

También se evaluaron los índices poblacionales de células B, específicamente de las células B activadas y las células B de memoria,

en ambos casos existió un leve aumento en las poblaciones de estas células por parte de los grupos pre-expuestos a morfina, lo que es consistente con reportes sobre la existencia de alteraciones en la principal actividad de estas células inmunológicas, la producción de anticuerpos, que se analizará más adelante. Sin embargo, debemos considerar que la formación de una respuesta de anticuerpos requiere la interacción de macrófagos, células T y células B, por tanto, la posible disminución de la capacidad para producir los anticuerpos específicos no necesariamente significa que el efecto de la morfina es directa sobre las células B (Figura 1 paneles G, H y I, J)

En la respuesta humoral analizada por medio de pruebas de ELISA luego de la inmunización con la vacuna M-TT, se presentó un aumento progresivo en el título de anticuerpos y posterior a haberse aplicado los refuerzos, se continuó observando esta tendencia a aumentar, tanto en los grupos inmunodeprimidos como en los que no lo fueron, lo que podemos explicar ya que se trata de una respuesta inmunitaria específica para la vacuna M-TT, por lo que tanto los ratones pre-expuestos como no pre-expuestos habiendo sido inmunizados, presentaron un título similar, tal como se esperaba.

Un punto primordial en este tratamiento contra la adicción a morfina y algunos de sus metabolitos, basado en la inmunización con la vacuna M-TT, es que los títulos de anticuerpos que se obtuvieron fueron a la alta

durante un lapso significativo de tiempo (Figura 2 paneles A, B) observable desde la cuarta inmunización, lo cual coincide con estudios que se han publicado anteriormente en donde se han usado modelos que no han sido inmunodeprimidos y se ha obtenido una inmunización eficiente y duradera en los sujetos de estudio (Antón, 2006). De acuerdo con lo anterior, la fase de inmunización al haber presentado el aumento en el título de anticuerpos nos prueba que aun induciendo la inmunodepresión de los grupos pre-expuestos a morfina, la vacuna M-TT confiere inmunidad sostenida, presentando un pico máximo de anticuerpos para la sexta toma de muestra y sosteniendo el título máximo de anticuerpos durante al menos 4 meses en el modelo murino, lo cual demuestra la eficacia del tratamiento, sin embargo, luego de este lapso, se presentó su disminución dependiente del tiempo, resultando en el título más bajo de anticuerpos luego de 150 días de inmunización, un lapso significativo de tiempo; a los 210 días posteriores a la inmunización el título de anticuerpos fue similar en todos los grupos. Es primordial tener en cuenta que en la respuesta de anticuerpos anti-morfina causada por la administración de la vacuna M-TT puede estar interviniendo importantemente el uso de la proteína acarreadora, altamente inmunogénica (toxóide tetánico) así como la naturaleza y longitud del brazo espaciador a través del cual la morfina está hapténizada y adquiere suficiente espacio libre en el conjugado, para así

convertirse en altamente antigénica e inmunogénica para el sistema inmunológico.

La respuesta celular a la vacuna M-TT por parte de los ratones pre-expuestos a morfina, se reportó en función de los grupos pre-expuesto y no pre-expuesto, los cuales fueron inmunizados con la vacuna M-TT y cada uno contó con sus respectivos controles de solución salina, que posterior a la obtención del bazo, llevada a cabo siete días después de la segunda, cuarta y sexta inmunización, fueron analizados en términos de índice de población celular.

En la Figura 3 paneles A y B en donde se muestra el índice de población de las células T inmaduras, luego de haber recibido la segunda inmunización con vacuna M-TT, se observa disminuido éste índice en comparación tanto con su control de solución salina como con los reportados por el proceso de inmunodepresión por morfina al final de la administración de este opioide en la fase del tratamiento (pre-exposición a Morfina cada 12 horas vía IP), proceso en el que posiblemente puede estar involucrada la estructura química de la vacuna M-TT.

Considerando que la estructura química de la vacuna M-TT está conformada básicamente de la hapténización del derivado morfina- β -hemisuccinato al toxoide tetánico, el cual funge como proteína acarreadora, como ya se mencionó, existen reportes en los que este toxoide presenta una acción inmunológica importante (Rowe J, 2005),

en la que tiene la capacidad de estimular a las células T potenciando la inmunogenicidad del antígeno de naturaleza polisacárido, además otros artículos han reportado análisis por citometría de flujo utilizando un marcador de activación de linfocitos T, CD25⁺, con el cual se ha detectado una respuesta específica al toxoide tetánico, siendo notable la presencia tanto de subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos como de los linfocitos T cooperadores, dominando la identificación de subtipos de células T cooperadoras activadas y produciendo memoria. En cuanto a las células T cooperadoras, la respuesta primaria que se presenta marca la polarización hacia Th1, mientras que para la respuesta secundaria presenta un aumento hacia Th2. Para la cuarta inmunización, el índice de población de las células T inmaduras, no presenta cambios, lo cual también se observa para la sexta inmunización, por lo que posiblemente la diferenciación de las células involucradas en la respuesta a morfina no está siendo afectada.

