



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación de la acción liberadora de una bacterina en un termogel de quitosán, administrado a un modelo en ratas, mediante la cuantificación de anticuerpos presentes en sangre periférica para determinar la capacidad de éste como agente adyuvante de liberación lenta.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JIMENEZ ALONSO ADAN VLADIMIR

**ASESORA: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA
CASTRO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



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.



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Evaluación de la acción liberadora de una bacterina en un termogel de quitosán, administrado a un modelo en ratas, mediante la cuantificación de anticuerpos presentes en sangre periférica para determinar la capacidad de éste como agente adyuvante de liberación lenta.

Que presenta el pasante: **Adán Vladimir Jiménez Alonso**

Con número de cuenta: **305004181** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Marzo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Patricia Miranda Castro	
VOCAL	D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez	
SECRETARIO	Dr. Andrés Romero Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
2do. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm

Agradecimientos especiales

A la Dra. Susana Patricia Miranda Castro por encomendarme el proyecto de bajo su tutela, apoyándome y orientándome en todo momento.

Al Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo por brindarnos su paciencia y consejos durante el desarrollo del proyecto.

Al Bioterio de la FESC C-4 dirigido por el Dr. Crisóforo Mercado Márquez, por permitirme el uso de las instalaciones y sus conocimientos durante el periodo experimental.

Al área de Microbiología de la FESC C-1 por prestar sus instalaciones durante el proceso inicial de la experimentación referente al manejo del antígeno empleado.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres (Eva Mónica Alonso Dizuetz y Agustín Isidro Jiménez Castro) por haberme brindado la oportunidad de estudiar incluso a cambio de su felicidad.

A la mujer que me robo el corazón con belleza e inteligencia y me apoyo incondicionalmente en todo este proceso (Q.F.B. Navarrete Álvarez Juana Gisela).

A la mejor maestra que he tenido, a aquella que me enseño a nunca rendirme. Gracias hermana (Stephanie Astea Jiménez Alonso).

A los tesisistas (Eva Lizarraga y José Luis Hidalgo) con los que compartí conocimiento y experiencias en el laboratorio de la Dra. Patricia Miranda.

A los comerciantes que rodean la FESC C-1 por sus servicios que facilitaron el día a día por tantos años.

Y un completo agradecimiento a todos los animales de experimentación que dan su vida todos los días para ampliar un poco el conocimiento humano y facilitar la vida de todos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
<i>Capítulo I ANTECEDENTES</i>	4
1. CONCEPTOS BÁSICOS.....	5
1.1. Inmunología (aspectos generales)	5
1.2. Los adyuvantes en la industria farmacéutica.....	6
1.2.1. Tipos de adyuvantes	8
1.2.2. Vacunas.....	12
1.2.2.1. Tipos de vacunas	13
1.2.2.2. Preparación de una vacuna.....	16
1.2.2.3. Características.....	17
1.2.3. Nuevos adyuvantes.....	17
1.3. La quitina	19
1.3.1. Características	19
1.3.2. Fuentes de obtención	21
1.4. El quitosán gran material en la industria	21
1.4.1. Características	21
1.4.2. Obtención	21
1.4.3. Usos en la industria	22
1.5. Animales de experimentación (en la investigación).....	23
1.6. Almacenamiento y traslado de muestras de sangre	25
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVO PARTICULAR 1.....	28
OBJETIVO PARTICULAR 2.....	28
OBJETIVO PARTICULAR 3.....	28
<i>Capítulo II METODOLOGIA</i>	29
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	30
2.1. Material.....	30

