



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA POTENCIA INMUNOGÉNICA INDUCIDA POR UNA  
VACUNA CONTRA MORFINA/HEROÍNA EN EL MODELO DE ROEDOR: UN  
ESTUDIO DOSIS-RESPUESTA**

Tesis

Que para obtener el Título de:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

Presenta

**Elisabet Ramos Ochoa**

Asesores:

MVZ Carlos A. Tena Betancourt (Asesor Interno)

Dr. Benito Antón Palma (Asesor externo)

QFB. Ricardo Hernández Miramontes (Asesor técnico)



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## INDICE

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	
-Consumo de drogas en México y el mundo. Tendencias 2002/2008	2
-Historia de las Vacunas	5
-Generalidades de Vacunas	6
+Definición de Vacuna	6
+Definición de Inmunidad y tipos de inmunidad	7
+Componentes de una vacuna	8
+Vacuna Ideal	8
+Adyuvantes e Inmunoestimulantes	9
-Sistema Inmune	10
+Órganos y tejidos involucrados en la Respuesta Inmune	11
+Células involucradas en el sistema inmune	13
+Inmunoglobulinas	16
Generalidades	
Isotipos	
Funciones	
+Inmunoglobulinas en el Ratón	19
-Historia de los Opiáceos	20
-Morfina y sus Análogos Estructurales	21
+Aspectos Físicoquímicos y farmacológicos de la morfina	21
+Farmacodinamia	23
+Receptores	24
+Farmacocinética	26
+Interacciones con otras sustancias	28
+Adicción	28
+Tolerancia y Dependencia	29
+Síndrome de abstinencia	30
-Terapias actuales para el tratamiento de pacientes con adicción a los opiáceos	31
-Vacuna contra sustancias adictivas (inmunofarmacoterapias)	35
-Vacuna contra la morfina y sus análogos estructurales	36
-Antecedentes de la vacuna M-TT	37
+Diseño de la vacuna M-TT	38
+Inmunogenicidad de la vacuna M-TT	39
+Efectos terapéuticos de la vacuna M-TT	40
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43

OBJETIVOS	44
HIPÓTESIS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46
RESULTADOS	54
DISCUSION DE RESULTADOS	63
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	68
APORTACIONES	69
ANEXOS	70
-Protocolos experimentales: Prueba de Elisa	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Consumo de Drogas en la población Mexicana. Encuesta Nacional de Adicciones, Tendencias 2002-2008(1)	2
<b>Figura 2</b>	Comparativo en el consumo de drogas entre hombres y mujeres. Encuesta Nacional de Adicciones, Tendencias 2002-2008(1)	3
<b>Figura 3</b>	Consumo de los diferentes tipos de Drogas en la Población Mexicana. Encuesta Nacional de Adicciones, Tendencias 2002-2008(1)	3
<b>Tabla 1</b>	Órganos y Tejidos involucrados en la respuesta Inmune(4)	11
<b>Figura 4</b>	Órganos y Tejidos responsables de la inmunidad sistémica y local	12
<b>Figura 5</b>	Células de la respuesta Inmune (4)	15
<b>Tabla 2</b>	Isotipos de Inmunoglobulinas (4)	17
<b>Figura 6</b>	Funciones de las Inmunoglobulinas.(5)	19
<b>Figura 7</b>	Morfina y sus Análogos estructurales	22
<b>Tabla 3</b>	Efectos Generales de la Morfina	23
<b>Tabla 4</b>	Tratamientos Farmacológicos Actuales para la adicción de Morfina/Heroína	33
<b>Tabla 5</b>	Vacunas contra Morfina/Heroína en fase pre-clínica	37
<b>Tabla 6</b>	Grupos experimentales y tratamientos	46
<b>Tabla 7</b>	Calendario de Inmunizaciones y toma de muestras sanguíneas.	48
<b>Figura 8</b>	Promedio de títulos de anticuerpos animales inmunizados con la vacuna de M-TT a dosis de 10µg	54
<b>Figura 9</b>	Promedio de títulos de anticuerpos animales inmunizados con la vacuna de M-TT a dosis de 25µg	55
<b>Figura 10</b>	Promedio de títulos de anticuerpos animales inmunizados con la vacuna de M-TT a dosis de 50µg	56
<b>Figura 11</b>	Promedio de títulos de anticuerpos animales inmunizados con la vacuna de M-TT a dosis de 100µg	57
<b>Figura 12</b>	Promedio de títulos de anticuerpos animales inmunizados con la vacuna de M-TT a dosis de 200µg	58
<b>Figura 13</b>	Promedio de títulos de anticuerpos animales inmunizados con la vacuna de M-TT a dosis de 400µg	59
<b>Figura 14</b>	Comparativo entre los grupos de vacuna M-TT inmunizados a diferentes dosis	60

<b>Figura 15</b>	Prueba de Tail Flick grupos vacunados con las diferentes dosis de la vacuna de M-TT.	61
<b>Figura 16</b>	Correlación de Pearson entre título de Anticuerpos anti-Morfina/heroína y latencia obtenida en la prueba de desafío in vivo "Tail Flick"	62
<b>Figura 17</b>	Representación Gráfica de los mecanismos de acción de la vacuna M-TT en contra del efecto analgésico de la Morfina.	66
<b>Figura 18</b>	Ensayo de ELISA por captura de anticuerpo	74
<b>Figura 19</b>	Representación Gráfica de la obtención de título de anticuerpos.	77

## Índice de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
<b>SNC</b>	<b>Sistema Nervioso Central</b>
$\mu$	Mu
$\gamma$	gamma
$\delta$	delta
$\kappa$	kappa
$\sigma$	Sigma
<b>ENA</b>	Encuesta Nacional de Adicciones
<b>NK</b>	Natural Killers
<b>Da</b>	Daltones
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>IgG</b>	inmunoglobulina g
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>M-6-H-BSA</b>	Morfina-6-hemisuccinil-BSA
<b>FDA</b>	Food and drug Administration
<b>Vacuna M-TT</b>	vacuna Morfina con Toxoide Tetánico
<b>KLH</b>	Keyhole limpet hemocyanin
<b>g</b>	Gramos
<b>ml</b>	mililitros
$\mu\text{g}$	microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros

<b>S.C.</b>	Vía subcutánea
<b>I.P.</b>	Vía intraperitoneal
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>Abs</b>	Anticuerpos
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de Fosfatos Salino
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>BSA-MOR</b>	fase sólida de Morfina unida a BSA
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>OPD</b>	Ortofenildiamina
<b>ANDEVA</b>	Análisis de Varianza
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefálica
<b>INPRFM</b>	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

## RESUMEN

La adicción a la morfina y sus homólogos estructurales (sobre todo la heroína), representa un problema de salud de gran importancia, ya que según las encuestas, en México existen más de 800,000 adictos a estas drogas, así mismo esta adicción genera la muerte en el continente europeo de alrededor de 400,000 personas cada año. Existen varias terapias farmacológicas para el tratamiento de la adicción a la morfina, sin embargo, estas han resultado ser poco efectivas, por esto en recientes años se han desarrollado nuevas estrategias alternativas contra el uso y abuso de esta droga, entre ellas encontramos a las vacunas terapéuticas anti sustancias adictivas. Éstas al ser administradas en esquemas de inmunización activa generan la producción de anticuerpos específicos que reconocen y se unen a estas sustancias en el espacio intravascular sistémico, evitando que haya un paso a través de la barrera hematoencefálica, anulando o disminuyendo sus efectos en el cerebro. Los estudios realizados con estas vacunas utilizan diferentes dosis dependiendo del experimentador y no se cuenta con un estudio en el cual se observe cuál es la mejor dosis, la cual debe ser la que genere el título de anticuerpos más alto y con un número de reinmunizaciones menor en comparación a las otras dosis.

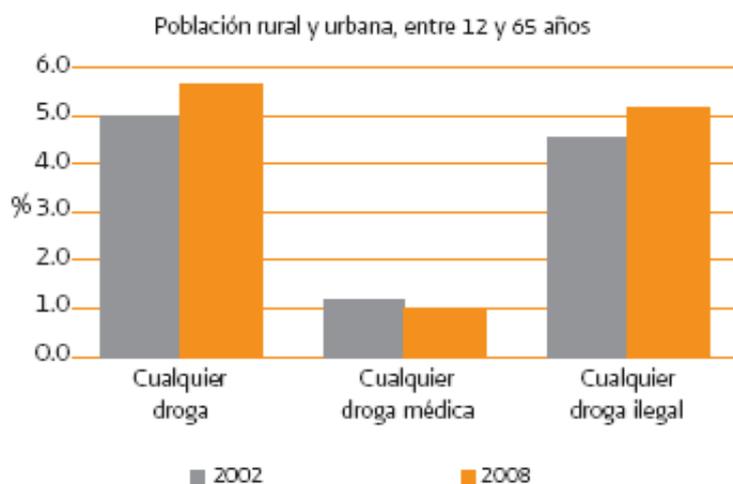
En este trabajo se probaron varias dosis de la vacuna M-TT (10µg, 25µg, 50µg, 100µg, 200µg y 400µg) de la cual ya se tenían resultados previos, en los que se observa que la vacuna genera altos títulos de anticuerpos, posee memoria humoral sostenida y es neuroprotectora en pruebas *in vivo* en ratón.

## ANTECEDENTES

### INTRODUCCIÓN

#### Consumo de Drogas en México y el mundo, tendencias 2002 al 2008.

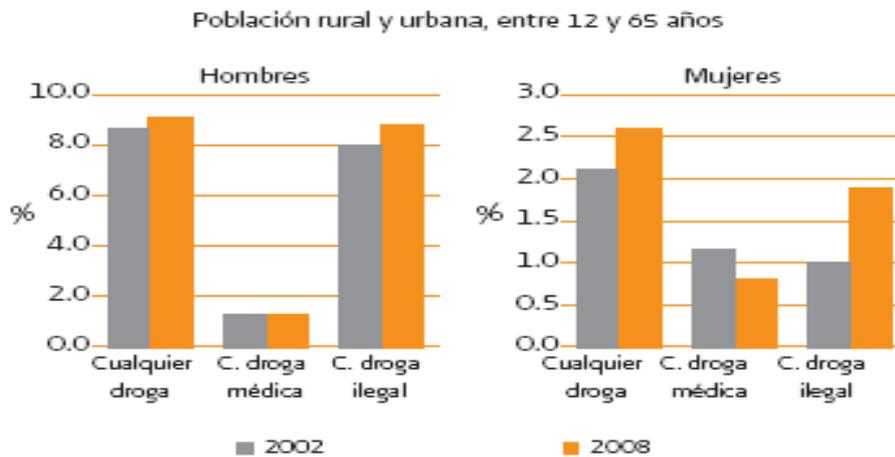
La Encuesta Nacional de Adicciones, realizada en el 2008, indica que el consumo de drogas tanto ilegales como médicas en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años de edad aumentó de un 5% observado en el 2002 a un 5.7% al 2008. Las drogas ilegales: marihuana, cocaína y sus derivados, heroína, metanfetaminas, alucinógenos, inhalables y otras drogas, aumentaron de un 4.6% a un 5.2%. Las drogas médicas con potencial adictivo, usadas fuera de prescripción, mantuvieron los niveles observados en la encuesta del año 2002.(1)



**Figura 1: Consumo de Drogas en la población Mexicana.** Encuesta Nacional de Adicciones. Tendencias 2002-2008. México, ENA 2008.(1)

Por grupos de población, se observa que, si bien el uso de drogas ilegales es mayor en los hombres (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 el 2002 al 1.9% en el

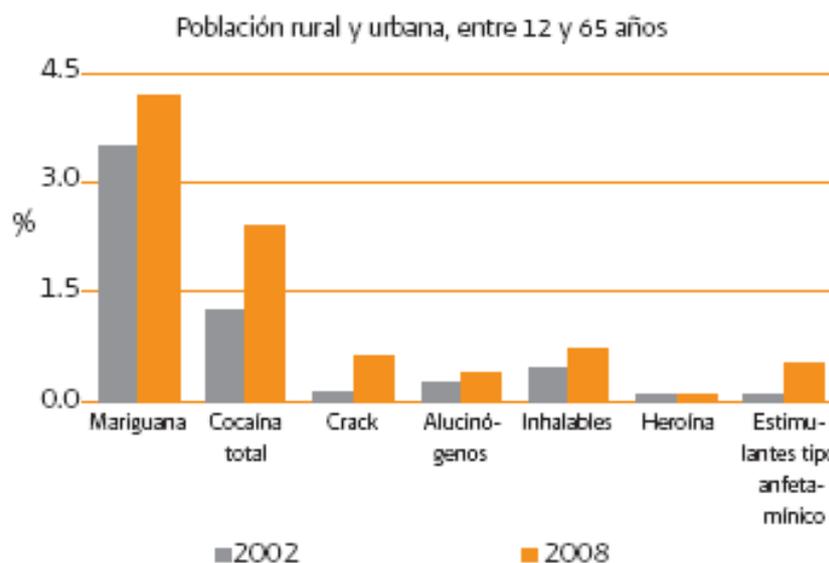
2008, mientras que el consumo de estas drogas en hombres aumento del 8% al 8.8%.(1)



**Figura 2: Comparativo en el consumo de drogas entre hombres y mujeres.** Encuesta Nacional de Adicciones. Tendencias 2002-2008. México, ENA 2008.(1)

La marihuana y la cocaína son las sustancias preferidas de la población. El consumo de la marihuana aumentó de 3.5 a 4.2%, mientras que el aumento en el consumo de la cocaína fue mayor, aumentando del 1.2% al 2.4%.

Sobre el consumo de heroína podemos observar que es un poco menor al 1%.



**Figura 3: Consumo de los diferentes tipos de Drogas en la Población Mexicana.**

(1)

Así mismo, estadísticas actuales revelan que, en Europa y Norteamérica existen de dos a cuatro millones de personas adictas a la morfina o la heroína, y que el 1% de esa población muere cada año, por causas como hepatitis C o por infecciones de VIH como consecuencia de administrarse la heroína con jeringas compartidas(2). Las estimaciones sobre la prevalencia nacional del consumo adictivo/recreativo de opiáceos durante este periodo oscilan a grandes rasgos entre 1 y 6 casos por cada 1000 habitantes de entre 15 y 64 años de edad(3).

### **Terapias anti-adictivas:**

Existen diversos tratamientos para los pacientes que sufren adicciones, entre ellos se encuentran: la terapia con opioides sintéticos, como por ejemplo la metadona, tratamientos con drogas agonistas de los receptores  $\mu$  opioides como la buprenorfina o el uso de antagonistas de estos receptores como la naloxona o la naltrexona, así como terapias psicológicas y tratamientos conductuales.

A nivel experimental existen estrategias muy prometedoras, entre ellas se encuentra el desarrollo de vacunas anti sustancias adictivas.

## Historia de las Vacunas

Históricamente la primera vacuna la ideó Edward Jenner (1749-1823) en 1796 contra la viruela humana. Jenner observó que las personas que habían sufrido o estado cerca de la viruela bovina (la cual es una enfermedad más benigna que la humana) no padecían la viruela humana, por lo que utilizando las vesículas de las vacas infectadas con viruela bovina realizó un preparado, con el cual inoculó a las personas sanas, y las protegió contra la viruela humana. Por haber hecho esto de una enfermedad de una vaca al proceso se le llamo vacuna y al virus que se empleó “vaccina”(4).

Alrededor de cien años después de esta primera vacuna, Louis Pasteur (1822-1895) demostró que se podía inducir una inmunidad, más o menos duradera, utilizando microorganismos homólogos modificados en su virulencia, así como por su inactivación total. De esta forma nacieron las **vacunas inactivadas**, ensayadas por Pasteur contra el carbunco, y las **vacunas atenuadas** producidas por primera vez en 1885 contra la rabia. Pasteur no llegó a conocer los mecanismos de activación inmunitaria, ni de inducción de memoria inmune; sin embargo, su diseño de vacunas ha sido de gran importancia para el desarrollo de las mismas hasta la fecha. Estas vacunas han sido denominadas **convencionales**, y han tenido mucho éxito en el control y erradicación de un gran número de enfermedades(4).

En 1957, Frank Burnet (1899-1985) describió el mecanismo inmunitario de la vacunación, quien enunció la teoría de la selección clonal, y en 1965 el papel de los linfocitos T y B en la respuesta inmune(4).

La base del éxito de la vacunación consiste en que la estimulación de los antígenos que componen una vacuna induce una respuesta primaria con estimulación o expansión clonal de linfocitos T y B, y la formación de células de memoria capaces de provocar una respuesta secundaria eficiente en el individuo cuando entra en contacto con los mismos antígenos(4).

Para entender lo que es una vacuna y cómo funciona es necesario conocer algunos conceptos básicos.

### **Generalidades de las Vacunas**

**Vacuna:** preparado formado por antígenos microbianos, a menudo combinado con adyuvantes, que se administra a las personas para despertar una inmunidad protectora. El antígeno puede estar en forma de microorganismos vivos pero avirulentos, microorganismos muertos, componentes macromoleculares purificados de un microorganismo o un plásmido que contenga el ADN complementario encargado de codificar un antígeno microbiano(5), la cual al administrarse en un individuo induce una respuesta inmune específica y de memoria que lo protegerá ante posibles desafíos(6).

**Inmunidad:** Es la capacidad de responder a las sustancias ajenas (microbios o moléculas). El proceso inmunológico se divide en diferentes etapas(5):

La **inmunidad innata** es la respuesta primaria ante la exposición del organismo a un fenómeno de estrés, constituye la primera línea de defensa y está conformada por barreras físicas (piel, barreras epiteliales y mucosas),

células (granulocíticas, fagocíticas, NK, dendríticas, entre otras), además de muchos mecanismos moleculares. Es el mecanismo de defensa más primitivo evolutivamente hablando, se puede encontrar desde insectos hasta mamíferos.

La **inmunidad adquirida** es un proceso de defensa más evolucionado, y se desarrolla como consecuencia de la activación de la respuesta innata. En este proceso se encuentran involucradas células como los linfocitos T, B y células plasmáticas, además de anticuerpos y citocinas particulares. Se puede obtener respuesta inmunitaria adquirida de manera activa, al exponer al organismo a un antígeno ajeno para que desarrolle una respuesta en contra de éste, por ejemplo a través de la vacunación, o bien, la inmunidad pasiva, a través de la transferencia de anticuerpos de un individuo a otro, por ejemplo por medio del calostro de la madre al neonato.(5)

## **COMPONENTES DE UNA VACUNA(7)**

Una vacuna se encuentra constituida por:

- Un antígeno
- Preservativos, los cuales evitan el crecimiento microbiano, p.e. timerosal, o bien, azida de sodio
- Estabilizadores del antígeno, p.e. fructuosa, o sacarosa.
- Fase líquida donde está contenido el antígeno, p.e. soluciones amortiguadoras de pH como PBS (Solución salina amortiguadora de Fosfatos)
- Puede incluir adyuvantes o inmunoestimulantes p.e. hidróxido de aluminio.