En la figura 4, paneles A y B se presenta el índice de población de las células T citotóxicas, como se observa, no existe una diferencia significativa entre los ratones pre-expuestos y los controles, por lo que posiblemente la respuesta inmunológica no se caracteriza por el tipo de respuesta citotóxica. Sin embargo, esto no es consistente con lo reportado en una administración aguda ya que la morfina afecta la función citolítica de estos linfocitos y su generación, posiblemente por

acción directa sobre estas células (Roy et al., 2011), por medio de los receptores a opioides presentes en su superficie, dando lugar a un efecto supresor marcado para las células citotóxicas peritoneales en comparación con los controles. El tratamiento crónico, como el que se realizó, descarta la tolerancia farmacológica a la morfina por parte de la respuesta inmunitaria, en particular de las células citotóxicas, ya que esta se evitó por medio del aumento en las dosis de manera escalonada (Carpenter G, 1995).

Los efectos inmunológicos presentados por la administración de la vacuna M-TT, en las células T citotóxicas, por tanto, no muestran tener un efecto relacionado con la eficacia que la vacuna M-TT ha presentado (Antón, 2009). El índice de proliferación de estas células para la cuarta y sexta inmunización (Figura 4 paneles C, D y E, F), de manera similar a la anterior figura, no muestra un efecto directo por parte de la vacuna M-TT, tanto en animales inmunodeprimidos por la pre-exposición a morfina como en los controles. La respuesta inmunológica que tiene la morfina sobre el organismo y la que está buscando tener la vacuna M-TT, es una polarización hacia los linfocitos T cooperadores, ya que por medio de esta se logra la presentación de antígeno, y la posterior producción de anticuerpos por lo que probablemente es por ello que no se ha visto afectada la población de linfocitos T citotóxicos.

El tratamiento crónico con morfina ha mostrado afectar la función de las células T, las cuales juegan un papel crucial en la defensa del organismo, sin embargo, el control de la diferenciación de estas células es una función de una variedad de factores, entre los que destacan las citocinas. Una típica respuesta Th1 incluye citocinas como son el IFN- γ , TNF- α e IL-2; por su parte la respuesta Th2 incluye IL-4, IL-6 e IL-10 (Murphy et al., 2000; Mossman and Coffman, 1989; Muraille and Leo, 1998). Mientras que la IL-4 es la principal citocina que dirige a las células T CD4⁺ (Th0) a su diferenciación a Th2. Trabajos previos han demostrado que el tratamiento crónico con morfina inhibe las citocinas que intervienen en la respuesta Th1 y aumenta las Th2 (Wang et al., 2003; Greenelch et al., 2005; Qian et al., 2005; Roy et al., 2005; Borner et al., 2009). De acuerdo a lo anterior, podemos esperar que los ratones pre-expuestos a morfina presenten una porción de población de linfocitos T CD4⁺ diferenciados a Th2 efectoras.

Luego de la inmunización con la vacuna M-TT el índice de población de células T cooperadoras provenientes de ratones pre-expuestos a morfina no presentó una diferencia significativa, por lo que podemos considerar que no se está teniendo un efecto sobre su respuesta inmunitaria, lo que podría indicarnos una actividad polarizada hacia una respuesta Th2, debido a que la vacuna M-TT ha presentado una marcada respuesta en el título de anticuerpos anti-morfina que logra, en la cual, como ya

mencionamos está jugando un papel primordial la proteína acarreadora, toxoide tetánico, pudiendo estar involucrado en inducir una respuesta Th2 (Figura 5 paneles A, B y C, D). Del índice de población en las células T cooperadoras mayor para los grupos que recibieron la inmunización con la vacuna M-TT, pre-expuestos o no a la morfina, podemos inferir que está existiendo un efecto polarizado hacia esta respuesta, así pues, no se observa efecto inmunodepresor, el cual posiblemente se anuló con la producción de anticuerpos anti-morfina (Figura 5 paneles E, F)

Por tanto, podemos decir que la vacuna M-TT produce una respuesta inmunológica polarizada hacia células efectoras T cooperadoras.