2.2.	Formación de lotes.....	31
2.3.	Marcado de los animales	32
2.4.	Preparación de la suspensión bacteriana	33
2.5.	Preparación del termogel	36
2.6.	Preparación de los tratamientos	38
2.6.1.	Preparación del tratamiento del lote 4 (Termogel + Susp. bacteriana)	38
2.6.2.	Preparación del tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bacteriana).....	40
2.7.	Administración de los tratamientos	42
2.7.1.	Tratamiento del lote 1 (Sin tratamiento).....	42
2.7.2.	Tratamiento del lote 2 (Suspensión bacteriana)	42
2.7.3.	Tratamiento del lote 3 (Termogel).....	44
2.7.4.	Tratamiento del lote 4 (Termogel + suspensión bacteriana)	46
2.7.5.	Tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + suspensión bacteriana).....	48
2.8.	Flebotomia.....	50
2.9.	Aglutinación directa en suspensión de antígenos	52
	Capítulo III RESULTADOS Y DISCUSION	55
3.	RESULTADOS	56
3.1.	Marcado de los animales	56
3.2.	Preparación de la suspensión bacteriana (Tratamiento Lote 2)	57
3.3.	Preparación del termogel (Tratamiento Lote 3)	58
3.4.	Preparación del tratamiento del lote 4 (Termogel + Susp. bacteriana).....	59
3.5.	Preparación del tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bacteriana)	59
3.6.	Administracion de los tratamientos	59
3.7.	Flebotomia.....	61
3.8.	Histopatologia.....	64
3.9.	Aglutinacion directa en suspensión de antigenos	68
3.10.	Tratamiento del lote 1 (Sin tratamiento).....	70
3.11.	Tratamiento del lote 2 (Suspensión bacteriana)	71
3.12.	Tratamiento del lote 3 (Termogel).....	72
3.13.	Tratamiento del lote 4 (Termogel + Suspensión bacteriana).....	74
3.14.	Tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + Suspensión bacteriana).....	76
3.15.	Comparación de los tratamientos.....	78
4.	ANÁLISIS GENERAL DEL PROYECTO	80
5.	CONCLUSIONES	81
	Bibliografía	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Técnica de marcado de los animales por prioridad de extremidades	32
Figura 2.- Diagrama preparación de la suspensión bacteriana	34
Figura 3.- Diagrama preparación de la suspensión bacteriana	35
Figura 4.- Diagrama preparación del Termogel.....	37
Figura 5.- Preparación del tratamiento del Lote 4	39
Figura 6.- Preparación del tratamiento del Lote 5	41
Figura 7.- Sujecion y administración de los tratamientos en los animales	42
Figura 8.- Administración del tratamiento del Lote 2 (Suspensión bacteriana)	43
Figura 9.- Administración del tratamiento del Lote 3 (Termogel)	45
Figura 10.- Administración del tratamiento del Lote 4 (Termogel + Suspensión bacteriana)	47
Figura 11.- Administración del tratamiento del Lote 5 (Gel aluminio + Suspensión bacteriana).....	49
Figura 12.- Flebotomía.....	51
Figura 13.- Aglutinación directa en suspensión de antígenos	53
Figura 14.- Preparación de microplaca para aglutinación	54
Figura 15.- Marcado temporal con ácido pícrico	56
Figura 16.- Lote marcado con ácido pícrico	56
Figura 17.- Abultamiento en la zona de administración en un animal del lote 3 (Termogel)	60
Figura 18.- Abultamiento en la zona de administración en un animal del lote 4 (Termogel + Susp. bact.)	60
Figura 19.- Abultamiento en la zona de administración.....	60
Figura 20.- Calentado para dilatar capilares	61
Figura 21.- Corte de la punta de la cola	61
Figura 22.- Goteo y llenado de tubo.....	61
Figura 23.- Lesión en la epidermis de la cola de los animales	62
Figura 24.- Inicio de la lesión en la zona de administración	63
Figura 25.- Evolución de la lesión en la zona de administración	64
Figura 26.- Corte de tejido cutáneo conteniendo el tratamiento después de 4 meses.....	64
Figura 27.- Piel normal de un animal del lote 1 control (Sin tratamiento)	65
Figura 28.- Piel normal de un animal del lote 2 (Suspensión bacteriana).....	65
Figura 29.- Piel lesionada de un animal del lote 3 (Termogel).....	66
Figura 30.- Piel gravemente lesionada de un animal del lote 4 (Termogel + Susp. bact)	66

Figura 31.- Piel con lesión ligera de un animal del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bact).....	67
Figura 32.- Micro placa tituladora con difícil visualización de aglutinación	68
Figura 33.- Micro placa tituladora con evidente reacción de aglutinación.....	69

ÍNDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

Tabla 1.- Respuesta inmune primaria y secundaria	5
Tabla 2.- Clasificación de adyuvantes correspondientes para animales y humanos	10
Tabla 3.- Clasificación de adyuvantes y ejemplos.....	11
Tabla 4.- Vacunas víricas clasificación	14
Tabla 5.- Vacunas bacterianas clasificación	14
Tabla 6.- Comparación, vacunas atenuadas vs inactivas.....	15
Tabla 7.- Usos generales del quitosán.....	23
Tabla 8.- Animales asignados a cada lote marcado	56
Tabla 9.- Resultados obtenidos de las pruebas de identificación para <i>B. bronchiseptica</i> ...	57
Tabla 10.- Resultados obtenidos del lote 1 (Sin tratamiento) al finalizar el proyecto	70
Tabla 11.- Resultados obtenidos del lote 2 (Susp. bact.) al finalizar el proyecto	71
Tabla 12.- Resultados obtenidos del lote 3 (Termogel) al finalizar el proyecto.....	73
Tabla 13.- Resultados obtenidos del lote 4 (Termogel + Susp. bact.) al finalizar el proyecto	75
Tabla 14.- Resultados obtenidos del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bact.) al finalizar el proyecto	76
Tabla 15.- Resultados obtenidos de los pool's al finalizar el proyecto	78
Gráfico 1.- Resultados obtenidos del lote 1 (Sin tratamiento) al finalizar el proyecto	70
Gráfico 2.- Resultados obtenidos del lote 2 (Susp. bact.) al finalizar el proyecto	72
Gráfico 3.- Resultados obtenidos del lote 3 (Termogel) al finalizar el proyecto	73
Gráfico 4.- Resultados obtenidos del lote 4 (Termogel + Susp. bact.) al finalizar el proyecto	75
Gráfico 5.- Resultados obtenidos del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bact.) al finalizar el proyecto.....	77
Gráfico 6.- Resultados obtenidos de los pool's al finalizar el proyecto.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

- *B. bronchiseptica.*-----*Bordetella bronchiseptica*
- SSFE.-----Solución Salina Fisiológica Estéril
- Susp. bact.-----Suspensión bacteriana
- Ca, Lo, Mi.-----Nombres asignados a cada animal para su identificación
- Ac.-----Anticuerpo
- Ag.-----Antígeno
- Alum.-----Aluminio
- UV.-----Ultravioleta
- SCPA.-----Sin Cambio Perceptible Aparente
- Log.-----Logaritmo
- PAMP's-----Pathogen associated molecular patterns
- Pool's-----Mezcla

RESUMEN

El proceso de inmunización, se ha dado desde inicios de la humanidad, pero se tiene constancia de ellos desde el año 430 a.C. Posteriormente, con el desarrollo de las vacunas se generaron preguntas acerca de cómo mejorarlas, provocando que investigadores crearan los primeros adyuvantes y así mejorar los procesos de inmunización. Sin embargo, el desarrollo de adyuvantes más eficaces se vio estancado hasta la década de los 90's con la aparición de nuevos adyuvantes.

Dada la necesidad de desarrollar cada vez mejores adyuvantes, el presente proyecto propone el uso de un termogel de quitosán como posible nuevo adyuvante de liberación lenta, con el cual se espera que la inmunización se prolongue sin dejar residuos en el organismo.

El uso de biopolímeros en la industria farmacéutica ha aumentado gradualmente gracias características únicas como biocompatibilidad, cero toxicidad y ser biodegradables los ha vuelto de gran interés en diversas áreas, especialmente al quitosán que además puede ser obtenido fácilmente por desacetilación de exoesqueletos de crustáceos.

Aunado a esto el uso de investigaciones recientes han mostrado que el uso de geles de quitosán permiten una gran retención de fármacos así como una liberación controlada de estos en gran nivel dentro de un organismo ⁴³.

Dados estos antecedentes se consideró al termogel de quitosán mezclado con una suspensión bacteriana, adecuado para su administración, en animales vivos (ratas Wistar) para comprobar su capacidad liberadora determinando el título de anticuerpos en muestras de sangre en diferentes tiempos.