## **VACUNA IDEAL (4)(8).**

La vacuna ideal debería tener varias características:

- Ser termoestable
- Tener un manejo y almacenamiento estable, esto es, no depender de la cadena de frío para su conservación
- Permitir fácil administración
- Dosis única
- Inducir una respuesta inmune rápida, específica y duradera
- Económica

## **ADYUVANTES E INMUNOESTIMULANTES**

A principios del siglo pasado se observó que la incorporación de diferentes sales al material antigénico para la vacunación inducía un aumento de la producción de anticuerpos y de la memoria de la respuesta inmune en los animales que eran vacunados con estas mezclas. Estas sustancias, denominadas adyuvantes, actúan fundamentalmente: a) Favoreciendo la presentación de los antígenos al sistema inmune, mediante el secuestro de los antígenos vacunales y la posterior liberación de manera lenta y prolongada, b) Produciendo una ligera inflamación que activa la atracción de las células presentadoras de antígeno (CPA), con lo cual se favorece la quimiotaxis.(4)

Los adyuvantes más utilizados son las sales de aluminio (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio), que cuando se unen al antígeno, producen en el individuo inoculado un ligero granuloma que favorece la lenta eliminación del antígeno (estimulación antigénica más duradera), así como la atracción de las CPA, por lo que aumenta la capacidad de respuesta del sistema inmunitario.(4)

## **SISTEMA INMUNE**

El sistema inmunitario comprende un conjunto de órganos y estructuras diversas en cuanto a naturaleza, origen y función, localizados en lugares diferentes del organismo. Su papel fundamental es el de intervenir en los procesos de defensa frente a agentes extraños (antígenos), procesarlos para reconocerlos ante una segunda posible infección o invasión, y además mantener su integridad preservando sus propias estructuras.(4)

Comprende órganos linfoides especializados, que son el lugar donde se orquesta la respuesta inmunitaria, una red difusa de vasos linfáticos que recogen linfa, y un conjunto de células linfoides y no linfoides que se mueven constantemente por las estructuras corporales.(4)

Los órganos linfoides se clasifican en dos grupos: desde un punto de vista funcional y morfológico, pero que están íntimamente ligados.

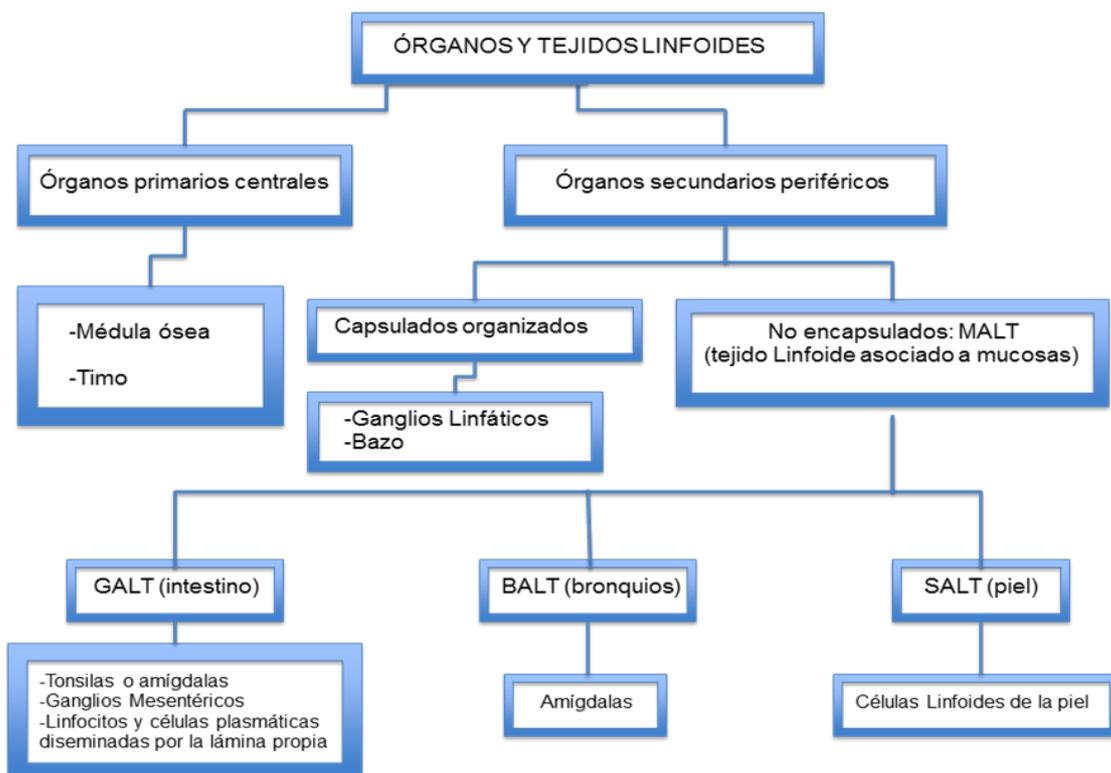
**Tabla 1: Órganos y Tejidos involucrados en la respuesta Inmune(4)(6)**

<p>PRIMARIOS O CENTRALES</p>	<p>-Médula Ósea: órgano donde se produce la hematopoyesis y la formación de todas las células responsables de la respuesta inmune, así mismo otorga una prolongada síntesis de anticuerpos en el tiempo, y es reservorio de células B de larga vida</p> <p>-Timo: Órgano donde se lleva a cabo la proliferación y maduración de linfocitos T (hasta la pubertad).</p> <p>-Bolsa de Fabricio: es una estructura en forma de saco que se encuentra en las aves, en este órgano se lleva a cabo la maduración de los linfocitos B.</p> <p>-Placas de Peyer: son acúmulos de tejido linfoide que se encuentran en la submucosa del intestino delgado de rumiantes, cerdos, equinos y caninos, tienen la misma función que la bolsa de Fabricio.</p>
<p>SECUNDARIOS O PERIFÉRICOS</p>	<p>-Ganglios Linfáticos: Están diseminados por todo el organismo agrupados en zonas anatómicas estratégicas; cavidad abdominal, tórax, mediastino, cuello, región axilar e inguinal; son zonas de captación de antígenos y donde se lleva a cabo el inicio de la respuesta inmune.</p> <p>-Bazo: Respuesta a antígenos que hayan llegado a él vía torrente sanguíneo, participa en la respuesta a infecciones sistémicas.</p> <p>-MALT (tejido linfoide asociado a Mucosas): inicia la respuesta inmune frente a los antígenos o sustancias nocivas ingeridas o inhaladas, crean una reacción inmune localizada evitando una reacción sistémica, hay 3: GALT tejido linfoide asociado al intestino, BALT tejido linfoide asociado a bronquios y SALT tejido linfoide asociado a la piel.</p> <p>-tonsilas: tejido linfoide que se encuentra en forma bilateral en la cavidad orofaríngea, captan antígenos que penetren por vía oral o inhalada.</p>

En los órganos linfoides se generan, seleccionan, almacenan y adquieren madurez las células responsables de la respuesta inmune, las cuales serán vitales a la hora de enfrentarse a los diferentes tipos de antígenos, además de iniciarse las respuestas inmunitarias tras la capacitación y procesamiento de los mismos. La diferenciación de los linfocitos T se lleva a cabo en el Timo. Y la de los linfocitos B se produce en la médula ósea de los mamíferos y en la bolsa de Fabricio en las aves.(4)

Los vasos linfáticos y sanguíneos son los responsables de la comunicación entre las diferentes partes del sistema inmunitario, existiendo un tránsito continuo y masivo de células que circulan por la sangre y los vasos linfáticos y entre la sangre y los tejidos.(4)

**FIGURA 4: Órganos y tejidos responsables de la inmunidad sistémica y local.**



**Figura 4** abreviaturas: MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas, GALT: tejido linfoide asociado a intestino, BALT: tejido linfoide asociado a bronquios, SALT: tejido linfoide asociado a piel.

## **Células involucradas en la respuesta inmune.**

Los monocitos son células sanguíneas circulantes derivadas de la médula ósea que poseen capacidad fagocítica y que son precursores de los macrófagos tisulares.(5) Procesan los antígenos que fagocitan para presentárselos a los linfocitos T, iniciando la respuesta inmune adaptativa.(4)

Los macrófagos son células fagocíticas alojadas en los tejidos que derivan de los monocitos sanguíneos y desempeñan funciones importantes en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Los macrófagos se activan a partir de productos microbianos como endotoxinas y de citocinas de los linfocitos T. una vez activados, fagocitan los microorganismos y los destruyen, segregan citocinas proinflamatorias y presentan antígenos a los linfocitos T cooperadores.(5)

Los neutrófilos participan en la defensa frente a infecciones bacterianas y otros procesos inflamatorios, liberando sustancias quimiotácticas que atraen a otras células que participan en el proceso de inflamación. Tienen una actividad fagocítica marcada. Generalmente son las primeras células que responden a la agresión.(4)

Los eosinófilos participan fundamentalmente en la defensa frente a las infecciones parasitarias, así como en la hipersensibilidad de tipo I o alergia. También tienen cierta capacidad fagocítica.(4)

Los basófilos contienen gránulos con heparina, leucotrienos, histamina y otras aminas vasoactivas que tienen gran importancia en la respuesta inflamatoria y de hipersensibilidad de tipo I.(4)

Las células dendríticas tienen como función captar, procesar y presentar antígeno a los linfocitos T, en combinación con las moléculas del MHC. Tienen alta capacidad inmunoestimulante.(4)

Las células asesinas naturales (NK) son linfocitos que destruyen células infectadas y tumorales de manera innata, sin restricción de moléculas MHC.(4)

Los linfocitos T poseen un receptor (TCR) que les permite reconocer al antígeno asociado a moléculas del MHC. Este reconocimiento los activa, los convierte en células efectoras, y les permite coordinar la respuesta inmune.(4)

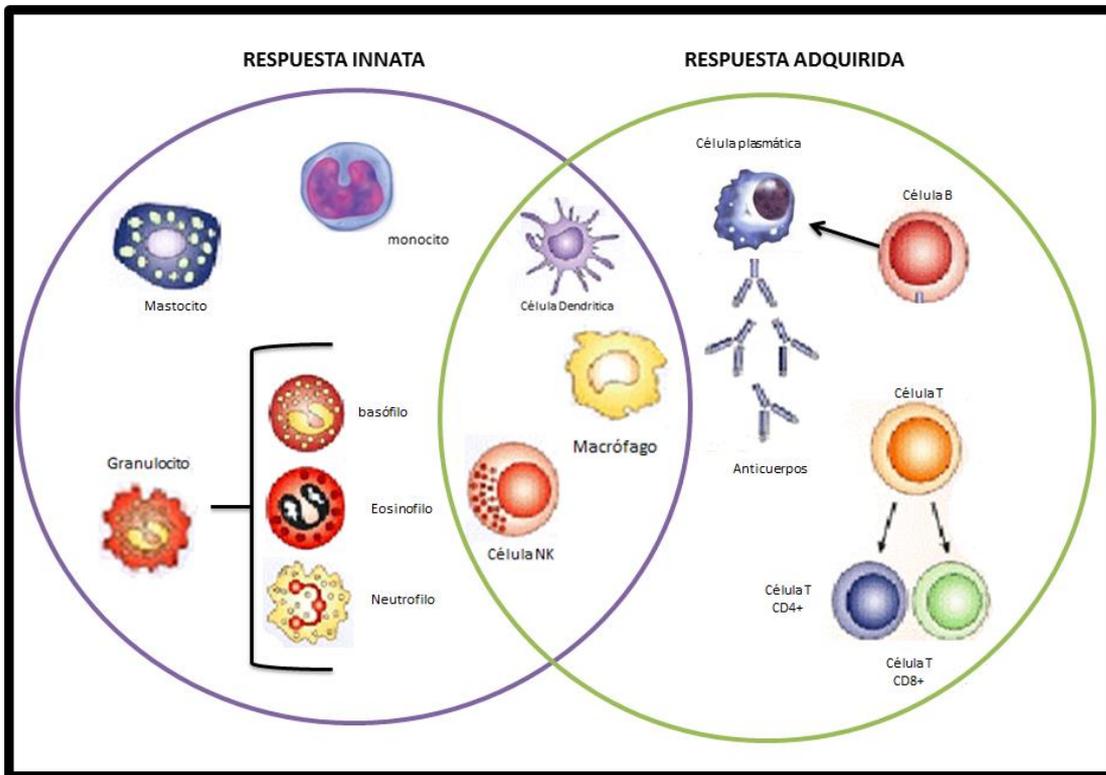
Los Linfocitos T colaboradores (Th) reconocen al antígeno asociado a las moléculas de clase II del MHC. Poseen el marcador CD4. Coordinan y dirigen la respuesta inmune.(4)

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) reconocen y destruyen células propias alteradas tanto por infecciones intracelulares como procesos tumorales. La célula alterada presenta antígenos asociados a las moléculas de clase I del MHC. Poseen el marcador CD8.(4)

Los Linfocitos B poseen un receptor (llamado BCR) que es una inmunoglobulina la cual está en su superficie, y se secreta en su forma soluble tras el reconocimiento antigénico. Las inmunoglobulinas reconocen antígenos y contribuyen a la eliminación de microorganismos por diversos mecanismos.(4)

Las células plasmáticas, son linfocitos B totalmente diferenciados que expresan o secretan anticuerpos.(5)

**Figura 5: Células de la respuesta Inmunitaria**



**Figura 5:** Representación gráfica de las células involucradas en la respuesta inmunitaria innata y adquirida

## INMUNOGLOBULINAS

### Generalidades

Las inmunoglobulinas (IgG's) también conocidas como anticuerpos, son glucoproteínas producidas por las células plasmáticas como respuesta a un inmunógeno, con capacidad de reacción específica frente a la molécula que indujo su síntesis. Las IgG's representan las moléculas solubles secretadas, características de la respuesta inmune humoral(4). Las IgG's se pueden encontrar de dos formas a) forma soluble secretada, y b) unidas a la membrana de los linfocitos B, en cuyo caso se denominan receptores de linfocitos b (BCR del inglés *B-cell-Receptors*)(4)

Hay cinco isotipos de inmunoglobulinas (Ig), que son IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Cada uno se caracteriza por contener uno de los cinco tipos de cadenas pesadas que se conocen: alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), gamma ( $\gamma$ ) y mu ( $\mu$ ). Cada clase o isotipo corresponde a diferencias estructurales de las cadenas pesadas(6). Las principales funciones biológicas de las inmunoglobulinas son: la activación del complemento por vía clásica, la aglutinación de partículas, la protección de mucosas, la neutralización, la opsonización (dentro del mecanismo de fagocitosis) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

**Tabla 2: Isotipos de Inmunoglobulinas en el ratón(4)(5)**

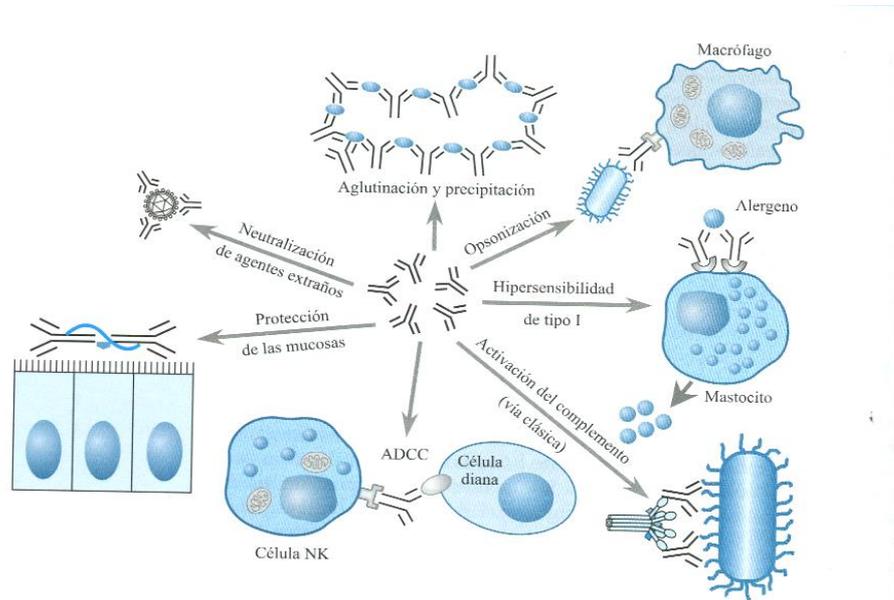
Isotipos de Anticuerpos	Subtipos	Origen	Concentración sérica (mg/ml)	Tiempo de vida media en suero (días)	Funciones
IgA	IgA1, 2	Células Plasmáticas del tejido conjuntivo de las mucosas intestinales, respiratoria, urogenital, ocular, piel y glándula mamaria	3.5	6	-Inmunidad en las mucosas -se comportan como opsoninas -neutralizan bacterias, toxinas y virus
IgD	Ninguno		Indicios	3	Receptor del antígeno de linfocitos B vírgenes
IgE	Ninguno	Células plasmáticas de tejido conjuntivo de la dermis	0.05	2	-Defensa frente a parásitos helmintos. -Hipersensibilidad I
IgG	IgG 1-4	Células plasmáticas del bazo, ganglios linfáticos y médula ósea	13.5	23	- Neutralización -Opsonización -Activación del complemento -Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos -Inmunidad neonatal -Inhibición por retroalimentación de linfocitos B -Hipersensibilidad tipo II y III
IgM	Ninguno	Células plasmáticas del bazo, ganglios linfáticos y médula ósea	1.5	5	-Receptor del antígeno de linfocitos B vírgenes -Activación del complemento por vía clásica -Hipersensibilidades tipos II y III -Se comportan como opsoninas -Neutralizan toxinas, bacterias y virus.