No se presentó una diferencia significativa en los índices de población de las células B activadas ($CD19^+I/A-I/E^+$), lo que puede deberse a que se trataron de muestras posteriores a la inmunización con la vacuna M-TT.

En los animales pre-expuestos posiblemente existe un efecto de la vacuna, pues como se ha reportado (Hilburger ME, 1997; Lysle DT, 1993), la morfina afecta la inmunidad mediada por los linfocitos B así como en su producción de anticuerpos, mostrando la reducción en la actividad proliferativa de células B tanto esplénicas como de nodos linfáticos, además puede inhibir a la IL-4 y con ello reduce la expresión en la superficie celular de las Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase II (MHC II) especialmente en las células B,

pudiendo perjudicar con ello, la proliferación y expansión de las células T, por lo que se incrementaría la susceptibilidad de los organismos expuestos, sin embargo, estos efectos no se reflejan en los índices de población que se presentan (Figura 6 paneles A, B; C, D y E, F). Con respecto a la activación de las células B hacia células productoras de anticuerpos específicos a morfina, aun cuando no existió un aumento en la población de las células B activadas, si se presentó un título de anticuerpos significativo, por lo que podemos inferir no hay una relación dependiente del número de células B activadas y el título de anticuerpos que se puede presentar (Figura 2 paneles A y B)

Respecto a los índices de población de las células B de memoria ($CD19^+$ $CD27^+$) resultantes luego de la segunda y cuarta inmunización, no se presentó un cambio significativo, sin embargo, para la sexta inmunización, estos índices muestran diferencia significativa para los grupos que fueron inmunizados con la vacuna M-TT en comparación con los controles, lo cual es consistente con lo reportado anteriormente (Antón, 2006), es decir, posterior al descenso en el título de anticuerpos, en un protocolo anterior se presentó un rápido recobramiento en el nivel máximo del título observado en los días subsecuentes al re-estímulo, estos datos confirman la selectividad de la vacuna M-TT para inducir memoria inmunológica a este opioide, el cual como se observa, apareció semanas después de iniciado el protocolo

(Figura 7 paneles A, B; C, D y E, F). Un punto clave es que los anticuerpos generados después de la inmunización con la vacuna M-TT no presentan la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que tampoco pueden presentar efectos secundarios a nivel neuronal.

CONCLUSIONES

1. La morfina aplicada en dosis escalonadas a ratones, produce inmunodepresión por arresto celular de la subpoblación de células T inmaduras ($CD4^+CD8^+$).
2. A través del tratamiento con la vacuna M-TT, se favoreció la respuesta inmunológica contra morfina, en magnitud similar tanto en los ratones inmunodeprimidos por el consumo crónico de morfina, como en los ratones naïve, reflejando la capacidad inmunogénica de la vacuna M-TT.
3. El tratamiento con la vacuna M-TT revirtió la inmunodepresión sobre las células T inmaduras que se había presentado.
4. El efecto de la inmunización sobre las poblaciones celulares de linfocitos T y B mostró una polarización hacia la respuesta de células T cooperadoras.

PERSPECTIVAS

Con el presente trabajo se realizó la evaluación de la respuesta inmunitaria de ratones inmunodeprimidos por la exposición previa a morfina, los cuales fueron sometidos a un tratamiento con la vacuna M-TT, por medio del cual se obtuvo un título de anticuerpos significativo y una respuesta poblacionalmente polarizada hacia linfocitos T cooperadores (CD4⁺). Por lo tanto las perspectivas de este trabajo consisten en los siguientes puntos:

1. Esclarecer el fenotipo de la respuesta inmunitaria que se está llevando a cabo a lo largo del tratamiento con la vacuna M-TT.
2. Planteamos realizar la cuantificación de citocinas características de la respuesta Th1 como son el IFN- γ , TNF- α e IL-2 y las citocinas de la respuesta Th2 que incluye IL-4, IL-6 e IL-10, por medio de ensayos inmunológicos de ELISA.
3. Actualmente, la vacuna M-TT se encuentra en estudios para evaluar su bioseguridad, los cuales se están realizando e en esta facultad.
4. Debido a la eficacia que la vacuna M-TT ha presentado en protocolos anteriores, se tiene programado el desarrollo de programas clínicos para evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna M-TT en voluntarios humanos y dado que los anticuerpos generados posteriores a la inmunización con M-TT no

pueden cruzar la barrera hematoencefálica, no se espera que los efectos que tenga el tratamiento sean psicoactivos; además, para el caso de pacientes que presentan la adicción, su uso se realizará en combinación con terapias previas, que podrían ser útiles para prolongar la abstinencia y el desarrollo de efectos secundarios adversos que se ha reportado por el uso crónicos de estos agentes farmacológicos clásicos (Van den Brink W, 2003; Sevarino AK et al., 2000; Kreek MJ., 2000; O'Brien CP., 1997).