Se encontró en esta experimentación que la cantidad de anticuerpos fue mayor en el tratamiento del termogel mezclado con la suspensión bacteriana comparada con el uso solo de la suspensión bacteriana o mezclada con gel de hidróxido de aluminio como adyuvante. Los anticuerpos empiezan a aparecer en todos los tratamientos a los 15 días en promedio, llegando a su punto máximo después de 1 mes de la administración de los animales.

Sin embargo, el volumen administrado del termogel a los animales fue excesivo, causando rechazo del cuerpo extraño y causando ulceraciones a dos meses posterior a la administración por lo que no fue posible seguir la experimentación más allá de 4 meses.

Con los resultados obtenidos se determinó que el termogel es capaz de liberar un antígeno dentro de un organismo en cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune que aumenta el nivel de anticuerpos en sangre periférica detectable mediante microaglutinación.

INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica se encuentran hoy día un gran número de adyuvantes, sin embargo se requiere el desarrollo de nuevos adyuvantes ya que con la obtención de antígenos cada vez más puros, éstos pierden inmunogenicidad, volviéndose menos eficaces impidiendo una buena inmunización. En consecuencia estos se deben administrar con potenciadores cada vez más eficaces en la activación selectiva de la respuesta inmune.

Dada esta constante necesidad de elaborar nuevos adyuvantes para nuevos métodos de vacunación, nació la idea que dió origen a este proyecto, el cual propone el uso de un termogel a base de quitosán como un posible nuevo adyuvante capaz de liberar de forma lenta y prolongada un antígeno dentro de un organismo sin generar desechos tóxicos, además de brindar una forma sencilla y poco invasiva al administrarlo ya que el termogel es totalmente líquido a baja temperatura y gelifica en un rango de temperatura de 36-37°C.

Gracias a estas características, se puede considerar al termogel como un agente viable para analizar en un modelo biológico (ratas Wistar), para tal fin se mezcló el termogel con una suspensión bacteriana a volúmenes correspondientes para la obtención de una concentración suficiente para inmunizar a los animales. Se tomó un número representativo de animales que exprese un panorama acerca del comportamiento del termogel dentro de un organismo vivo⁹.

Para esto el termogel deberá ser capaz de contener e inmovilizar un antígeno dentro del organismo en una zona específica. Por lo que se prefiere utilizar el antígeno completo (bacteria inactiva) de *Bordetella bronchiseptica*, que por su tamaño no podrá pasar a través de los poros del termogel y ser liberado en el medio a menos que este se pueda degradar y así liberar las células ya inactivas, para desencadenar una respuesta inmune.

Mediante la formación de lotes suficientes para comparar la evolución de los tratamientos y con un número de animales adecuado para reflejar el comportamiento de estos durante la experimentación, se procede a administrar a cada animal según la variante a examinar (termogel, suspensión bacteriana, o ambas y un adyuvante conocido, gel de hidróxido de aluminio).

Ya que la presencia de anticuerpos en sangre periférica puede aparecer a partir de los 10 días posterior a la exposición al antígeno, se debe proceder a una toma de muestra de cada animal previo a la administración y días antes del tiempo promedio en que se pueden encontrar anticuerpos, con la finalidad de visualizar la tendencia en el aumento del título de estos.

La determinación del título de anticuerpo ha de requerir siempre alguna de las partes que han de componer a la reacción, dado este caso, para evidenciar anticuerpos en una muestra de sangre se requiere de su contraparte; un antígeno el cual se pretenda conjugar con el anticuerpo correspondiente así como una forma de interpretar el resultado, como lo es una sencilla técnica de microaglutinación en placa, permitiéndonos saber de forma rápida si el termogel funciona como se prevé

Gracias a estos resultados es posible comprobar la hipótesis acerca del termogel como posible adyuvante ya que los tratamientos que incluyeron al antígeno, muestran un incremento en el título de anticuerpos después de 15 días de la administración. Sin embargo el comportamiento de éstos varía en el punto máximo alcanzado y el tiempo en que se alcanzó así como el tiempo que se mantuvo este punto. El proyecto se completa después de obtener 8 muestras de cada animal en tiempos específicos.

Capítulo I
ANTECEDENTES

1. CONCEPTOS BÁSICOS

1.1. Inmunología (aspectos generales)

El sistema inmune es un conjunto de procesos biológicos mediados por células específicas en el interior de un organismo que lo protegen contra enfermedades identificando y matando células patógenas y todo tipo de microorganismos.