## **Funciones de las Inmunoglobulinas**

Como productos característicos de la respuesta inmune humoral, la misión principal de las inmunoglobulinas consiste en la eliminación de los agentes extraños extracelulares. Se realiza tanto directamente a través de la neutralización, como indirectamente, señalizando o marcando los agentes extraños para ser reconocidos por otros elementos de la respuesta inmune. Las IgG's pueden actuar a nivel sistémico o protegiendo activamente las diferentes mucosas del organismo.(4)

- **NEUTRALIZACIÓN:** consiste en neutralizar la capacidad infecciosa o sus efectos tóxicos, evitando que se unan con los receptores celulares.
- **OPSONIZACIÓN:** los agentes extraños cubiertos por inmunoglobulinas son posteriormente reconocidos por receptores de inmunoglobulina situados en la superficie de los macrófagos (o de las células fagocíticas en general), fenómeno denominado opsonización, que se integra dentro del proceso global de fagocitosis.
- **ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO:** además pueden llevar a cabo la destrucción de los antígenos, favoreciendo la unión a sus porciones Fc de la proteína C1, es decir la molécula que da inicio a la activación del complemento por la vía clásica. Dentro de este mecanismo de activación del complemento las inmunoglobulinas participan en las reacciones de hipersensibilidad de los tipos II y III.
- **CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC):** es la unión de las inmunoglobulinas a receptores específicos localizados en la superficie de algunas células (NK y eosinófilos), lo que las convierte en citotóxicas, por lo que adquieren la capacidad de destruir diferentes células blanco.

- AGLUTINACIÓN Y PRECIPITACIÓN IN VITRO: algunas clases de inmunoglobulinas promueven la aglutinación y precipitación de diversos antígenos.



**Figura 6: Funciones de las Inmunoglobulinas.(4)**

### **Inmunoglobulinas en el Ratón**

En los ratones se distinguen cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), y dos de la IgA (IgA1 e IgA2). No se conocen subclases de IgM, IgD e IgE.(4)

## LOS OPIÁCEOS

### Historia de los opiáceos

El nombre morfina deriva del nombre de Morfeo, dios griego de los sueños que frecuentemente fue representado con un puñado de amapolas. El consumo de las drogas opiáceas comenzó hace mucho tiempo, las referencias más antiguas a su consumo medicinal corresponden a las culturas Sumeria y Asio-babilónica (hace 5 000 años). Las pipas para fumar opio encontradas en sitios arqueológicos de Asia, Egipto y Europa dan testimonio de que entre los años 1000 y 300 a.C. ya se fumaba esta droga. Los comerciantes árabes introdujeron las drogas opiáceas a China entre 600 y 900 d.C. Con el desarrollo europeo, el consumo medicinal pasó gradualmente a ser recreativo y así aumentó el número de adictos al opio. Su importación a China se convirtió en la mayor fuente de comercio para Inglaterra y ayudó a iniciar la guerra entre China e Inglaterra cuando Inglaterra prohibió la importación a principios del siglo XIX.(9)

El opio era un importante ingrediente en muchos de los medicamentos de patente comercializados antes de que existiera la FDA en los Estados Unidos. En 1805 se purificó la morfina, el mayor ingrediente activo de la amapola y en 1853 Alexander Wood inventó la aguja hipodérmica. La primera ola de adicción a los narcóticos inyectables fue posterior al consumo generalizado de morfina inyectada durante la guerra civil estadounidense. El aumento definitivo fue responsabilidad de Bayer Company en 1898, cuando sus científicos descubrieron la forma de agregar a la morfina sustancias químicas adicionales para hacerla más soluble en las grasas, con el fin de que penetrara con mayor

facilidad al cerebro. Esta novedad produjo la heroína, nombre comercial de un narcótico producido por Bayer. En 1913 Bayer suspendió la producción de heroína.(9)

## **Morfina y Sus Análogos Estructurales**

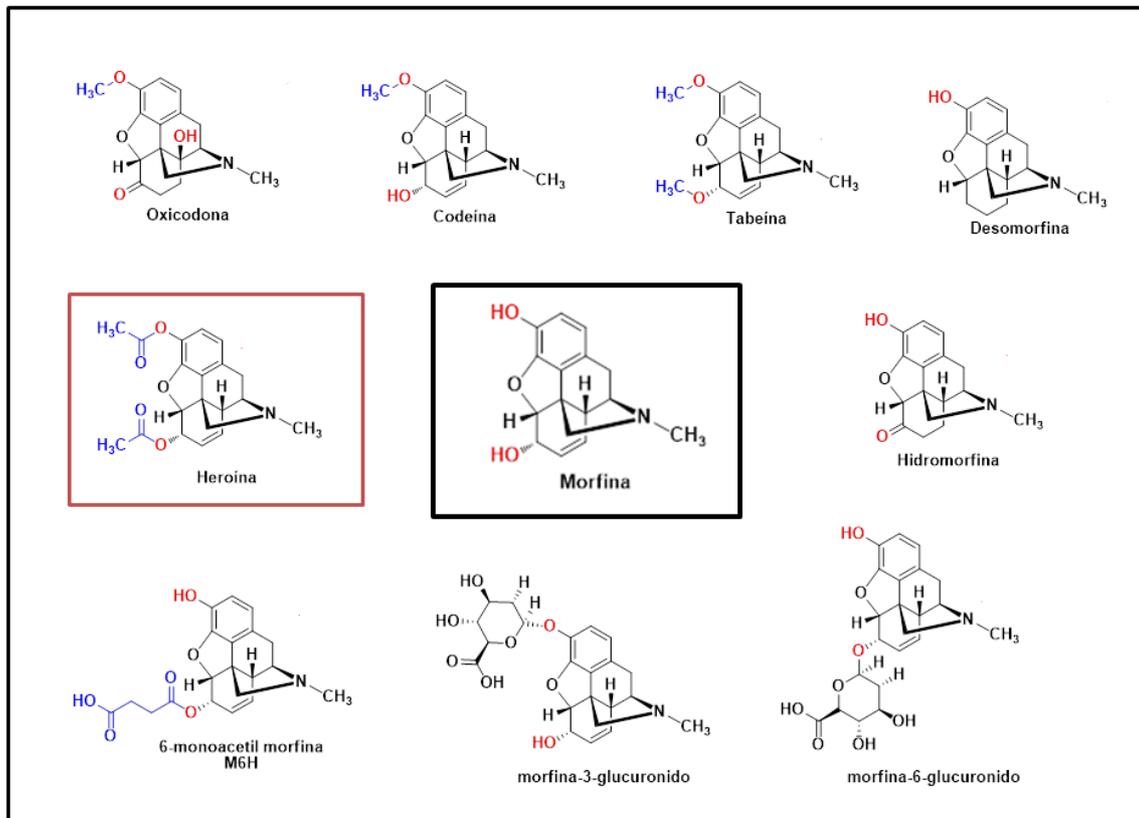
### **Aspectos Físicoquímicos y farmacológicos de la Morfina**

La morfina (forma hidratada  $C_{17}H_{19}NO_3 \cdot H_2O$ ) es un alcaloide muy potente del tipo de las bencilisoquinolinas, extraído del opio, el cual se obtiene de la planta de la amapola o planta del opio (*Papaver somniferum*). La morfina representa del 10 al 20% de la masa total del jugo que se obtiene al raspar o drenar esta planta, presenta también compuestos fenantrénicos similares tales como la codeína (0.5%), la tebaína (0.2%) y otras bencilisoquinolinas como por ejemplo la papaverina (1%) y la noscapina (6%).

La morfina actúa directamente sobre el sistema nervioso central (SNC) para aliviar el dolor, por lo cual representa el prototipo de narcótico convencional, usada como referencia al comparar las estructuras de otros compuestos sintéticos o semisintéticos (como por ejemplo heroína, benzomorfinas, metadona, etc.) que por lo general son usadas en la clínica(10).

Existen varios análogos estructurales de la morfina; esto es, que son derivados semisintéticos de ésta y por lo tanto comparten una estructura molecular homóloga, y poseen una región variable la cual le da las características individuales a cada molécula. Los análogos estructurales de la morfina son:

**Heroína** (derivado más importante a nivel de salud pública), hidromorfina, oxicodona, codeína, tebaína, desomorfina, 3-glucurónido morfina, 6-glucurónido morfina, 6 monoacetil-morfina.



**Figura 7:** Morfina y sus Análogos estructurales.

## Farmacodinamia

Los opioides actúan sobre los diversos receptores específicos a los que se fijan los péptidos opioides endógenos derivados de las proteínas precursoras proopiomelancortina, proencefalina y prodinorfina. Los subtipos más importantes de receptores opiáceos son:  $\mu$  activado por la morfina;  $\delta$  activados por las encefalinas;  $\sigma$  activado por la n-alilnormetazocina, y  $\kappa$ , activado por la ketociclazocina(11).

Por la gran afinidad y especificidad que tiene la morfina para el receptor opioide  $\mu$ , este narcótico tiene un amplio espectro de efectos adversos desde moderados a intensos como la euforia/disforia, dificultad respiratoria, náusea, vómitos, sedación, hipotensión entre otros (Tabla 3)(11).

**Tabla 3:** Efectos generales de la Morfina (12)

Indicaciones Principales	Interacciones	Efectos colaterales y Precauciones	Contraindicaciones y Efectos Adversos
Analgésico	Potencializa el efecto depresor con los antipsicóticos, Alcohol, Benzodiazepinas, Somníferos, IMAO y antidepresivos tricíclicos	Depresión respiratoria, náuseas, vómito, mareo, confusión mental, sensación de bienestar, estreñimientos, incremento de la presión de vías biliares, retención urinaria, hipotensión arterial, delirio	Hipersensibilidad, insuficiencia respiratoria, cólico biliar, Primer trimestre del embarazo: Presión intracraneal elevada, compromiso cardiovascular y farmacodependencia del producto.

Por la similitud que existe entre la estructura molecular de la morfina y de sus análogos, todos estos compuestos comparten una perfil farmacológico, que consiste en analgesia, sedación, inhibición de la motilidad intestinal y depresión del sistema inmune(10)(13)(14)(15)(16)(17)(18).

Sin embargo, existen diferentes parámetros fisicoquímicos entre estas moléculas que las hacen diferentes, si nos basamos en las pequeñas diferencias estructurales que hay entre las moléculas de la morfina y la de la heroína, esta última posee un alto grado de lipofilidad, por lo que es rápidamente absorbida a los compartimientos biológicos, lo que la hace más permeable a la barrera hematoencefálica a comparación de la morfina, ya que ésta tiene una naturaleza de tipo hidrofóbica.(19)

## **Receptores**

Los receptores opiáceos más conocidos son el  $\mu$  (con dos subtipos de receptores el  $\mu_1$  y  $\mu_2$ ), el  $\delta$  (con dos subtipos de receptores en  $\delta_1$  y  $\delta_2$ ), el  $\kappa$ , y recientemente el “huérfano”.(12) los cuales se encuentran en todas las células somáticas y neuronales, estas últimas son las células de interés en este trabajo.

Los receptores mu, delta y kappa se acoplan a la proteína G e inhiben la adenilciclase, por este mecanismo activan el flujo de  $K^+$  y suprimen el voltaje de  $Ca^{++}$ , causando una hiperpolarización membranal de las neuronas. Además, los receptores de los opiáceos se acoplan a segundos mensajeros activando kinasas y la fosfolipasa-C(12), causando una liberación de neurotransmisores como la dopamina, la que interviene en la formación de cambios plásticos en las neuronas del sistema límbico, tálamo, hipotálamo, cuerpo estriado mesencéfalo y médula espinal, principalmente. Estos sitios tienen una alta participación en la percepción del dolor y en la modificación del estado de ánimo lo que genera como consecuencia la adicción a la sustancia(12).

Por lo general, la activación de receptores opiáceos produce inhibición de la actividad bioeléctrica neuronal, con disminución de liberación del

neurotransmisor correspondiente en los grupos neuronales activados. Los efectos farmacológicos de los distintos opiáceos son variables debido al fenómeno de dualismo farmacológico, mediante el cual fármacos distintos pueden, por mecanismos de compensación, causar que un opiáceo se comporte de forma distinta en función de la presencia o no de otro opiáceo.

A causa de este fenómeno, los opiáceos se clasifican (20) en:

- Agonistas puros
- Agonistas/antagonistas mixtos
- Agonistas parciales
- Antagonistas puros.

## **Farmacocinética**

Los opiáceos se absorben fácilmente en el aparato digestivo cuando se toman como cocimiento, a través de la mucosa nasal en forma de polvo y de los pulmones cuando se fuma(20).

Al ser ingerida vía oral, la morfina presenta una biodisponibilidad menor al 30% ya que gran parte de la droga es metabolizada por el hígado, en donde disminuye su actividad hasta en un 50%, observándose las concentraciones plasmáticas más elevadas entre los 30 y los 120 minutos. Por vía parenteral su biodisponibilidad aumenta, ya que se evita el paso por el hígado. Por vía intravenosa su acción es inmediata(12).

En el torrente sanguíneo la morfina se une a las proteínas plasmáticas en un 40% y sus concentraciones tisulares son mínimas después de 24 horas de la administración(12).

Comparada con sus metabolitos, la morfina atraviesa la barrera hematoencefálica en bajas cantidades, esto debido a su naturaleza hidrofóbica; sin embargo, la heroína debido a su elevada liposolubilidad atraviesa esta barrera en mayor proporción, llegando al encéfalo en donde se transforma a morfina y así lleva a cabo su efecto(12).

El metabolismo de la morfina es por vía hepática (glucuronización hepática) y su excreción se lleva a cabo por vía renal (90%)(20), la morfina se conjuga con el ácido glucurónico (formando morfina-6-glucurónido), el cual tiene el doble de la potencia que el compuesto original, el primer día de administración se elimina el 90%, solo el 8% se elimina como morfina sola, y lo demás como

morfina-3-glucurónido, el contenido de morfina en heces es del 7 al 10%, y la eliminación por vía respiratoria es de 3 a 5%(12).

## **Interacciones con otras sustancias**

Los fármacos neurolépticos, las Benzodiacepinas, los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO), los anestésicos y otros depresores, como el alcohol, pueden aumentar la depresión respiratoria causada por los fármacos opiáceos. La meperidina puede tener una interacción letal con los IMAO(12).

Al parecer, actúan disminuyendo el efecto de los diuréticos administrados en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva(12).

Los opiáceos interactúan con los antidepresivos tricíclicos aumentando su efecto. Existe riesgo de aparición de síndrome serotoninérgico si se emplean en dosis altas(12).

Los fármacos como antihistamínicos (hidroxicina), anfetaminas y antidepresivos (amitriptilina) potencian la analgesia de los opiáceos(12).

Pueden aumentar la actividad de los relajantes musculoesqueléticos y de los anticoagulantes cumarínicos(12).

## **Adicción**

La adicción a las drogas legales e ilegales es definido como el estado de enfermedad en el cual el organismo depende de sustancias para su funcionamiento normal y se crea una dependencia física, que lleva a un comportamiento compulsivo y repetitivo a pesar de las consecuencias negativas que la droga tiene sobre la salud física y mental del individuo así como en el ámbito social(21).

## **Tolerancia y Dependencia**

Los individuos desarrollan tolerancia a muchos de los efectos de los opioides con relativa rapidez; la tolerancia se manifiesta por el acortamiento en la duración de la acción o por una disminución de la intensidad de la respuesta, lo que obliga a aumentar la dosis(22).

La rapidez con la que aparece la tolerancia es tanto mayor cuanto más neuroactividad tiene el opioide(22).

Se desarrolla tolerancia al efecto analgésico, euforizante, sedante y depresor de SNC, que incluye el efecto letal(12).

La dependencia física se debe a una situación de hiperactividad o hiperexcitabilidad de varios núcleos cerebrales entre ellos el *locus coeruleus*. Este es una región anatómica en el tallo cerebral, y es una de las estructuras que más participa en el estado de alerta y atención; con la administración prolongada de opiáceos, pierde su capacidad para incrementar la conductancia al potasio, que depende de la activación de proteínas G, y de esa manera pierde la habilidad para disminuir el disparo de las neuronas cuando se aplican los opiáceos, de esta manera la función se readapta, permitiendo al sujeto un grado aceptable de alerta y atención(12).

## **Síndrome de Abstinencia**

El uso prolongado de drogas adictivas altera el balance de los mecanismos de regulación y el sujeto incrementa la dosis para obtener cierto grado de satisfacción, ya que el cerebro, al adaptarse, requiere mayor cantidad de droga; de esta manera se incrementa el consumo(12). Cuando el paciente se ve forzado a no consumir la sustancia a la que es adicto, desarrolla una serie de descompensaciones fisiológicas, endocrinológicas y químicas, conocido como "Síndrome de abstinencia".

Durante el síndrome de abstinencia disminuye la dopamina la cual provoca disforia; además, los péptidos opiáceos desencadenan disforia e hiperanalgesia; con la disminución de la serotonina se desencadena depresión, dolor y disforia; y con el incremento del factor liberador de corticotropina y noradrenalina se provoca estrés, además el incremento del glutamato provoca hiperexcitabilidad(12).

Los signos clínicos que se presentan en el síndrome de abstinencia son: lagrimeo, bostezos, rinorrea, somnolencia, piloerección, dilatación pupilar, angustia, anorexia, insomnio, debilidad, depresión profunda, nauseas, vómito, diarrea, hipersudoración, calambres, aumento en la presión arterial y taquicardia (12).

Algunos neurotransmisores que participan oponiéndose al efecto de los opiáceos son: neuropéptido FF, colescistoquinina y disnorfina y contribuyen a la hiperalgesia que se presenta en el síndrome de abstinencia. Éste incluye tanto el deseo de gratificación, recompensa y placer (reforzamiento positivo), como la urgencia por evitar la disforia y la hiperalgesia (reforzamiento

negativo). Esta característica provoca un escalamiento en el uso compulsivo(12).

En un esfuerzo por auxiliar a los pacientes con adicción a los opiáceos y otras sustancias adictivas se han desarrollado diversas terapias.

### **TERAPIAS ACTUALES PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON ADICCIÓN A LOS OPIÁCEOS: Farmacoterapia clásica para el tratamiento de la dependencia fisiológica a opiáceos, limitaciones clínicas.**

A lo largo de las tres últimas décadas, diversos centros de investigación y empresas farmacéuticas a nivel mundial han sintetizado y validado una amplia variedad de fármacos encaminados a desintoxicar, disminuir los síntomas afectivos observados durante la abstinencia, reducir la apetencia o el *craving* (deseo irresistible de consumir una sustancia) y/o prevenir las recaídas del consumo adictivo en sujetos adictos a opiáceos(23).