BIBLIOGRAFÍA

1. Encuesta Nacional de Adicciones 2008 (ENA 2008), Instituto Nacional de Salud Pública, 1er Edición, México.
2. Anton B, et al. (2008) Endomorphin 1 and endomorphin 2 suppress in vitro antibody formation at ultra-low concentrations: anti-peptide antibodies but not opioid antagonists block the activity. *Brain Behav Immun* 22(6):824-32
3. Eisenstein TK (2011) Opioids and the immune system: what is their mechanism of action?. *Br J Pharmacol* December 164(7): 1826–1828
4. O'Brien CP, et al. (2001) Drug Abuse, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill, New York, pp. 621-642, 10th ed.
5. Kamendulis LM, et al. (1996) Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxy lesterases. *J Pharmacol Exp Ther* 279:713–717
6. Hutto C, et al. (1997) Dosage choices of rats for morphine, for heroin, and between morphine and heroin. *Pharmacol Biochem Behav* 58(1): 133-140
7. Halliday AJ, et al. (1999) Brain region-specific studies of the excitatory behavioral effects of morphine-3-glucuronide. *Life Sci*. 65:225–236

8. Selley DE, et al. (2001) mu Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. *Biochem Pharmacol* 62: 447-455
9. Kosten RT, et al. (2003) Therapeutic vaccines for substance dependence. *Expert Rev Vaccines* 1(3):89-97
10. Sevarino KA, et al. (2000) Neurobiological adaptations to psychostimulants and opiates as a basis of treatment development. *Ann N Y Acad Sci.* 909:51-87
11. Ghodse H. (1995) Drugs of abuse and dependence. In: *Drugs and Addictive Behaviour, a guide to treatment.* Blackwell Science Ltd, ed., Oxford, UK, pp. 72-119
12. Koob GF. (2000) Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. *Ann N Y Acad Sci.* 909:170-85.
13. Stein C, et al. (2003) Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med*, 9:1003-1008
14. Stein C, et al. (2009) Opioids and sensory nerves. In *Pharmacology of Sensory Nerves, Handbook of Experimental Pharmacology.* Edited by Canning BJ, Spina D. Springer, Heidelberg.
15. Singhal P, et al. (2002) Opiates promote T cell apoptosis through JNK and caspase pathway. *Adv Exp Med Biol* 493:127-135

16. Singhal PC, et al. (1999) Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J Leukoc Biol* 66:650-658
17. Mellon RD, et al. (1998) Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol* 83:19-28
18. Flores LR, et al. (1996) Potential role of the autonomic nervous system in the immunosuppressive effects of acute morphine administration. *Eur J Pharmacol* 318:437-446
19. McCarthy L, et al. (2001) Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend* 62:111-123
20. Walters I (2003) Opioids and immunosuppression: clinical relevance. *Anaesthetist* 52:442-452
21. Bhaskaran M, et al. (2001) Morphine-induced degradation of the host defense barrier: Role of macrophage injury. *J Infect Dis* 184:1524-1531
22. Rahim RT, et al. (2004) Paradoxes of immunosuppression in mouse models of withdrawal. *J Neuroimmunol.* 147(1-2):114-20
23. Wang J, et al. (2001) Morphine modulates lymph node-derived T lymphocyte function: role of caspase-3, -8, and nitric oxide. *J Leukoc Biol.* 70(4):527-36

24. Nelson CJ, et al. (1997) Comparison of the time course of morphine's analgesic and immunologic effects. *Anesth Analg.* 85(3):620-6
25. Grilly DM (2002) Opioids (narcotics) and their antagonists. In: *Drugs and human behaviour*, 4th ed. pp.238- 262
26. Stotts AL, et al. (2009) Opioid dependence treatment: options in pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 10(11):1727–40
27. Maxwell S, et al. (2002) Optimizing long-term response to methadone maintenance treatment: a 152-week follow-up using higher-dose methadone. *J Addict Dis.* 21(3):1–12
28. Kreek MJ, et al. (2010) Pharmacotherapy in the treatment of addiction: methadone. *J Addict Dis* 29(2):200–16
29. Minozzi S, et al. (2011) Oral naltrexone maintenance treatment for opioid dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* 16(2):CD001333
30. Sullivan MA, et al. (2013), Naltrexone treatment for opioid dependence: does its effectiveness depend on testing the blockade?. *Drug Alcohol Depend.* 133(1):80-5
31. Berkowitz B, et al. (1972) Evidence for active immunity to morphine in mice. *Science* 22(67): 1290–2. 178
32. Bonese KF, et al. (1974) Changes in heroin selfadministration by a rhesus monkey after morphine immunisation. *Nature* 20(5485):708–10. 252