Sin embargo, a pesar de que la FDA (Food and Drug Administration, EUA) ha certificado el uso de una gran variedad de fármacos, su efecto en tratamientos clínicos anti-adictivos no ha sido exitoso. El procedimiento terapéutico inicial en el tratamiento de un sujeto dependiente o adicto es el empleo de la desintoxicación aguda(23).

Durante la desintoxicación aguda se utilizan tratamientos mediante agonistas parciales del receptor opioide  $\mu$ , como la metadona y la buprenorfina en combinación con Benzodiazepinas o sedantes neurolépticos (11). Sin embargo, a la fecha no existe una evidencia sólida de resultados eficaces a largo plazo en el mantenimiento de la abstinencia en los sujetos sometidos a tratamientos

de desintoxicación. Este tipo de tratamientos requieren de periodos de tratamiento a muy largo plazo (meses a años) y deben ser combinados con psicoterapias de apoyo, de expresión y de desarrollo motivacional, así como terapias cognitivo-conductuales, entre otras. Adicionalmente la gran mayoría de estas terapéuticas producen importantes efectos colaterales tóxicos a mediano y largo plazo, con lo anterior se podría explicar el poco apego que el sujeto adicto muestra a estos tratamientos (23).

Otras terapias de desintoxicación consisten en utilizar antagonistas del receptor opioide  $\mu$ , como por ejemplo la naloxona, naltrexona o una combinación de ambas, pero no es una medida muy recomendada durante el síndrome de abstinencia, ya que exagera la demanda en el consumo de las sustancias opioides originales que eran consumidas por el adicto y que lo llevaron a la adicción inicial(11).

Cabe destacar que durante el síndrome de abstinencia se requieren de cuidados médicos especiales y de la hospitalización y cuidado clínico del paciente por el personal médico, lo que comúnmente resulta ser altamente costoso para el paciente y/o sus familiares (11).

**Tabla 4: Tratamientos Farmacológicos actuales para la adicción a la Morfina**

Nombre del Fármaco	Tipo	Efectos Secundarios	Consideraciones especiales
METADONA	Opioide sintético de larga duración	Depresión respiratoria, bradicardia, contracción de las pupilas, liberación hormona antidiurética, estreñimiento, glicemia en sangre	Debe realizarse en instituciones especializadas (ej. Clínicas)  Causa adicción
BUPRENORFINA	Agonista parcial del receptor $\mu$	Estreñimiento, cefalea, insomnio, astenia, somnolencia, nauseas, vomito, lipotimia, vértigo, depresión respiratoria, sudoración hipotensión, alucinaciones	Al suspender hay síndrome de supresión parecido al síndrome de abstinencia a opioides que dura 2 semanas aproximadamente
NALOXONA	Antagonista de los receptores opioides	Taquicardia, hipertensión o hipotensión arterial, arritmias, aumento de presión intracraneal, edema pulmonar, midriasis, convulsiones	

Otro tratamiento consiste en utilizar agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  como lo son la guanfacina, la lofexidina o la clonidina, que representan otro conjunto de compuestos usados últimamente en las terapias para aliviar los signos y síntomas del síndrome de abstinencia; sin embargo, se ha observado que su uso prolongado induce a graves efectos adversos. Por ejemplo, con el uso prolongado de la metadona, buprenorfina o la pentazocina se han

reportado desordenes del sueño, cuadros de ansiedad, grave deterioro cognitivo y emocional, sedación, hipotensión, ansiedad extrema y astenia. Otros estudios han reportado que la utilización por tiempo prolongado de antagonistas del receptor opioide  $\mu$  como la naloxona y la naltrexona ocasionan que se bloqueen los sistemas de transmisión de opioides de tipo endógeno (encefalinas y endorfinas) que se llevan a cabo en las sinopsis cerebrales, lo que conlleva a que el paciente presente con frecuencia efectos emocionales negativos, como ansiedad o depresión(11).

Por todas estas desventajas se han diseñado estrategias alternativas para el tratamiento de la adicción a opiáceos. Un ejemplo notable de estas nuevas estrategias son las vacunas y su uso en procedimientos farmacológicos inmunoterapéuticos para el tratamiento de conductas de consumo adictivo, tanto en modelos animales como en el humano(23).

El tratamiento con vacunas es uno de los más innovadores y el que se estudia en el presente trabajo.

## **Vacunas contra sustancias adictivas (Inmunofarmacoterapias)**

Estas nuevas estrategias experimentales están basadas en el diseño y síntesis de diversas formulaciones estructurales de vacunas terapéuticas contra la adicción a: a) cocaína(24)(25)(26), b) Nicotina(27)(28)(29) y, c) Heroína/Morfina(30)(11). Dichas vacunas al ser aplicadas en esquemas de inmunización activa en modelos animales como el roedor, inducen la producción de anticuerpos séricos específicos que reconocen y se unen a estas sustancias en el torrente sanguíneo. Estos anticuerpos anti-droga poseen la capacidad de secuestrar a la droga adictiva circulante en el torrente sanguíneo una vez que es consumida por el sujeto, los anticuerpos al ser macromoléculas ( $\approx 150$  kD), no permean la barrera hematoencefálica, y al unirse con las moléculas de droga libres en el torrente sanguíneo forman complejos moleculares anticuerpo-droga de alto peso molecular, los cuales impiden la permeabilidad de la droga a través de la barrera hematoencefálica(31)(32)(33)(34). Por lo anterior hay una disminución muy significativa de la fracción de “droga libre” plasmática que podría difundir al espacio extracelular del tejido nervioso cerebral y llevar a cabo su efecto, el cual consiste en un aumento en la liberación de dopamina. (31)(32)(33)(34). Así, al no haber una liberación de este neurotransmisor por el consumo de la droga, ya no se presenta la conducta de reforzamiento placentero de re-consumo con patrón adictivo de esta sustancia en el sujeto vacunado activamente e inmune a la misma sustancia(31)(32)(33)(34).

El éxito de esta estrategia inmunológica se basa principalmente en: a) la concentración de anticuerpos, denominada título; y, b) la afinidad y especificidad de los anticuerpos hacia una cierta estructura molecular. La afinidad y especificidad de los anticuerpos están directamente relacionados a

una presentación inmunogénica exitosa, resultado de un buen diseño molecular de conjugado inmunogénico (diseño: hapteno- tipo del brazo espaciador-sitio de unión del hapteno a la proteína acarreadora). Además, la magnitud de la respuesta inmunogénica, medida como concentración de anticuerpos, es el resultado del tipo de proteína acarreadora usada, a la cual se une el hapteno, así como al tipo de adyuvante usado en la formulación antigénica final (21)(35)(36)(37).

Otra característica muy importante que le concede el tipo de proteína acarreadora usada es la capacidad de estimular receptores del tipo Toll, lo cual va a permitir la activación de células B que producen anticuerpos específicos para la droga a largo plazo (memoria humoral)(23).

## **VACUNAS CONTRA MORFINA Y SUS ANÁLOGOS ESTRUCTURALES**

Los reportes de inmunoterapias para la adicción a opioides son escasos. Muchos de ellos usan protocolos de vacunación con diferentes modelos estructurales, acoplado al hapteno en diferentes posiciones de la proteína acarreadora. Si bien la mayoría usan básicamente la morfina para la generación de inmunidad, ésta es acoplada covalentemente a diferentes proteínas acarreadoras inmunogénicas, que en conjunto dificultan el análisis de los efectos de los mismos. (Tabla 5)

Las principales aproximaciones experimentales se realizaron en la década de los 70's y estuvieron enfocadas principalmente a la generación de anticuerpos policlonales contra la morfina. Sin embargo, en ninguno de estos reportes se evaluó la cantidad de anticuerpo generado por el procedimiento de vacunación, ni el antagonismo farmacológico basado en anticuerpos dirigidos a atenuar los efectos conductuales de las drogas opiáceas. No obstante, proporcionaron la

suficiente información para el desarrollo de nuevos conjugados inmunogénicos encaminados a atenuar el efecto de diferentes dosis de morfina, heroína y sus metabolitos(23).

**Tabla 5: Vacunas contra morfina/heroína en fase pre-clínica(23).**

AUTOR	HAPTENO	PROTEINA ACARREADORA	ADYUVANTE
Bonnesse (38)	Morfina-6-hemisuccinil	BSA (albumina sérica bovina)	No especificado
Anton y Col (39)(11)	Morfina-6-hemisuccinil	Toxoide tetánico	Alúmina
Li y Col (40)	Morfina-6-glutaril	KLH (keyhole limpet hemocyanin)	Adyuvante de Freund's
Stowe y Cols.(41)	Morfina-6-hemisuccinil	KLH	Alúmina
Raleigh y cols (42)	Morfina	KLH	Adyuvante de Freund's

#### **ANTECEDENTES DE LA VACUNA M-TT**

En los años 70's Bonese y colaboradores(38) estudiaron por primera vez la posibilidad de efectuar un proceso de vacunación activa enfocado al tratamiento de la adicción a la heroína, con lo que demostraron que después de la administración activa de un conjugado de un derivado inmunogénico de la heroína (Morfina-6-hemisuccinato conjugado a BSA como proteína acarreadora) a un mono Rhesus, previamente entrenado para auto administrarse heroína; la respuesta mantenida por este opioide fue selectivamente abolida. Sin embargo, no hubo estudios posteriores en cuanto a otros modelos de vacuna anti opiáceos que no contaran con BSA como proteína acarreadora y que por lo tanto pudieran utilizarse en humanos. No fue hasta el año 2006, cuando un nuevo grupo de investigadores(11)(39) publicó su trabajo, en donde exponían los ensayos y estudios realizados para la

validación a nivel pre-clínico de un nuevo modelo estructural de vacuna anti heroína diseñada para uso clínico en seres humanos.(39)

### **Diseño e Inmunogenicidad de la Vacuna M-TT**

El trabajo de Antón y colaboradores(39) se enfocó en el diseño y síntesis de un modelo de vacuna anti morfina, compuesto por un conjugado inmunogénico para uso en humanos, este modelo de vacuna está formado por la morfina unida de forma covalente al Toxoide Tetánico (proteína altamente inmunogénica y aprobada por la FDA para su uso en seres humanos)(43) que actúa como proteína acarreadora, dando lugar a la vacuna denominada M-TT (Morfina-Toxoide Tetánico), que ha demostrado que en un esquema de inmunización activa es capaz de generar una respuesta inmunológica lo suficientemente robusta como para crear y sostener altos títulos de anticuerpos.

Para la unión del hapteno a la proteína acarreadora se utiliza un brazo espaciador con una longitud aproximada de 20.25 angstroms(39), este brazo espaciador es del doble de tamaño del que comúnmente se utiliza en otros conjugados como Morfina-6-hemisuccinato-BSA. Se ha demostrado que la longitud del brazo espaciador y la manera en que éste está colocado entre la proteína acarreadora y el hapteno (molécula de morfina), no solo separa estas sustancias de manera adecuada, sino que también las orienta en el espacio, de forma tal que el brazo espaciador también ayuda a que el conjugado de la vacuna de M-TT sea altamente inmunogénico.

El brazo espaciador está formado por una cadena de átomos de carbono de baja complejidad estructural, característica que disminuye su papel como

determinante inmunogénico cuando la morfina unida a él es expuesta a las células del sistema inmune.(39)

Se sabe que la vacuna de M-TT es capaz de generar una respuesta inmunológica robusta que genera la producción de altos títulos de anticuerpos antimorfina después de una cuarta revacunación en ratones(39).

Por su naturaleza fisicoquímica la morfina es una sustancia pobremente inmunogénica, es por esto que en los experimentos de estos investigadores (39) los altos títulos de anticuerpos observados fueron resultado del uso del toxoide tetánico como proteína acarreadora en este inmunoconjugado, así también por la naturaleza y longitud del brazo espaciador utilizado en esta síntesis, ya que le confiere a la morfina hapténizada la libertad espacial dentro del conjugado para volverse una vacuna altamente inmunogénica y antigénica para el sistema inmune.(39)

## **Efectos terapéuticos de la Vacuna M-TT**

Debido a su tamaño, los anticuerpos generados por la vacuna de M-TT no pueden pasar la barrera hematoencefálica, por esto se esperaría que los efectos de este tipo de anticuerpos no fueran de naturaleza psicoactiva. Es por esta razón que el uso de la vacuna de M-TT pudiera usarse como una alternativa dentro de la gama de tratamientos relacionados con la adicción y el síndrome de abstinencia por falta de administración de este opioide, donde se utilizan fármacos como la metadona o la buprenorfina los cuales mimetizan la acción de la morfina a nivel de los receptores opioides.(39)

La aplicación de la vacuna de M-TT en unión con los tratamientos farmacológicos existentes, podrían ser útiles para reducir el uso de los sustitutos adictivos, ya que se ha observado que estos desarrollan efectos secundarios nocivos cuando se administran en periodos de tiempo prolongados, lo que influye en que el paciente abandone este tipo de tratamientos y como consecuencia recaiga en el consumo de la morfina o la heroína.(39)

Así mismo, la vacuna de M-TT podría ser usada como terapia alternativa en el tratamiento de la adicción a la morfina/heroína en países donde los fármacos como la metadona o la buprenorfina no están disponibles.(39)

## **Esquema de Inmunización activa convencional: fundamentos y bases inmunológicas.**

Para poder llevar a cabo una inmunización activa con una vacuna conjugada de hapteno, se requieren una serie de pasos, a) el diseño y síntesis de la vacuna conjugada: donde en este caso la morfina tiene que estar unida

químicamente a una proteína acarreadora, esta proteína acarreadora debe poseer una alta masa molecular y ser altamente inmunogénica. Debido a que la morfina/heroína tiene una masa molecular muy pequeña y una estructura molecular relativamente simple son incapaces de estimular a los linfocitos B y con esto generar una respuesta inmunogénica que sea capaz de producir anticuerpos específicos para el reconocimiento de estas drogas de abuso(11).

b) El tiempo que tarda en establecerse la respuesta inmune después de que se administra una formulación del conjugado inmunogénico (vacuna de Morfina/Heroína) (M-TT, vacuna Morfina-Toxoide Tetánico), ésta debe de activar una respuesta inmune humoral en un lapso de 5 a 10 días(5), en la que las células B vírgenes deben ser estimuladas por los determinantes antigénicos del conjugado (complejo proteína acarreadora-hapteno (droga)) y así convertirse en células diferenciadas secretoras de anticuerpos(11).

c) Células B de memoria: algunas de las células B plasmáticas podrían sobrevivir en la médula ósea y continuar produciendo anticuerpos por largos periodos de tiempo. Por otro lado, las células B de memoria, que poseen una vida media larga; podrían ser también obtenidas en una respuesta inmune primaria. Una respuesta inmune secundaria podría ser suscitada solamente si los mismo antígenos de la vacuna M-TT son administrados en repetidas ocasiones y estimulan a las células B de memoria, permitiendo una producción más rápida de cantidades considerables de anticuerpos específicos, como los que fueron producidos durante la respuesta primaria. Durante esta respuesta inmunológica la cantidad de anticuerpos específicos incrementa su concentración, variando de un isotipo a otro (de IgM a IgG), mostrando maduración de la afinidad(5).

d) Número de administraciones: la mayoría de los anticuerpos del tipo IgG, poseen un tiempo de vida media en sangre de entre 3 a 4 semanas; y son generalmente eliminados del organismo cerca de los 21 a 30 días después de la última vacunación. Por lo anterior es necesario administrar en forma periódica la formulación del conjugado inmunogénico, y generar una mayor cantidad de anticuerpos antidroga, y así mantener elevado el nivel de estos anticuerpos circulando en el suero de cada uno de los sujetos de investigación sometidos a dicho esquema de inmunización. Se ha observado con anterioridad que, dentro de los 3 a 6 meses posteriores a la última administración de la vacuna, los niveles de anticuerpos decaen hasta un grado en el cual son indetectables utilizando inmunoensayos (RIAs o las ELISAs)(11).

## **JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen reportes previos de nuestro grupo de investigación(11)(39), en los que se utilizó la vacuna en roedores como modelo de investigación, pero no se ha determinado la dosis necesaria para desarrollar una respuesta inmune que proporcione neuroprotección. Por lo tanto, hace falta realizar estudios de estandarización de dosis y número de aplicaciones de la vacuna M-TT, para obtener una respuesta óptima, que proporcione ambas condiciones: respuesta inmune demostrable, al medir título de anticuerpos antimorfina en suero sanguíneo de ratones inmunizados y neuroprotección comprobable a través de un modelo de analgesia en los mismos ratones.

## **OBJETIVOS**

Determinar la dosis de vacuna M-TT que genere el mayor título de anticuerpos anti-morfina, estimado mediante ensayos inmunológicos de ELISA, y la neuroprotección que los anticuerpos proporcionen, mediante una prueba de analgesia en los mismos animales.

## **HIPÓTESIS**

La administración de la vacuna M-TT en dosis de 100µg generará el mayor título de anticuerpos (el cual se espera sea mayor a 1:100,000 después de la 4<sup>a</sup> inmunización) al ser comparadas con las dosis de 10µg, 25µg, 50µg, 200µg y 400µg. Así mismo, el título de anticuerpos producidos por esta dosis (100µg) presentará una correlación con la actividad neuroprotectora mayor contra la morfina comparada con las otras dosis en las pruebas en vivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población:** Ratones cepa Balb/c

**Muestra:** Se utilizaron 56 ratones Balb/c, hembras, con un peso inicial de 15 a 18 gramos

**Grupos:** Se formaron siete grupos experimentales (n=8), los cuales recibieron los tratamientos especificados en la tabla número 6

**Tabla 6: Grupos Experimentales y Tratamientos**

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Tratamiento (Dosis de cada inmunización M-TT/SSF)</b>
<b>10µg</b>	10µg/100µl
<b>25µg</b>	25µg/100µl
<b>50µg</b>	50µg/100µl
<b>100µg</b>	100µg/100µl
<b>200µg</b>	200µg/100µl
<b>400µg</b>	400µg/100µl
<b>Control</b>	100µl de Solución salina (grupo testigo)

Los ratones fueron alojados en cajas de polisulfonato con dimensiones de 28.7 cm de largo, 17.78 cm de ancho y 12 cm de altura, con tapa de rejilla de acero inoxidable, alojando a 4 ratones cada una, en las instalaciones del Bioterio del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adiciones del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

## **Inmunizaciones:**

La vacuna M-TT fue sintetizada en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente”, consiste en la unión de la morfina (hapteno) con el Toxoide Tetánico (proteína acarreadora) denominando por lo anterior a la vacuna “M-TT”. Esta vacuna se liofilizó y se conservó a 4°C. La administración de la vacuna fue por vía subcutánea, y los sitios de inoculación fueron: en la ingle derecha, en la ingle izquierda, en la base de la cola, en el dorso, y en la zona axilar. No se realizaron dos inmunizaciones en el mismo sitio de administración, debido a que la vacuna contiene hidróxido de aluminio como coadyuvante.

## Cronograma de Actividades

**Tabla 7:** Calendario de Inmunizaciones y Toma de muestras sanguíneas.

DIA	ACTIVIDAD
1	Toma de muestra previa (preinmune) y 1ra vacunación
14	1ra toma de muestra
15	2da vacunación
29	2da toma de muestra
30	3ra vacunación
44	3ra toma de muestra
45	4ta vacunación
59	4ta toma de muestra
60	5ta vacunación
74	5ta toma de muestra
75	6ta vacunación
89	6ta toma de muestra
90	7ma vacunación
105	7ma toma de muestra

La toma de muestra se realizó conteniendo al animal con un cepo. Se realizó una incisión transversal en la cola y se obtuvo por gravedad 200µl de sangre aproximadamente. Las muestras se dejaron en refrigeración (a 4°C) durante 24 horas, después fueron centrifugadas a 4660g's durante 6 minutos con la finalidad de separar el suero del paquete celular.

Utilizando una micropipeta de 100µl se separó el suero y se depositó en microtubos cónicos, etiquetados para su identificación y conservados en congelación (-20°C). El coágulo se desechó. Con los sueros se realizaron

ensayos inmunológicas de ELISA, cuyo objetivo fue el de caracterizar el perfil temporal de expresión de anticuerpos específicos antimorfina.

### **Monitoreo y Cuantificación de los títulos séricos de anticuerpos antimorfina mediante ensayo de ELISA**

La prueba de ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay) se realizó de acuerdo al protocolo estandarizado, utilizado de manera rutinaria en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones, del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente (Anexo 2)(44)

La obtención del título de anticuerpos se realizó mediante el programa estadístico ORIGIN<sup>®</sup>. La obtención del título de anticuerpos se explica en el Anexo 2.

### **Punto de corte del estudio**

El punto de corte escogido para este estudio fue cuando la diferencia entre el coeficiente de variación entre el título de anticuerpos de cada grupo fue de +/- 10% entre inmunizaciones, lo que nos demuestra que la respuesta inmune ya fue montada.

### **Estadística**

Los resultados se procesaron estadísticamente mediante el programa Statistics<sup>©</sup>, utilizando una prueba de ANDEVA de 1 vía; con  $p < 0.001$  se consideró diferencia significativamente.

## **Prueba de desafío: prueba de conducta “TAIL FLICK” O PRUEBA DE ANALGESIA(45).**

Se realizó una prueba de nocicepción por temperatura en los animales experimentales. Prueba de Tail Flick (45) la cual es una prueba basada en el uso de estimulación térmica.

En este tipo de pruebas lo que se estimula es la piel, no se incluyen las vísceras ni el tejido musculoesquelético.

La prueba de tail flick tiene dos variantes: una consiste en aplicar calor radiante a una pequeña superficie de la cola, la otra consiste en sumergir la cola en agua caliente a temperatura conocida.(45)

Fundamento: la aplicación de calor en la cola de un animal provoca un movimiento vigoroso que tiene como fin retirar la cola de la fuente de calor (arco reflejo). El tiempo de reacción en el cual el animal retira la cola es cronometrado, y generalmente va de entre 2 a 10 segundo (lo más común es de 2 a 4 segundos). Es recomendado no mantener la cola expuesta a la fuente de calor por más de 10 a 20 segundos ya que la piel de la cola podría quemarse.(45)

## **Criterios de la Prueba de Analgesia “Tail Flick”**

A cada grupo vacunado con la vacuna M-TT (tabla 6), se le realizó esta prueba.

En ella se crearon 3 subgrupos de prueba

1. **Grupo control:** este grupo está compuesto por animales **naïve**, se midió la latencia basal (la latencia se refiere al tiempo que el animal tarda en retirar la cola del estímulo térmico, y latencia basal se refiere a la respuesta que tiene el ratón a la prueba, en un estado de reposo y sin estímulo farmacológico alguno, esto es, se midió el tiempo que los animales tardaron en retirar la cola del estímulo térmico, sin haber recibido morfina). Después se le midió la latencia en la prueba administrando 100µl de solución salina, vía intraperitoneal (I.P.)
2. **Grupo morfina-1:** este grupo está conformado por los ratones del **grupo testigo** que recibieron solución salina, por vía sub-cutánea, cada 14 días, en 7 ocasiones (el mismo día que se realizaba la administración de las diferentes dosis de vacuna M-TT). El día de la prueba se le midió la latencia basal y durante la prueba se les administró 1mg/kg de morfina I.P., y se realizó la prueba. Después de la administración de la morfina se realizó la prueba en 6 tiempos: 1) Inmediatamente; 2) 10 minutos post-administración; 3) 20 minutos post-administración; 4) 30 minutos post-administración; 5) 40 minutos post-administración y 6) 60 minutos post-administración.
3. **Grupos M-TT:** A los **ratones vacunados** con las diferentes dosis de M-TT se les realizó la prueba de tail flick, siempre respetando el grupo al que pertenecían, es decir, a los grupos de ratones vacunados con cada dosis se le probó de manera independiente. A estos grupos de ratones

se les midió su latencia basal y posteriormente se les administró 1mg/kg de morfina I.P. y se realizó la prueba.

### **Criterios para el análisis de la prueba de Tail Flick**

Para poder analizar esta prueba hay que tener presentes las diferencias entre bloqueo, atenuación y vencimiento

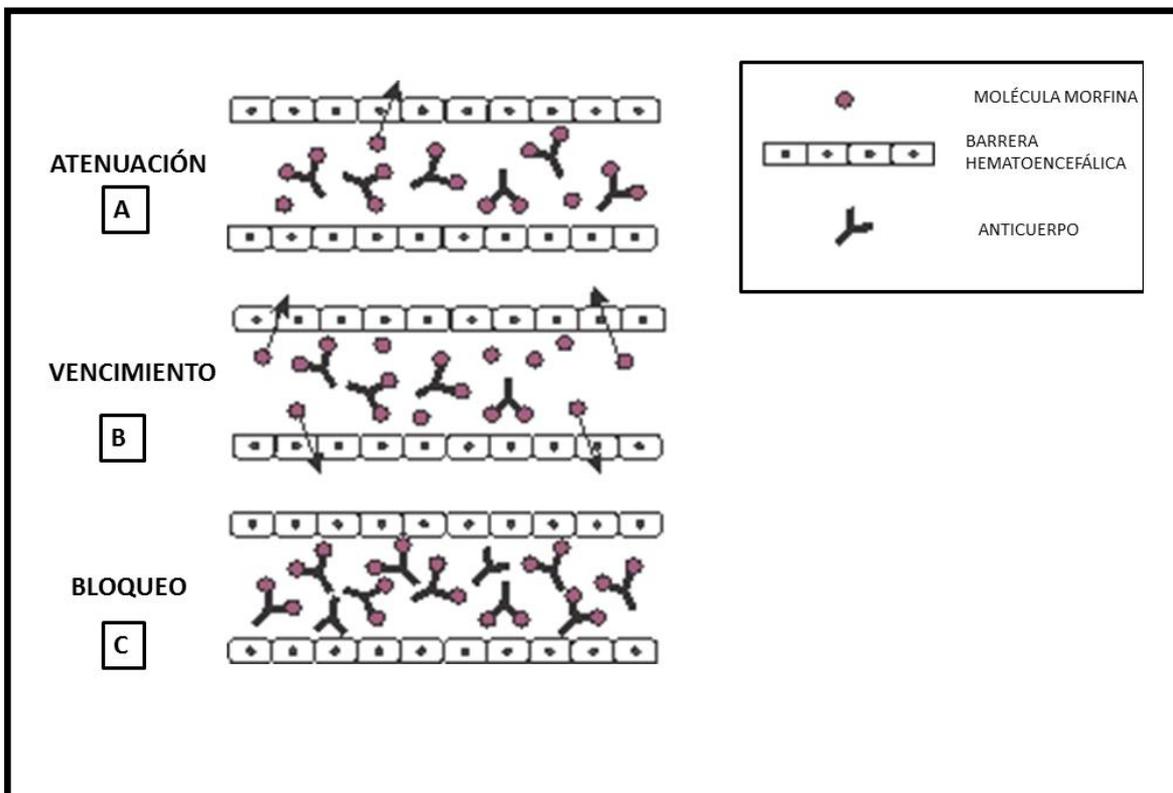
**BLOQUEO:** la relación de moléculas de morfina y de anticuerpos en el torrente sanguíneo es a favor de los anticuerpos por lo tanto estos capturan en su totalidad a las moléculas de morfina, de esta manera no hay un paso de estas moléculas a través de la barrera hematoencefálica, evitando que se desencadene el efecto analgésico. El resultado es que estos sujetos reaccionan como los animales del grupo control, estadísticamente no debe haber diferencias significativas entre el grupo control salina y el grupo inmunizado; y diferencias significativas con respecto al grupo control morfina.

**ATENUACIÓN:** los anticuerpos específicos anti-morfina capturan en el torrente sanguíneo gran parte de las moléculas de morfina administradas, evitando de esta forma que la cantidad de moléculas que atraviesan la barrera hematoencefálica sea suficiente para desencadenar una efecto completo de analgesia en el sujeto de investigación; es decir, el tiempo en el que se refleja el estímulo es mayor a lo observado en el grupo control (grupo D/R control) pero menor a lo observado en el grupo morfina-1, estadísticamente debe haber diferencias significativas entre el grupo inmunizado y los grupos control y morfina-1.

**VENCIMIENTO:** no existe una cantidad suficiente de anticuerpos específicos antimorfina que sean capaces de captar la misma dosis administrada de

morfina, lo que permite el paso de estas moléculas por la barrera hematoencefálica desencadenando un efecto analgésico en el animal. Estadísticamente debe haber diferencias significativas entre el grupo M-TT y el grupo control y no debe haber diferencias significativas con respecto al grupo morfina-1. (Figura 8)

Lo esperado es que haya diferencia significativa entre el grupo M-TT y el grupo control y no haya diferencia significativa con respecto al grupo morfina-1.



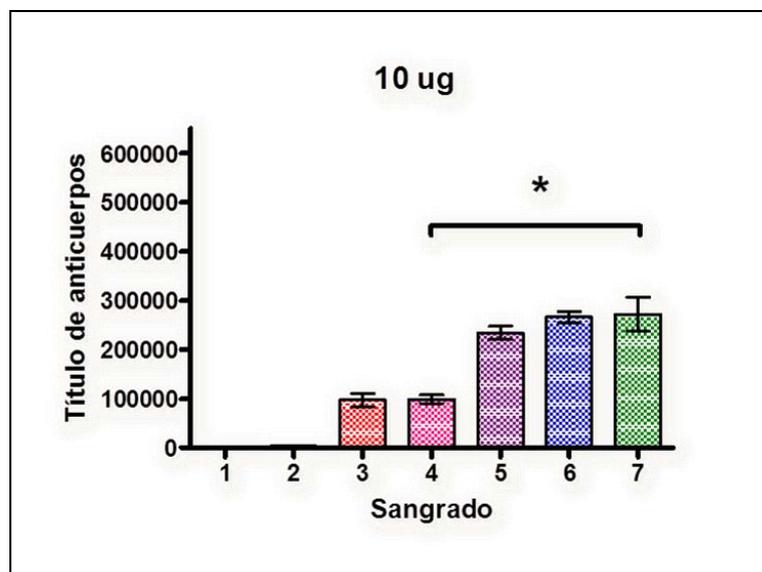
**Figura 8: Representación Gráfica de los Mecanismos de Acción de la vacuna M-TT en contra del efecto analgésico a Morfina:** La vacuna M-TT genera una respuesta inmunológica con producción de anticuerpos; al administrar una dosis de 100µg se obtiene un bloqueo de morfina (dosis 1mg/kg) evitando el paso de esta a través de la barrera hematoencefálica (8C), mientras que la administración de vacuna M-TT en dosis de 50µg y 200µg se obtiene un efecto de atenuación, esto es porque los anticuerpos logran capturar una parte de la sustancia, pero queda otra parte libre para atravesar la barrera hematoencefálica generando un estado limitado de analgesia (8A); finalmente las dosis de vacuna de M-TT de 10µg, 25µg y 400µg, no generan la producción de anticuerpos suficientes para captar la misma dosis de morfina (1mg/kg) observándose un vencimiento del título, lo que permite el paso de la morfina a través de la barrera hematoencefálica lo que se refleja en el efecto analgésico mostrado (8B)

## RESULTADOS

En la prueba de dosis respuesta a  $10\mu\text{g}$  se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos en el tiempo; se aprecia que a partir de la 5<sup>a</sup> inmunización (día 60 de actividad, ver tabla 7) hay un aumento en el título de anticuerpos de manera considerable, el cual se mantuvo después de la 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> inmunización, alcanzando un título máximo de anticuerpos (1:270,000) a la 7<sup>a</sup> vacunación.

### Figura 9

En el análisis estadístico de varianza ANDEVA de una vía, ( $F= (5) 54.84$   $p<0.001$ ), (seguida de prueba de Tukey), se encontró diferencia significativa entre las inmunizaciones 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>, diferencia que no se observó entre la 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> inmunización, lo cual sugiere que a partir de la 5<sup>a</sup> inmunización se estabiliza la respuesta inmune.

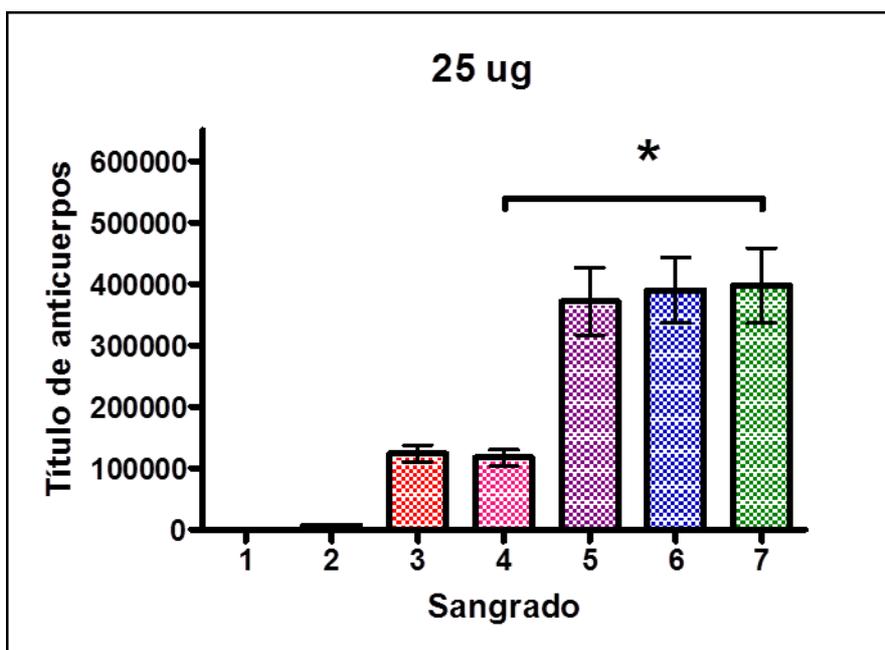


**Figura 9: Promedio de títulos de anticuerpos obtenidos del protocolo del grupo de  $10\mu\text{g}$ .** Los ratones fueron inmunizados con  $100\mu\text{l}$  de vacuna M-TT con una dosis de  $10\mu\text{g}$ , vía subcutánea, 7 inmunizaciones con un intervalo de 14 días entre cada una. Se obtuvieron muestras de sangre a través de la vena central caudal cada 14 días en 8 ocasiones, se separaron los sueros sanguíneos y se les realizó un ensayo de ELISA para determinar el título de anticuerpos contra morfina/heroína. Los resultados muestran un aumento progresivo del título de anticuerpos en cada inmunización, siendo más relevantes entre la 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> inmunización. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=8$ ;  $p<0.001$ , ANDEVA de 1 vía/Tukey). \*NO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

En la prueba de dosis respuesta a 25µg se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos en el tiempo; se aprecia que a partir de la 5ª inmunización (día 60 de actividad, ver tabla 7) hay un aumento en el título de anticuerpos de manera considerable, el cual se mantuvo después de la 6ª y 7ª inmunización, alcanzando un título máximo de anticuerpos (1:400,000) a la 7ª vacunación.

**Figura 10**

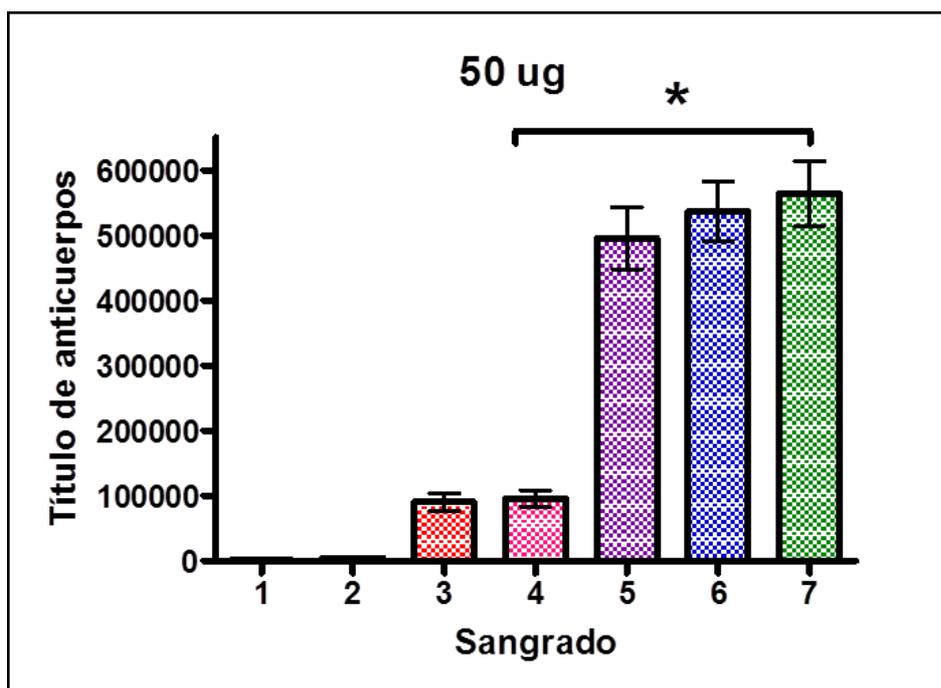
En el análisis estadístico de varianza ANDEVA de una vía, (**F= (5) 22.86 p<0.001**), (seguida de prueba de Tukey), se encontró diferencia significativa entre las inmunizaciones 4ª y 5ª, diferencia que no se observó entre la 5ª, 6ª y 7ª inmunización, lo cual sugiere que a partir de la 5ª inmunización se estabiliza la respuesta inmunogénica.