33. Hieda Y, et al. (1997) Active immunization alters the plasma nicotine concentration in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(3):1076–1081
34. Carrera MR, et al. (2004) Investigations using immunization to attenuate the psychoactive effects of nicotine. *Bioorg Med Chem* 12(3):563–570
35. Sanderson SD, et al. (2003) Immunization to nicotine with a peptide-based vaccine composed of a conformationally biased agonist of C5a as a molecular adjuvant. *Int Immunopharmacol* 3(1):137–146
36. Abbas AK, et al. (2007) The immune system in defense and disease. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Philadelphia PA, USA: Saunders Elsevier 351-73
37. Anton B, et al. (2009) Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors, *Hum Vaccin.* 5(4):214-29
38. Falugi F, et al. (2001) Rationally designed strings of promiscuous CD4(+) T cell epitopes provide help to *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide: a model for new conjugate vaccines. *Eur J Immunol* 31:3816–3824

39. Bonese KF (1974) Changes in heroin self-administration by a rhesus monkey after morphine immunization. *Nature* 252: 708–710
40. Cerny T (2005) Anti-nicotine vaccination: where are we? *Recent Results Cancer Res* 166: 167–175
41. Keyler DE, et al. (2008) Enhanced immunogenicity of a bivalent nicotine vaccine. *Int Immunopharmacol* 8: 1589–1594
42. Moreno AY, et al. (2010) A critical evaluation of a nicotine vaccine within a self-administration behavioral model. *Mol Pharmacol* 7: 431–441
43. Duryee MJ, et al. (2009) Immune responses to methamphetamine by active immunization with peptide-based, molecular adjuvant-containing vaccines. *Vaccine* 27: 2981–2988
44. Gentry WB, et al. (2009) Development of active and passive human vaccines to treat methamphetamine addiction. *Hum Vaccin* 5: 206–213
45. Xu Y, et al. (2007) Antibody-catalyzed anaerobic destruction of methamphetamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3681–3686
46. Carrera MR, et al. (2000) Cocaine vaccines: antibody protection against relapse in a rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6202–6206

47. Haney M, et al. (2004) Therapeutic vaccines for substance dependence. *Expert Rev Vaccines* 3: 11–18
48. Kosten TR, et al. (2002) Human therapeutic cocaine vaccine: safety and immunogenicity. *Vaccine* 20: 1196–1204
49. Orson FM, et al. (2009) Vaccines for cocaine abuse. *Hum Vaccin* 5: 194–199
50. Bagasra O, et al. (1992) A potential vaccine for cocaine abuse prophylaxis. *Immunopharmacology* 23:173–179
51. Isomura S, et al. (2001) An immunotherapeutic program for the treatment of nicotine addiction: hapten design and synthesis. *J Org Chem* 66:4115–4121
52. Kantak KM (2003) Vaccines against drugs of abuse – a viable treatment option?. *Drugs* 63(4):341-352
53. Antón B, et al. (2006) A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents. *Vaccine* 24: 3232-3240
54. Lin EH, et al. (2012) A Review of Potential Adverse Effects of Long-Term Opioid Therapy: A Practitioner's Guide. *Prim Care Companion CNS Disord.* 14(3)
55. Hjalte F, et al. (2010) The direct and indirect costs of opioid-induced constipation. *J Pain Symptom Manage.* 40(5):696–703

56. Yue HJ, et al. (2010) Opioid medication and sleep-disordered breathing. *Med Clin North Am.* 94(3):435–446
57. Walker JM, et al. (2007) Chronic opioid use is a risk factor for the development of central sleep apnea and ataxic breathing. *J Clin Sleep Med.* 3(5):455–461
58. Solomon DH, et al. (2010) The comparative safety of analgesics in older adults with arthritis. *Arch Intern Med.* 170(22):1968–1976
59. Dennison C, et al. (2005) The health-related quality of life and economic burden of constipation. *Pharmacoeconomics.* 23(5):461–476
60. Kwong WJ, et al. (2010) Costs of gastrointestinal events after outpatient opioid treatment for non-cancer pain. *Ann Pharmacother.* 44(4):630–640
61. Mogri M, et al. (2009) Hypoxemia in patients on chronic opiate therapy with and without sleep apnea. *Sleep Breath.* 13(1):49–57
62. Mehrishi, et al. (1983). Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man. *Clin Immunol. Immunopathol.* 27, 240–249
63. Freier DO, et al. (1994) A mechanism of action for morphine-induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine-induced suppression of natural killer cell activity. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 270(3): 1127-I 133