**Figura 10: Promedio de títulos de anticuerpos obtenidos del protocolo del grupo de 25µg.** Los ratones fueron inmunizados con 100µl de vacuna M-TT con una dosis de 25µg, vía subcutánea, 7 inmunizaciones con un intervalo de 14 días entre cada una. Se obtuvieron muestras de sangre a través de la vena central caudal cada 14 días en 8 ocasiones, se separaron los sueros sanguíneos y se les realizó un ensayo de ELISA para determinar el título de anticuerpos contra morfina/heroína. Los resultados muestran un aumento progresivo del título de anticuerpos en cada inmunización, siendo más relevantes entre la 4ª y 5ª inmunización. Los datos se presentan en promedio ± desviación estándar (n=8; p<0.001, ANDEVA de 1 vía/Tukey). \*NO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

En la prueba de dosis respuesta a 50 $\mu$ g se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos en el tiempo; se aprecia que a partir de la 5<sup>a</sup> inmunización (día 60 de actividad, ver tabla 7) hay un aumento en el título de anticuerpos de manera considerable, el cual se mantuvo después de la 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup>, alcanzando un título máximo de anticuerpos (1:564,000) a la 7<sup>a</sup> vacunación. **Figura 11**

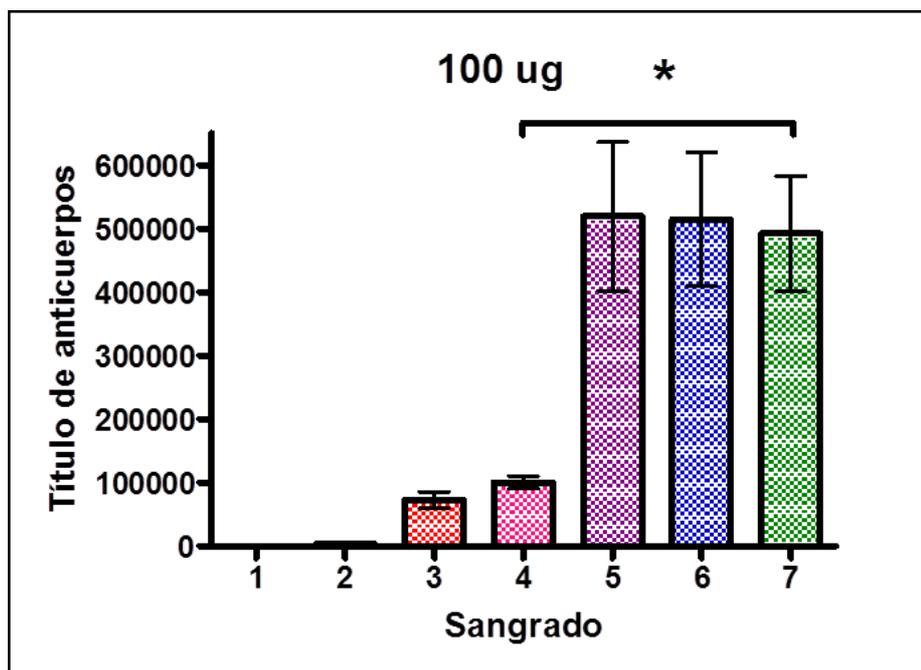
En el análisis estadístico de varianza ANDEVA de una vía, (**F= (5) 68.09 p<0.001**), (seguida de prueba de Tukey), se encontró diferencia significativa entre las inmunizaciones 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>, diferencia que no se observó entre la 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> inmunización, lo cual sugiere que a partir de la 5<sup>a</sup> inmunización se estabiliza la respuesta inmunogénica.



**Figura 11: Promedio de títulos de anticuerpos obtenidos del protocolo del grupo de 50 $\mu$ g.** Los ratones fueron inmunizados con 100 $\mu$ l de vacuna M-TT con una dosis de 50 $\mu$ g, vía subcutánea, 7 inmunizaciones con un intervalo de 14 días entre cada una. Se obtuvieron muestras de sangre a través de la vena central caudal cada 14 días en 8 ocasiones, se separaron los sueros sanguíneos y se les realizó un ensayo de ELISA para determinar el título de anticuerpos contra morfina/heroína. Los resultados muestran un aumento progresivo del título de anticuerpos en cada inmunización, siendo más relevantes entre la 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> inmunización. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8; p<0.001, ANDEVA de 1 vía/Tukey). \*NO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

En la prueba de dosis respuesta a 100µg se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos a través del tiempo; se aprecia que a partir de la 5ª inmunización (día 60 de actividad, ver tabla 7) hay un aumento en el título de anticuerpos de manera considerable, el cual se mantuvo después de la 6ª y 7ª inmunización, alcanzando un título máximo de anticuerpos (1:520,000) a la 5ª vacunación. **Figura 12**

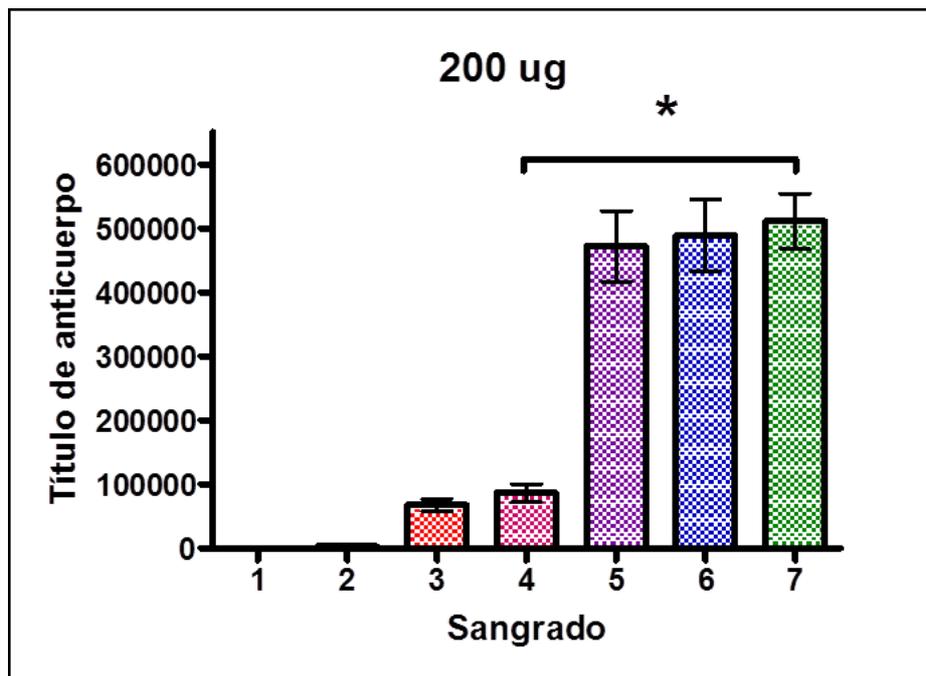
En el análisis estadístico de varianza ANDEVA de una vía, (**F= (5) 24.51 p<0.001**), (seguida de prueba de Tukey), se encontró diferencia significativa entre las inmunizaciones 4º y 5ª, diferencia que no se observó entre la 5ª, 6ª y 7ª inmunización, lo cual sugiere que a partir de la 5º inmunización se estabiliza la respuesta inmunogénica.



**Figura 12: Promedio de títulos de anticuerpos obtenidos del protocolo del grupo de 100µg.** Los ratones fueron inmunizados con 100µl de vacuna M-TT con una dosis de 100µg, vía subcutánea, 7 inmunizaciones con un intervalo de 14 días entre cada una. Se obtuvieron muestras de sangre a través de la vena central caudal cada 14 días en 8 ocasiones, se separaron los sueros sanguíneos y se les realizó un ensayo de ELISA para determinar el título de anticuerpos contra morfina/heroína. Los resultados muestran un aumento progresivo del título de anticuerpos en cada inmunización, siendo más relevantes entre la 4º y 5º inmunización. Los datos se presentan en promedio ± desviación estándar (n=8; p<0.001, ANDEVA de 1 vía/Tukey). **\*NO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA**

En la prueba de dosis respuesta a 200 $\mu$ g se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos en el tiempo; se aprecia que a partir de la 5<sup>a</sup> inmunización (día 60 de actividad, ver tabla 7) hay un aumento en el título de anticuerpos de manera considerable, el cual se mantuvo después de la 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> inmunización, alcanzando un título máximo de anticuerpos (1:510,000) a la 7<sup>o</sup> vacunación. **Figura 13**

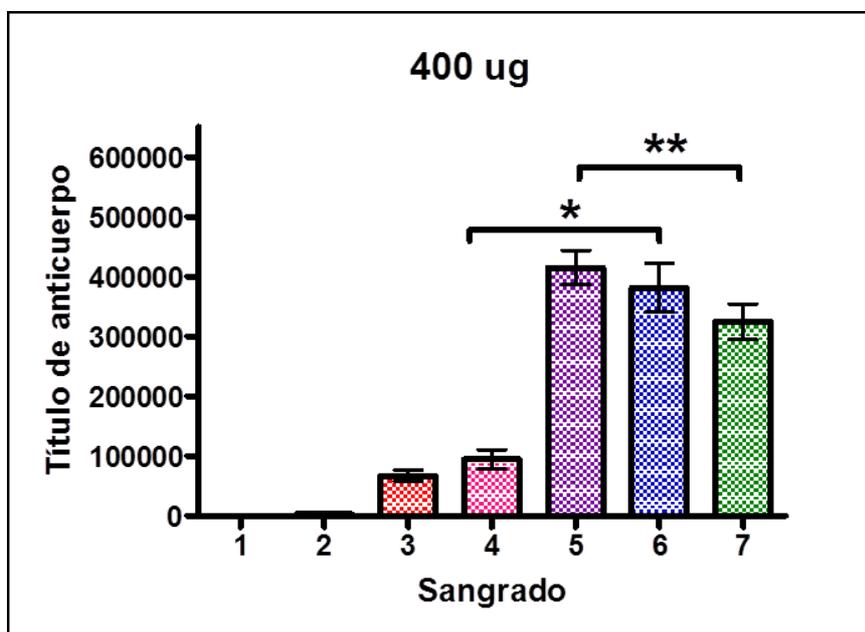
En el análisis estadístico de varianza ANDEVA de una vía, (**F= (5) 49.77 p<0.001**), (seguida de prueba de Tukey), se encontró diferencia significativa entre las inmunizaciones 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>, diferencia que no se observó entre la 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> inmunización, lo cual sugiere que a partir de la 5<sup>o</sup> inmunización se estabiliza la respuesta inmunogénica



**Figura 13: Promedio de títulos de anticuerpos obtenidos del protocolo del grupo de 200 $\mu$ g.** Los ratones fueron inmunizados con 100 $\mu$ l de vacuna M-TT con una dosis de 200 $\mu$ g, vía subcutánea, 7 inmunizaciones con un intervalo de 14 días entre cada una. Se obtuvieron muestras de sangre a través de la vena central caudal cada 14 días en 8 ocasiones, se separaron los sueros sanguíneos y se les realizó un ensayo de ELISA para determinar el título de anticuerpos contra morfina/heroína. Los resultados muestran un aumento progresivo del título de anticuerpos en cada inmunización, siendo más relevantes entre la 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> inmunización. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8; p<0.001, ANDEVA de 1 vía/Tuckey). **\*NO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA**

En la prueba de dosis respuesta a 400µg se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos en el tiempo; se aprecia que a partir de la 5ª inmunización (día 60 de actividad, ver tabla 7) hay un aumento en el título de anticuerpos de manera considerable, el cual disminuyó en la 6ª y 7ª inmunización, alcanzando un título máximo de anticuerpos (1:410,000) a la 5ª vacunación. **Figura 14**

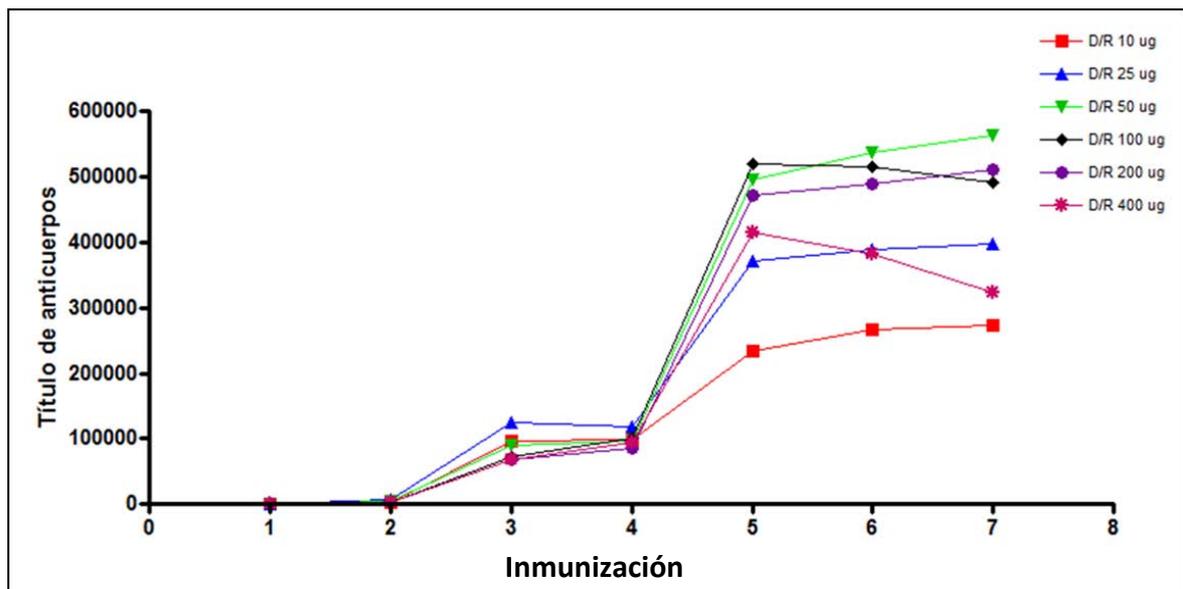
En el análisis estadístico de varianza ANDEVA de una vía, (**F= (5) 62.02 p<0.001**), (seguida de prueba de Tukey), se encontró diferencia significativa entre las inmunizaciones 4ª y 5ª, diferencia que también se observó entre la 5ª, 6ª y 7ª inmunización, lo cual sugiere que a partir de la 5ª inmunización el individuo presenta un estado de saturación del sistema inmune, por lo que se observa un decaimiento en el título de anticuerpos.



**Figura 14: Promedio de títulos de anticuerpos obtenidos del protocolo del grupo de 400µg.** Los ratones fueron inmunizados con 100µl de vacuna M-TT con una dosis de 400µg, vía subcutánea, 7 inmunizaciones con un intervalo de 14 días entre cada una. Se obtuvieron muestras de sangre a través de la vena central caudal cada 14 días en 8 ocasiones, se separaron los sueros sanguíneos y se les realizó un ensayo de ELISA para determinar el título de anticuerpos contra morfina/heroína. Los resultados muestran un aumento progresivo del título de anticuerpos en cada inmunización, siendo más relevantes entre la 4ª y 5ª inmunización. Los datos se presentan en promedio ± desviación estándar (n=8; p<0.001, ANDEVA de 1 vía/Tuckey). \*Diferencia significativa entre 4 y 5º sangrado; \*\* Diferencia significativa entre 5º, 6º y 7º sangrados.

En la figura 15 se muestra el comparativo del promedio del título de anticuerpos de todos los grupos vacunados con diferentes dosis.

### RESULTADOS TITULO DE ANTICUERPOS DIFERENTES GRUPOS VACUNADOS CON LA VACUNA M-TT (DIFERENTES DOSIS)



**Figura 15:** Comparativo entre los grupos de la vacuna M-TT inmunizados con diferentes dosis, en la gráfica podemos observar el título de anticuerpos en los sueros obtenidos después de cada inmunización, el intervalo entre inmunizaciones fue de 14 días.