64. Welters ID. (2003) Is immunomodulation by opioid drugs of clinical relevance?. *Curr Opin Anaesthesiol.* 16(5):509–13
65. Vallejo R, et al. (2004) Opioid therapy and immunosuppression: a review. *Am J Ther.* 11(5):354–65
66. Eisenstein TK, et al. (2006) Effects of opioid tolerance and withdrawal on the immune system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1(3):237–249
67. Zou W, et al. (2007) Intrathecal morphine suppresses immune function in rats with inflammatory-induced pain. *J Int Med Res.* 35(5):626–636
68. Roy S, et al. (2006) Modulation of immune function by morphine: implications for susceptibility to infection. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1: 77–89
69. Roy S, et al. (2011) Opioid drug abuse and modulation of immune function: consequences in the susceptibility to opportunistic infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 6, 442–465
70. Bryant HU, et al. (1987) Immunosuppressive effects of chronic morphine treatment in mice. *Life Sci.* 41, 1731–1738
71. Bryant HU, et al. (1991) Role of adrenal cortical activation in the immunosuppressive effects of chronic morphine treatment. *Endocrinology*, 128, 3253

72. Wang J, et al. (2001) Morphine modulates lymph node-derived T lymphocyte function: role of caspase-3, -8, and nitric oxide. *J Leukoc Biol.* 70:527–536
73. Carpenter GW et al. (1995) Acute exposure to morphine suppresses cytotoxic T-Lymphocyte activity. *Int J. Immunopharmac.*, Vol. 17, No. 12. pp. 1001-1006
74. Julie Rowe, et al. (2005) *Infection and immunity*, Vol. 73, No. 12, p. 8130–8135
75. Roy S, et al. (2005) Morphine induces CD4⁺ T cell IL-4 expression through an adenylyl cyclase mechanism independent of the protein kinase A pathway. *J Immunol*, 175(10):6361e7
76. Lysle DT et al. (1993) Morphine-induced alterations of immune status: dose dependency, compartment specificity and antagonism by naltrexone. *J Pharmacol Exp Ther.* 265(3):1071e8
77. Guan L, et al. (1998) Modulation of DPK cell function by the kappa opioid agonist U50, 488 H. *Adv Exp Med Biol* 437:125–136
78. Boivin GP et al. (1995) Onset and progression of pathological lesions in transforming growth factor- β 1-deficient mice. *Am J Pathol* 146:276–288
79. Ma A et al. (2006) Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Ann Rev Immunol* 24:657–679

80. Nakajima H et al. (2000) Role of the common cytokine receptor gamma chain (gammac) in thymocyte selection. *Immunol Today* 21:88–94
81. Zuniga-Pflucker JC et al. (1995) Requirement for TNF-alpha and IL-1 alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation. *Science* 268:1906–1909
82. Greenelch KM et al. (2005) Chronic morphine treatment promotes specific Th2 cytokine production by murine T cells in vitro via a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol.*175:4999–5005
83. Borner C et al. (2009) Mechanisms of opioid-mediated inhibition of human T cell receptor signaling. *J Immunol.* 183:882–889
84. Hilburger ME, et al. (1997) Morphine induces sepsis in mice. *J Infect Dis.* 176:183–188
85. Qian YN, et al. (2005) Effect of different concentrations of morphine and tramadol on the differentiation of human helper T cells in vitro. *Br J Anaesth.* 95:277
86. Moore TA, et al. (1995) T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors, *Blood.*, 86(5):1850-60
87. Murphy KM et al. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol.* 1(3):199-205