## Resultados de la Prueba de Tail Flick

Se realizó una prueba *in vivo* de manera individual a los animales vacunados con las diferentes dosis del inmunoconjugado de M-TT, esta prueba consistió en exponer a la cola del animal a una fuente de calor y medir el tiempo que tarda en retirar la cola de este estímulo (la latencia basal), después de esto se le administró a cada grupo un tratamiento diferente. El grupo **control** fueron animales naïve a los que después de medirles la latencia basal se les administro solución salina vía peritoneal (I.P) y se les midió el tiempo que tardaron en retirar la cola del estímulo térmico en los siguientes tiempos: 0 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos y 60 minutos después de la aplicación de solución salina. Se graficó el promedio de estos resultados tanto de su latencia basal como de su latencia en prueba (en todos los puntos de medición). En este grupo se observó que no hay diferencia entre la latencia basal y la latencia en la prueba, (figuras 16A, 16B, 16C, 16D, 16E, 16F)

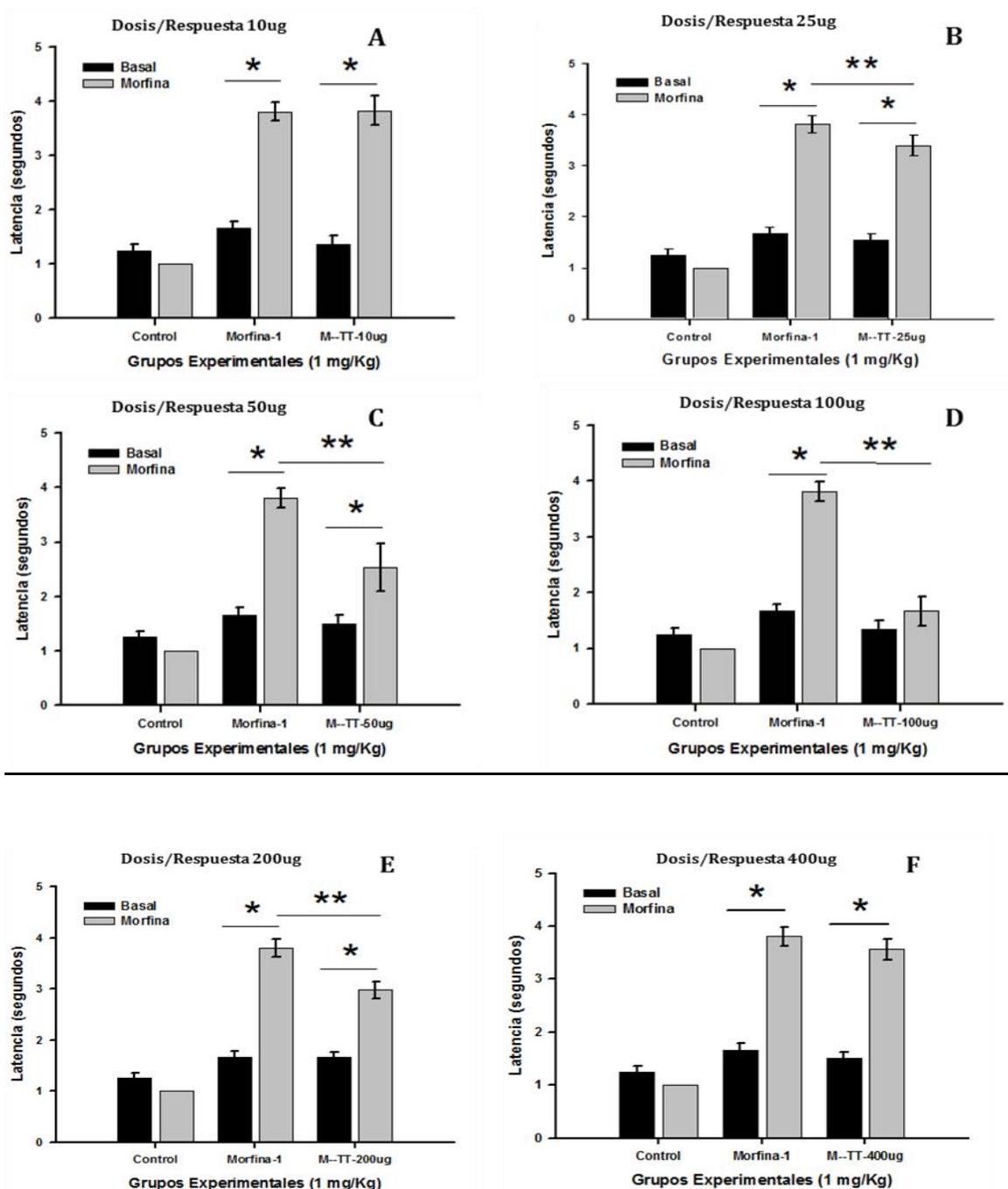
Este mismo procedimiento se realizó con los otros dos grupos, **el grupo morfina-1** (ratones del grupo testigo, administración de solución salina fisiológica, vía S.C., cada 14 días, el mismo día que la vacunación de los grupos de diferentes dosis de vacuna M-TT) el cual después de haberse medido su latencia basal se le administró 1mg/Kg de morfina vía I.P y se midió su latencia en la prueba, bajo los mismo parámetros descritos anteriormente. En este grupo observamos una diferencia significativa entre el promedio de la latencia basal y el promedio de la latencia obtenida en la prueba (Figuras 16A, 16B, 16C, 16D, 16E y 16F)

Finalmente, los **grupos vacunados (grupos M-TT)**, a los cuales después de la medición de su latencia basal se les administro 1mg/Kg de morfina I.P. y se les aplicó la prueba ya descrita, observándose lo siguiente

**Grupos M-TT 10µg, 25µg y 400µg:** Se observó diferencia significativa entre la latencia basal y la latencia de la prueba (integruo) y no se observó diferencia entre los resultados de estos grupos y los resultados del grupo Morfina-1 (intergrupos)(figuras 16A, 16B y 16F)

**Grupos M-TT 50µg y 200µg:** Se observó diferencia significativa entre la latencia basal y la latencia de prueba (Figura 16C y 16E)

**Grupos M-TT 100µg:** se observó que no hay diferencia significativa entre la latencia basal y la latencia de la prueba, sin embargo observamos diferencia significativa con el grupo morfina-1 (figura 16D)



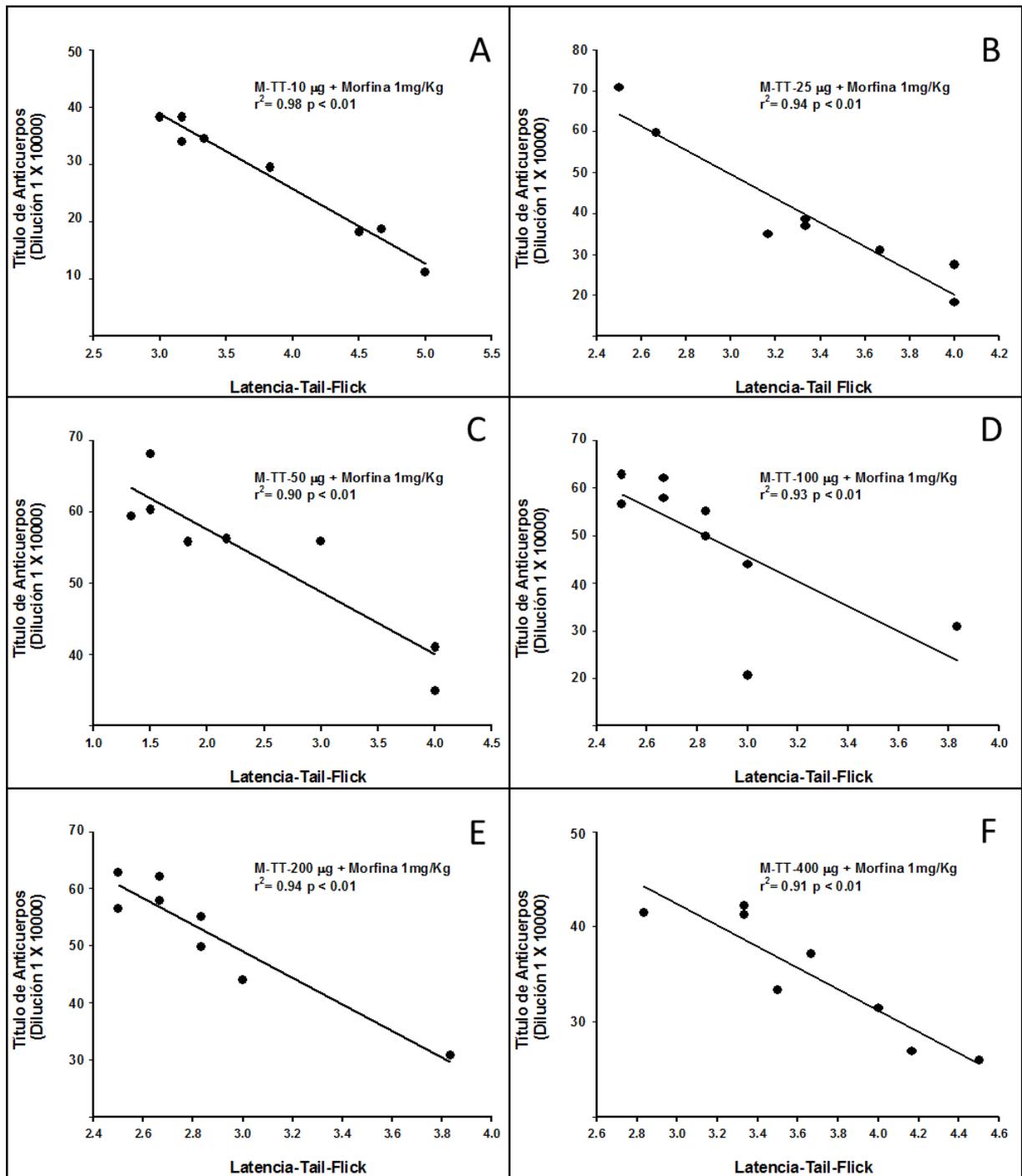
**Figura 16: Prueba de Tail Flick aplicada a los animales inmunizados con diferentes dosis de la vacuna M-TT.** A los animales previamente vacunados se les realizó una prueba de Tail Flick, administrándoles por vía intraperitoneal 1mg/kg de morfina. En el grupo de 10 $\mu$ g (A), 25 $\mu$ g (B) y 400 $\mu$ g (F) no se observa diferencia significativa entre los animales pertenecientes al grupo morfina-1 y los animales vacunados con la vacuna M-TT. En el grupo de 50 $\mu$ g (C) y 200 $\mu$ g (E) se observa atenuación de la respuesta significativa entre el grupo de Morfina-1 y el grupo de animales vacunados con la vacuna M-TT. En el grupo de 100 $\mu$ g (D) se observa diferencia significativa en la capacidad de bloqueo de la perfusión de morfina a través de la barrera hematoencefálica llegando al cerebro, pues los ratones se comportaron de manera similar a los animales pertenecientes al grupo control. Los datos se presentan en promedio +/- desviación estándar (n=8; p<0.005 ANDEVA de 1 vía/Tukey.). \* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA INTERGRUPO \*\* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE GRUPOS.

## RESULTADOS DE LA PRUEBA DE CUADRADO DE PEARSON

Con los datos de los títulos de anticuerpos de los diferentes grupos experimentales vacunados con la vacuna M-TT obtenidos mediante los Ensayos de ELISA, y los datos obtenidos de las pruebas *in vivo* (Tail Flick), se realizó una prueba de correlación de Pearson en la cual se promedió de todos los tiempos obtenidos en la prueba de Tail Flick de cada animal y se comparó con el título máximo de anticuerpos obtenidos de cada animal.

En la figura 17 podemos observar la correlación entre la latencia de la prueba de Tail Flick (los segundos que duro la prueba) contra el título máximo de anticuerpos de cada grupo experimental. Cada uno de los puntos representa el promedio de la latencia obtenida en cada uno de los puntos probados durante el experimento: 0 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos y 60 minutos, estos se promediaron y se graficó contra su título máximo de anticuerpos.

Se observó en todos los grupos experimentales M-TT 10 $\mu$ g ( $r^2=0.98$   $p < 0.01$ ), M-TT 25 $\mu$ g ( $r^2=0.94$   $p < 0.01$ ), M-TT 50 $\mu$ g ( $r^2= 0.90$   $p < 0.01$ ), M-TT 100 $\mu$ g ( $r^2= 0.93$   $p < 0.01$ ), M-TT 200 $\mu$ g ( $r^2= 0.94$   $p < 0.01$ ) y M-TT 400 $\mu$ g ( $r^2= 0.91$   $p < 0.01$ ), observamos que hay una correlación del promedio de los tiempos de la latencia de prueba de Tail Flick y el título máximo de anticuerpos de cada animal), por lo tanto podemos concluir que el resultado obtenido en la prueba de Tail Flick está determinado por el título de anticuerpos producidos por la vacuna M-TT y no por otros factores externos.



**Figura 17: Correlación de Pearson entre Título de Anticuerpos anti-Morfina/Heroína y la Latencia Obtenida en la Prueba de Desafío *in vivo*, “Tail Flick”.** Con los datos de los títulos de anticuerpos de los diferentes grupos experimentales obtenidos mediante los Ensayos de ELISA, y los datos obtenidos de las pruebas In Vivo (tail Flick), se realizó una prueba de correlación de Pearson, en la cual observamos correlación entre el título de anticuerpos contenidos en el suero y la latencia de la prueba de Tail Flick, grupo M-TT 10µg (A), M-TT 25 µg (B), M-TT 50 µg (C), M-TT 100 µg (D), M-TT 200 µg (E) Y M-TT 400 µg (F).

## DISCUSIÓN

La adicción a opioides se ha conservado a través de los años y aunque el consumo no supera al de otras drogas como lo son la cocaína y la marihuana, todavía es un problema grave de salud pública, por lo que se debe de implementar un tratamiento integral para apoyar a las personas que padecen de esta adicción. Es importante tomar en cuenta que según la Encuesta Nacional de Adicciones 2008 casi el 1% de la población de entre 12 y 65 años es adicta a la heroína/morfina, lo cual no solo es un problema de salud, sino que también repercute en el ámbito económico ya que esta adicción afecta al desempeño laboral de las personas que la padecen y tenemos que tomar en cuenta que la edad donde la población es económicamente activa es entre los 16 y 65 años, por lo que el 1% de individuos afectados están en su mayoría dentro de este rango, y al no poder trabajar por su adicción retrasan el desarrollo económico del país.

En este trabajo se demostró que la vacuna M-TT favorece la producción de anticuerpos anti morfina/heroína. La dosis utilizada tiene un papel importante en la generación de los anticuerpos anti morfina/heroína puesto que cuando se utilizó la dosis de 10 $\mu$ g (figura 9) se encontraron anticuerpos anti morfina/heroína en sangre en títulos inferiores a los encontrados en las dosis 25 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g y 400 $\mu$ g.

La dosis de 25 $\mu$ g (figura 10) favoreció la producción de anticuerpos anti morfina/heroína de manera menos eficiente que las dosis de 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g y 200 $\mu$ g que fueron similares entre sí. Mientras que la dosis de 400 $\mu$ g fue menos eficiente incluso que la de 25 $\mu$ g.

La dosis de 10 $\mu$ g probablemente fue insuficiente para generar una respuesta inmune humoral por Ignorancia Inmunológica, debido a la escasa cantidad de antígeno en el organismo. La Ignorancia Inmunológica es la incapacidad del organismo para reconocer un antígeno, y está relacionada a la cantidad de antígeno que se presenta en el organismo; si esta cantidad es mínima el organismo no reconoce a este antígeno como importante.(46)

Por otro lado, la dosis de 400 $\mu$ g (figura 14) tampoco estimuló una respuesta inmune humoral efectiva, en este caso probablemente se generó un proceso de tolerancia inmunológica a causa de la gran cantidad de antígeno presentado(5). Cuando el sistema inmunitario reconoce un antígeno, puede desarrollar una reacción inmunitaria o entrar en un estado de falta de respuesta llamado tolerancia. El desarrollo de inmunidad o tolerancia, que incluyen el reconocimiento específico de antígeno por células T o B reactivas a antígenos, deben regularse de manera cuidadosa ya que una respuesta inapropiada, sea por inmunidad a antígenos propios o tolerancia a un posible patógeno, puede tener consecuencias serias, incluso poner en peligro la vida (47), la tolerancia también puede inducirse por antígenos solubles (5). Para mantener la tolerancia es necesaria la persistencia del antígeno.(5)

Con respecto a las dosis de 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g y 200 $\mu$ g (figuras 11, 12 y 13) no se observó diferencia significativa entre los títulos de anticuerpos, a pesar de esto, en la prueba de Tail Flick si se observaron diferencias significativas entre estos grupos (figura 16), esto probablemente se deba a que los anticuerpos generados con las dosis 100 $\mu$ g posean una avidéz superior a los generados con las dosis de 50 $\mu$ g y 200 $\mu$ g, sin embargo se requiere realizar un estudio para demostrar esta teoría.

A los resultados obtenidos se les aplicó una prueba de correlación de Pearson (Figura 17), observándose en todos los grupos correlación entre el título de anticuerpos y los resultados obtenidos en la prueba de desafío (Tail Flick). Esto implica que los resultados de la prueba de bloqueo de la antinocicepción inducida por la morfina dependen de la cantidad de anticuerpos específicos contra esta sustancia, los cuales se encuentran en el torrente sanguíneo de los animales inmunizados.

En los animales inmunizados con la vacuna M-TT 10 $\mu$ g ( $r^2=0.98$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 17A), M-TT 25 $\mu$ g ( $r^2=0.94$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 17B) y M-TT 400  $\mu$ g ( $r^2=0.91$ ,  $p < 0.01$ )(Figura 17F) los títulos de anticuerpos obtenidos no fueron los adecuados para captar suficientes moléculas de morfina, por lo que se observó vencimiento del título de anticuerpos lo cual se traduce en falta de neuroprotección contra la sustancia (Figuras 9 y 16A, 9 y 16B, 13 y 16F).

En los animales inmunizados con la vacuna M-TT 50 $\mu$ g ( $r^2=0.90$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 17C) y M-TT 200 $\mu$ g ( $r^2=0.94$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 17E), los títulos de anticuerpos obtenidos fueron suficientes para crear una atenuación de la respuesta del organismo a la sustancia administrada en el prueba de desafío (Figura 11 y 16C, 13 y 16E).

En los animales inmunizados con la vacuna M-TT 100 $\mu$ g ( $r^2=0.93$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 17D) el título de anticuerpos obtenido fue suficiente para crear un bloqueo de la perfusión hacia el cerebro de la sustancia administrada (Figura 12 y 16D).

Lo anterior nos demuestra que a mayor título de anticuerpos hay una neuroprotección más eficaz, ya que la finalidad de los anticuerpos es captar a

las moléculas de morfina (y de sus análogos estructurales) en el torrente sanguíneo y de esta manera no permite que pasen a través de la barrera hematoencefálica, evitando así la unión a los receptores  $\mu$ , por lo tanto los cambios plásticos necesarios para el desarrollo de un proceso adictivo no se dan. Es importante resaltar que la adicción a sustancias de abuso es dosis dependiente, así como recordar que la dosis analgésica es 10 veces más grande que la dosis adictiva. **Figura 8**

## CONCLUSIONES

La dosis de vacuna M-TT de 100 µg por inmunización, por vía subcutánea y con un número de reinmunizaciones de 5 a 7 es la más eficaz para desarrollar un título de anticuerpos que sea neuroprotector contra la morfina, así mismo se observó que es la dosis que necesitó un menor número de inmunizaciones para alcanzar su título máximo de anticuerpos

Por lo tanto la hipótesis de este trabajo es aceptada.

## PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas *in vitro* de afinidad de los anticuerpos (ensayos de competencia)
- Realizar un estudio a largo plazo en donde podamos observar no solo la adquisición del título de anticuerpos sino su cinética de decaimiento a través del tiempo.
- Estudiar las células estimuladas por esta vacuna, poniendo principal interés en si existe estimulación de células B de memoria.
- En el futuro se deben aplicar pruebas de seguridad en ratones. Estudio de toxicidad aguda, subaguda y crónica de la vacuna M-TT
- Realizar pruebas de seguridad y eficacia de la vacuna M-TT en primates no humanos.
- Conociendo los resultados de seguridad y eficacia en primates no humanos se podrá escalar la investigación a fase clínica.

## **APORTACIONES**

Mediante los resultados obtenidos en este trabajo se estableció que para futuras pruebas de la vacuna M-TT en ratones, se debe utilizar la dosis de 100µg por inmunización, por vía subcutánea, y con un número de reinmunizaciones de 5 a 7.