88. Mosmann TR, et al. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7:145-73
89. Muraille and Leo (1998) Revisiting the Th1/Th2 paradigm., *Scand J Immunol.* 47(1):1-9
90. Wang LD, et al. (2003) B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology.* 110(4):411-20
91. Roy S. et al. (2004) Chronic morphine treatment differentiates T helper cells to Th2 effector cells by modulating transcription factors GATA 3 and T-bet. *Journal of Neuroimmunology*, 147: 1-2: 78-81
92. Sevarino AK, et al. (2000) Neurobiological adaptations to psychostimulants and opiates as a basis of treatment development. *Ann N Y Acad Sci* 90:51-87
93. Kreek MJ. (2000) Methadone-related opioid agonist pharmacotherapy for heroin addiction: history, recent molecular and neurochemical research and future mainstream medicine. *Ann N Y Acad Sci*, 909:186-216
94. O'Brien CP. (1997) A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science*; 278(5335):66-70
95. Van den Brink W, et al. (2003) Pharmacological treatments for heroin and cocaine addiction. *Eur Neuropsychopharmacol*, 13(6):476-87

96. Alonzo NC, et al. (2003) Antagonism of N-methyl-D-aspartate receptors reduces the vulnerability of the immune system to stress after chronic morphine. *J Pharmacol Exp Ther.* 307(2):793-800.

ANEXO 1

Tabla 1 Grupos experimentales

Grupos	
Pre-expuestos a Morfina	No pre-expuestos a Morfina
M-TT (n=16)	M-TT (n=16)
Toxoide tetánico (TT)+Alúmina (Alum) (n=16)	Toxoide tetánico (TT)+Alúmina (Alum) (n=16)
Alúmina (Alum) (n=16)	Alúmina (Alum) (n=16)
Solución de salina fisiológica (SSF) (n=16)	Solución de salina fisiológica (SSF) (n=16)

ANEXO 2

Tabla 2 Modelo experimental

1. Pre- exposición a Morfina																		
cada 12 horas vía Intraperitoneal (IP)																		
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Dosis mg/kg	5		10		15		20		25		30		35		40		Abstinencia	
2. Inmunización con vacuna M-TT vía subcutánea																		
Día	18	19			25			32			39			46		53		60
Núm. de inmunización	1°*				2°			3°*			4°			5°*		6°		*

* El grupo control fue tratado con solución salina (cloruro de sodio al 0,9%). * Estas dosis fueron modificadas de lo reportado por Alonso y Bayer, 2003.

* n=128, c/grupo n=16 * Obtención de bazos (n=4) de cada grupo, para evaluación de población celular, por citometría de flujo.

ANEXO 3

Ensayos de ELISA:

Se monitoreo la respuesta del título de anticuerpo por ensayo ELISA de captura de anticuerpos en fase sólida de muestras de sueros provenientes de ratones vacunados.

- Bloqueo con Conjugado M-BSA de placas de ELISA
- Adición del anticuerpo en diluciones seriadas (x3) * Para limitar la detección a morfina y al antisuero.
- Se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Biotina
- El sistema de detección utilizado fue con el Kit VECTASTAIN Elite ABC Peroxidasa (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) y OPD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) *Como sustrato cromogénico, por lo que se detectaron las señales inmunes positivas.

*Los títulos se definieron como el inverso de la dilución de suero que dio 50% de la respuesta máxima. No se detectaron anticuerpos anti-morfina con la inmunización con alúmina y TT + alúmina (los datos no se muestran).

ELISA. El protocolo a seguir, tomado del Manual de Técnicas del Área de Inmunoensayos del Laboratorio de Neuroquímica y Neurobiología de Adicciones

Se divide en 3 días;

1er día. La fase sólida se descongela en baño María 40° C, durante 20 min se diluye en PBS 1X (pH 8-8.5).

Se incuba la placa durante una noche (12 horas).

2do. Día. La placa se lava 5 veces con buffer para ELISA, se colocan 100µl de buffer por pozo y se bloquea durante una hora. Se retira el buffer y se colocan las muestras por triplicado en diluciones (1:100; 1:1,000; 1:10,000; 1:100,000; 1:1'000,000) Se incuban toda la noche.

3er. Día. Se lavan las placas 5 veces con buffer de ELISA, se deja el último. Preparar el segundo anticuerpo (anti-IgG-ratón, JAKSON IMMUNORESEARCH LABS, 115-035-062) a una dilución 1:5000 (una placa necesita 10mL, se colocan 2µl en 10mL, es necesario cortar la punta a la mitad porque el anticuerpo diluido viene en base oleosa y no sube).

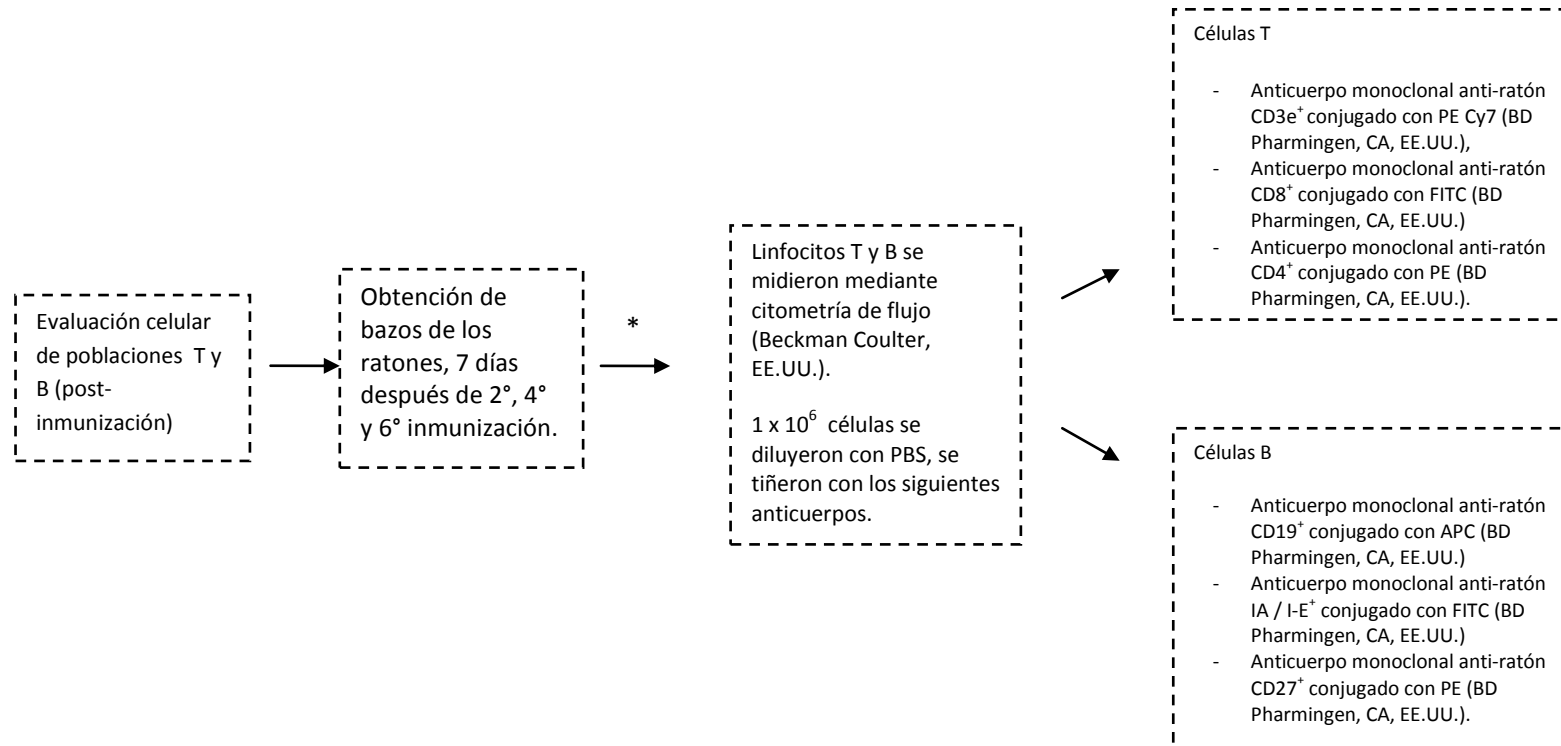
Se coloca el anticuerpo diluido 100 µl por pozo. Se incuba 2 hora, mientras se incuba, se prepara el ortofenildiamino (OPD), siempre con guantes porque es carcinogénico, 2 tabletas (una de envase plata y

otra de envase dorado) son para 20L de agua destilada, es necesario usar el vortex para disolver por completo. Es fotosensible, por lo que se debe mantener protegido de la luz. Se procede a lavar 5 veces con buffer de ELISA. Se coloca el OPD y se hacen lecturas con el espectrofotómetro a 490nm de longitud de onda, a los 20 y a los 60 minutos. Se hacen las curvas en Excell y la titulación con el programa GEN.

* Los reactivos usados durante el protocolo fueron preparados según el Manual de Técnicas del laboratorio.

ANEXO 4

Diseño para evaluación de respuesta celular a vacuna M-TT



*Las células del bazo fueron aisladas de ratones con medio RPMI 1640 con 10% de FBS (Bovine Serum Fetal), las células totales se lavaron con PBS (Phosphate Buffered Saline) + BSA (Bovine Serum Albumin) al 1%.