## **ANEXOS**

ANEXO 1 Protocolos experimentales: Ensayo de ELISA

## ANEXO 1

### **Prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) y obtención de títulos de Anticuerpos**

Es una prueba de unión primaria que detecta el enlace específico antígeno-anticuerpo y cuantifica los inmunocomplejos formados mediante un marcador enzimático que actúa con un sustrato cromogénico apropiado. El grado de transformación del sustrato incoloro a un producto coloreado se cuantifica objetivamente por espectrofotometría y es proporcional a la cantidad de inmunocomplejos formados. Las ventajas de la técnica de ELISA son numerosas: es un método muy sensible, de bajo coste y fácil manejo, versátil. Además de que suele desarrollarse en placas de 96 pocillos (placas de microtitulación), es capaz de realizar un gran número de determinaciones en un corto periodo de tiempo. Esta técnica suele ofrecer un buen equilibrio entre sensibilidad y especificidad además de una buena repetibilidad en los resultados.(4)

Existen varios tipos de ELISA's, el que se uso fue el **ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos específicos.**(4)

**Fundamento:** Detección de anticuerpos específicos de manera indirecta. Esta técnica consiste en hacer reaccionar en pozos de placas de ELISA, en cuyas paredes se fija previamente la fase sólida con el hapteno, la muestra biológica conteniendo los anti-cuerpos contra la sustancia en cuestión con anticuerpos anti especie IgG peroxidados (con peroxidasa de rábano). Para visualizar la reacción se adiciona un sustrato cromogénico con el fin de que se desarrolle color para poder ser detectado en un espectrofotómetro bajo ciertas longitudes de onda ( $\lambda$ ). (4)

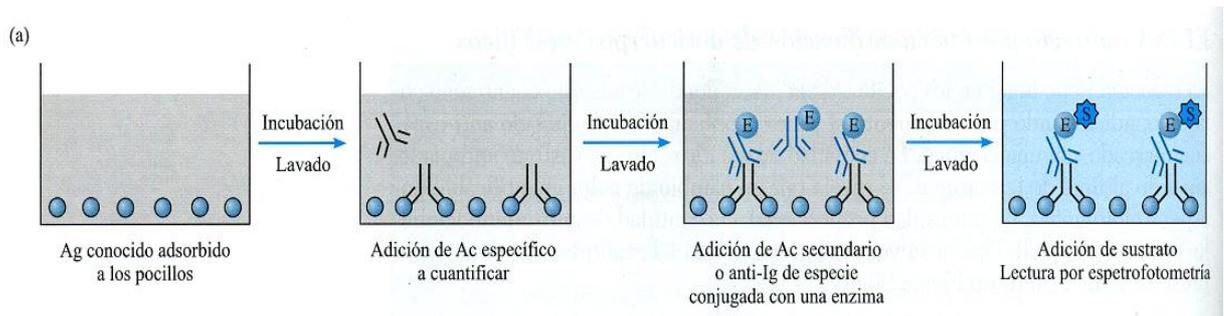


Figura 18: Ensayo de ELISA por captura de Anticuerpo.(4)

## Protocolo General para realizar el ensayo de ELISA por captura de Anticuerpo

### 1er. Día

- Preparar un buffer de fosfatos (PBS), utilizando Fosfato Dibásico de Sodio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Fosfato monobásico de Sodio  $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}$ , y Cloruro de Sodio  $\text{NaCl}$  al 0.1 M pH = 8-8.5
- La fase sólida debe ir a una concentración de 1  $\mu\text{g}$  por pozo y debe ir disuelta en 100  $\mu\text{l}$  de PBS 0.1 M pH 8-8.5. Para una placa de 96 pozos se debe tomar la equivalencia de 100  $\mu\text{g}$  de BSA-Mor y disolverla en 10000  $\mu\text{l}$  de PBS 0,1 M. Se administra por pozo--1  $\mu\text{g}$  de BSA-Mor/100 $\mu\text{l}$ /pozo. Se incuba la fase sólida por 12 horas a 4 °C.
- En el lapso en que se está incubando la fase sólida se prepara un buffer PBS de ELISA pH = 7.4, **BUFFER:** Para un litro de buffer: 3.1 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado. 10.9 g de fosfato dibásico de sodio anhidro. 9 g de cloruro de sodio y en este momento ajustar el pH, después se le agrega 3 ml de Tween 20, y 10 ml de gelatina de teleósteo. Este buffer debe estar frío a la hora de usarse.

## 2do Día

- Al finalizar el tiempo de incubación se realizan 5 lavados de la placa con el buffer PBS de ELISA. Después del último lavado se dejan todos los pozos llenos de buffer con el fin de realizar el bloqueo de los pozos. Este procedimiento tiene una duración de 1 hora en movimiento a temperatura ambiente.
- Durante esta hora se preparan diferentes diluciones del suero de ratón, las cuales se diluirán en PBS 7.4. Las diluciones usadas (1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1'000,000) se preparan a razón de hacer triplicados de 100 µl por cada pozo. Como controles se utiliza un tren preinmune que consiste en diluir el suero del sangrado previo a la primer inmunización, a una concentración de 1:100, el objetivo de este control negativo es determinar si hay una señal debido al reconocimiento de anticuerpos inespecíficos que reconozcan tanto a la proteína, el brazo espaciador o el antígeno en sí y los resultados que obtengamos de los sueros obtenidos después de cada vacunación sean falsos positivos. También se requiere otro control negativo que consiste en solo agregar buffer (blanco).
- Una vez transcurrida la hora de bloqueo se descarta la solución y se ponen las diluciones de acuerdo a un esquema que previamente se estableció. La placa estará compuesta entonces de las diluciones de los sueros de ratón, un preinmune y un blanco. Siempre 100 µl de solución por pozo. Se deja incubar 12 horas a 4 °C

### 3er Día

- Transcurrido el tiempo se hacen 5 lavados con buffer PBS 7.4.
- Se descarta el buffer y se agrega el anticuerpo secundario peroxidado especie específico (SIGMA-ALDRICH), en una dilución 1:5,000 en PBS. Se coloca 100 µl por pozo. Se deja incubar 2 horas en movimiento a temperatura ambiente.
- Transcurrido el tiempo se hacen 5 lavados con PBS.
- Y durante este tiempo se prepara la solución del sustrato, que en este caso es OPD (orto-fenildiamino), el cual debe ir a una concentración de 0.4 mg/ml. Este reactivo es fotosensible, por lo cual debe hacerse en condiciones de luz tenue para que directamente no incida la luz sobre él, hay que tomar las precauciones necesarias para la aplicación a la placa y asegurar que todos los pozos que utilizamos tengan este reactivo, una vez agregada la solución se envuelven las palcas en papel que no deje pasar la luz como el papel aluminio y se deja incubar 20 al cual transcurrido este se hará la primer lectura.

Los valores de absorbancia se toman de un lector de placas BioTek modelo Epoch a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de referencia de 620 nm. La de medición se realiza a 492 nm, la duración de la medición es de 30 segundos. Se realizan dos lecturas por placa, una a los 20 minutos y otra a los 60 minutos, para ver la tendencia que tienen las lecturas con el paso del tiempo, es decir, la tendencia debe ser la misma, aunque la absorbancia sea mayor de acuerdo a la cinética de la reacción propia de la peroxidasa con el OPD.

- Una vez transcurrido este tiempo se procede a desechar la placa en los contenedores adecuados.

- Finalmente se gráfica y analiza los resultados.

## Gráfica

La gráfica que resulta de hacer las operaciones pertinentes (promedio y resta del preinmune por dilución) es de una forma sigmoide inversa y semilogarítmica, puesto que las diluciones van de de 1:100 a 1:1 000 000, es decir, el primer valor comenzará en 100 en el eje de las abcisas y la absorbancia resultante de la medición y promedio del triplicado correspondiente en el de las ordenadas, y correspondientemente irá disminuyendo con el paso de la dilución hasta construir la gráfica. El título corresponderá a obtener el 50% de la absorbancia máxima de la muestra, la que resulte de la dilución 1:100, se desplaza a la derecha hasta encontrar la curva y se desciende hasta el eje X, ese será el título de anticuerpos correspondiente a la muestra analizada. En el ejemplo se observa un título de anticuerpos entre 1:50 000 y 1:60 000 el cual se determina con exactitud con el programa “microcal origin ®”

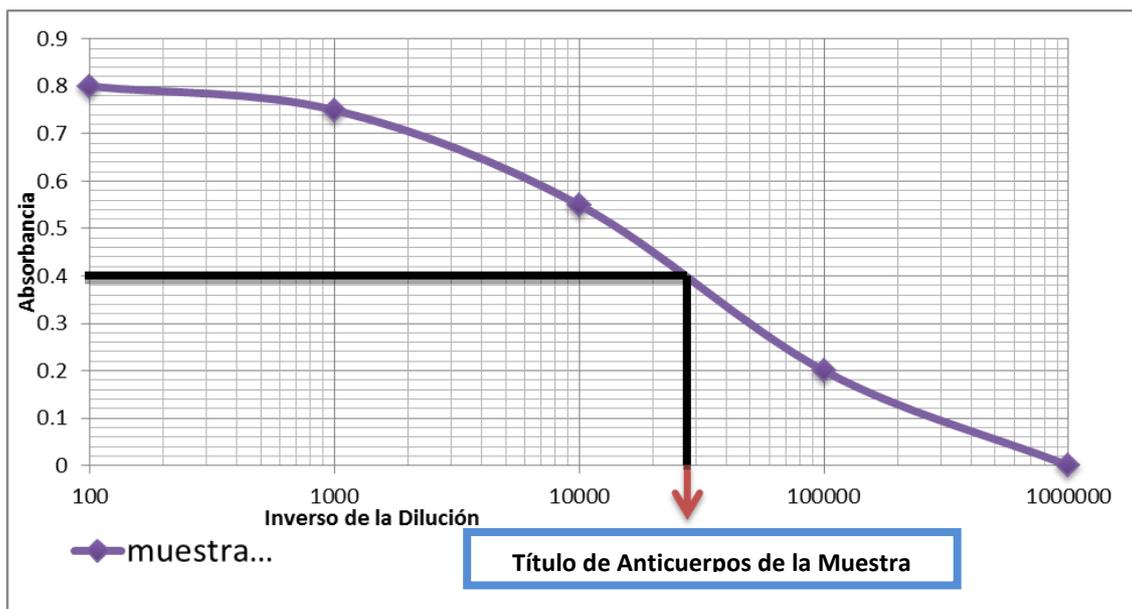


Figura 19: Ejemplo de la obtención de títulos de anticuerpos

La forma de reportar los datos, es generalmente en el promedio de las muestras en gráficas de barras donde se puede ver claramente el comportamiento de los anticuerpos en función del tiempo, es decir, entre vacunaciones es importante saber cómo va ascendiendo el título de anticuerpos por grupo de trabajo. La dispersión resultante de promediar los títulos de anticuerpos por grupo representa en gran medida la variabilidad biológica, si bien en cada  $n$  estadísticamente representativa debe haber generalmente un animal que su comportamiento sea bajo y otro alto, muchas veces no sucede esto. También intervienen variables, como son los reactivos y el experimentador (interexperimentos e interdías)

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Encuesta Nacional de Adicciones. Mexico; 2008.
2. EMCDDA Anual Report 2006. Lisbon; 2006.
3. OEDT Informe Anual 2008. Luxemburgo; 2008.
4. Gomez L, Del Mar B, Domenech A. Manual de Inmunología Veterinaria. 1a edición. Madrid: Pearson Prentice Hall; 2006.
5. Abbas A, Litchman A, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. 6a edición. Elsevier Saunders; 2008.
6. Gutierrez J. Inmunología Veterinaria. 1a ed. Mexico: Manual Moderno; 2010.
7. Kind T, Goldsby R, Osbourne B. Inmunología de Kubi. 6a ed. México: McGraw Hill; 2007.
8. Salinas M. Inmunología Medica. Mexico: McGraw Hill; 2007.
9. Kuhn C, Swartzwelder S, Wilson W. Drogas. 1a ed. Mexico: Editorial Debate; 2011.
10. Hardman J, Limbird L. The pharmacological Bases of Therapeutics. New York, NY: McGraw Hill; 2001.
11. Anton B, Salazar A, Flores A, Matus M, Marin R, Hernandez J. Vaccines against morphine / heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors. 2009;5(4):214–29.
12. Uriarte B. Psicofarmacología. 6a ed. Mexico: Editorial trillas; 2009.
13. Rahim R, Feng P, Meissler J, Rogers T, Eisenstein T. Paradoxes of immunosuppression in mouse models of withdrawal. J Neuroimmunol. 2004;147:114–20.
14. Nelson C, Dykstra L, Lysle D. Comparison of the time course of Morphine's Analgesic and Immunologic Effects. Anesth Analg. 1997;85:620–6.
15. Roy S, Wang J, Charboneau R, Barke R. Morphine Induces CD4+ T cell IL-4 Expression through an Adenylyl Cyclase Mechanism Independent of the Protein Kinase A Pathway. J Immunol. 2005;175:6361–7.
16. Mojadadi S, Jamali A, Khansarinejad B, Soleimanjahi H, Bamdad T. Acute Morphine Administration Reduces Cell-Mediated Immunity and Induces Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 in BALB/c Mice. Cell Mol Immunol. 2009;6(2):111–6.

17. Wang J, Charboneau R, Balasubramanian S, Barke R, Loh H, Roy S. Morphine modulates Lymph node-derived T lymphocyte function: role of caspase-3,-8 and nitric oxide. *J Leukoc Biol.* 2001;70:527–36.
18. Alonzo N, Bayer B. Antagonism of N-Methyl-D-aspartate Receptors Reduces the Vulnerability of the Immune System to Strees after Chronic Morphine. *J od Pharmacol Exp Ther.* 2003;307:793–800.
19. Inturrisi C, Schultz M, Shin S, Umans J, Angel L, Simon E. Evidence from opiate binding studies that heroin acts through its metabolites. *Life sci.* 1983;33:773–6.
20. Salazar V, Peralta R. *Tratado de Psicofarmacología, Bases y aplicación clínica.* 2a ed. Medica Panamericana; 2009.
21. Moreno A, Janda K. Immunopharmacotherapy: vaccination strategies as a treatment for drug abuse and dependence. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;92 (2):199–205.
22. Florez Jesus. *Farmacología humana.* 3a edición. Barcelona: Masson, S.A.; 1998.
23. Salazar-juárez A, Méndez SB, Ivone M, Alonso F, Miramontes RH, Ochoa ER, et al. Nuevas vacunas contra la morfina / heroína. 2013;36(3):219–27.
24. Shen X, Kosten TR. Immunotherapy for drug abuse. *CNS Neurol Disord Drug Target.* 2011;10(8):876–9.
25. Shorter D, Kosten TR. Novel pharmacotherapeutic theatments for cocaine addiction. *BCM Med.* 2011;9:119.
26. Kinsey BM, Kosten TR, Orson FM. Active Immunotherapy for the treatment of cocaine Dependence. *Drugs Futur.* 2010;35(4):301–6.
27. Raupach T, Hoogsteder P, Onno Van Schayck C. Nicotine vaccines to assit with smoking cessation: current status of research. *Drugs.* 2012;72(4):1–16.
28. Kitchens C, Foster S. Nicotine conjugate vaccines: A novel approach in smoking cessation. *J Am Pharm Assoc.* 2012;52(1):116–8.
29. Fahim R, Kessler P, Fuller S, Kalnik M. Nicotine vaccines. *CNS Neurol Dosord Drug Targets.* 2011;10(8):905–15.
30. Stowe GN, Schlosburg JE, Vendruscolo LF, Edwards S, Misra KK, Schulteis G, et al. Developing a Vaccine Against Multiple Psychoactive Targets : A Case Study of Heroin. 2011;1–11.
31. Carrera MRA, Kaufmann GF, Mee JM, Meijler MM, Koob GF, Janda KD. Treating cocaine addiction with viruses. 2004;101(28).

32. Carrera MR a, Meijler MM, Janda KD. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2014 Mar 27];12(19):5019–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351386>
33. Carrera MR a, Ashley J a, Hoffman TZ, Isomura S, Wirsching P, Koob GF, et al. Investigations using immunization to attenuate the psychoactive effects of nicotine. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2004 Feb [cited 2014 Mar 27];12(3):563–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089603008137>
34. Haney M, Kosten TR. Therapeutic vaccines for substance dependence. *Expert Rev vaccines*. 2014;3:11–8.
35. Kinsey BM, Jackson DC, Orson FM. Anti-drug vaccines to treat substance abuse. *Immunol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2014 Mar 27];87(4):309–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333250>
36. Orson FM, Kinsey BM, Singh RAK, Wu Y, Kosten TR. Substance Abuse Vaccines. 2009;257–69.
37. Montoya I. Immunotherapy for drug addictions. *Adicciones*. 2008;20(2):111–5.
38. Bonese K, Wainer B, Fitch F, Rothberg R, Schuster C. Changes in heroin self-administration by a rhesus monkey after morphine immunisation. *Nature*. 1974;252 (5485):708–10.
39. Anton B, Leff P. A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents. *Vaccine* [Internet]. 2006 Apr 12 [cited 2014 Mar 27];24(16):3232–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16494974>
40. Li Q-Q, Luo Y-X, Sun C-Y, Xue Y-X, Zhu W-L, Shi H-S, et al. A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats. *J Neurochem* [Internet]. 2011 Dec [cited 2014 Mar 27];119(6):1271–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21951213>
41. Stowe GN, Vendruscolo LF, Edwards S, Schlosburg JE, Misra KK, Schulteis G, et al. A Vaccine Strategy that Induces Protective Immunity against Heroin. 2011;
42. Raleigh MD, Pravetoni M, Harris AC, Birnbaum AK, Pentel PR. Selective Effects of a Morphine Conjugate Vaccine on Heroin and Metabolite Distribution and Heroin-Induced Behaviors in Rats. 2013;(February):397–406.
43. Dennehy P. Active Immunization in the United States: development over the past decade. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):872–908.

44. Hockfield S, Carlson S, Evans C, Et A. selected methods for Antibody and Nucleic Acid Probes vol. 1. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1993.
45. Le Bars D, Gozariu M, Cadden S. Animal models of Nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):597–652.
46. Day M, Schultz DR. *Veterinary Immunology Principles and practice.* London: Manson Publishing; 2011.
47. Golsby R, Kindt T, Osbourne B. *Inmunología.* 5a ed. McGraw Hill; 2004.