El sistema inmune comprende dos partes, una, la respuesta inmune primaria, que se activa cuando por primera vez un antígeno (Toda aquella sustancia capaz de interactuar con un anticuerpo y desencadenar una respuesta inmune) se pone en contacto con el organismo, se produce una respuesta inmune. Por el contrario, cuando al cabo de un tiempo el mismo antígeno vuelve a activar al sistema inmune, se produce una respuesta que denominamos "respuesta secundaria" ⁴¹, _{33, 5}.

Ambas respuestas poseen características que las hacen muy diferentes una de la otra, como en la respuesta primaria los niveles de inmunoglobulinas se alcanzan tras un largo período de latencia después del estímulo antigénico, mientras que en la respuesta secundaria se alcanzan más rápidamente. Además la respuesta primaria es de menor intensidad que la secundaria. También en la respuesta primaria predominan los anticuerpos (glicoproteína creada por linfocitos T y B a partir de un antígeno previo) IgM, mientras que en la secundaria predomina la IgG. En el caso de la respuesta secundaria, al predominar en ella la IgG, de vida media más larga que la IgM, es más prolongada su acción que la primaria, además los anticuerpos de la respuesta secundaria poseen mayor afinidad que en la primaria. En la Tabla 1 se muestra la comparación de la respuesta inmune primaria y secundaria.

Tabla 1-. Respuesta inmune primaria y secundaria ³⁶

Antígeno	
Primaria	Secundaria
Primer contacto: Respuesta primaria	Contactos posteriores: Respuesta secundaria
Anticuerpos IgM	Anticuerpos IgG
Menor intensidad	Mayor intensidad
Producción de células de memoria	Anticuerpos de mayor afinidad

Tomado de (R V. F., 2008)

Ya que para el diagnóstico y seguimiento en la evolución de algunas enfermedades, la determinación del título de anticuerpos en una muestra de sangre, es rutinaria mediante diferentes métodos que utilizan por predilección solo suero. Dentro de las técnicas útiles para la determinación de anticuerpos podemos encontrar:

- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
- Microaglutinación en placa
- Microaglutinación en capilar
- Reacción de fijación del complemento

Estas técnicas se utilizan ampliamente tanto para el diagnóstico de enfermedades (brucelosis y salmonelosis) como para la investigación de nuevas vacunas ³⁴.

1.2. Los adyuvantes en la industria farmacéutica

En general, los antígenos solubles puros, recombinantes o sintéticos han resultado seguros, pero con una menor inmunogenicidad en comparación con aquellos del organismo de origen. Es por eso que la búsqueda de adyuvantes (los adyuvantes son sustancias que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados) nuevos y no tóxicos, así como el desarrollo de nuevos sistemas de envío de antígenos, son necesidades de la investigación en el campo de las vacunas. Además el desarrollo de vacunas efectivas contra la gran cantidad de patógenos que permanecen en las superficies mucosales o que tienen en ellas su puerta de entrada, requiere adyuvantes que potencien respuestas locales ^{6,7}.

Los adyuvantes también se han utilizado como elementos indispensables en las estrategias novedosas de vacunación contra enfermedades alérgicas, autoinmunes y contra el cáncer, lo que sin duda, abre nuevas posibilidades en el desarrollo de vacunas.

Entre las ventajas del uso de adyuvantes como componente de las vacunas, se hallan:

- Su capacidad de potenciar la inmunogenicidad de antígenos con un grado de pureza elevado.
- La reducción de la cantidad de antígeno y del número de reinmunizaciones.

Sin embargo no fue sino hasta el siglo XX que se comenzaron a utilizar adyuvantes, cuando Alexander T. Glenny, demostró la actividad adyuvante de los compuestos de aluminio, aunque pasando inadvertido. Luego de 10 años Jules T. Freud crearía una mezcla de Antígeno acuoso en aceite (adyuvante incompleto de Freud) y el adyuvante completo que contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivados. En 1956, Johnson demostró la actividad adyuvante de la endotoxina lipopolisacáridica (LPS), proveniente de una bacteria gramnegativa y en 1974, Lederer y colaboradores identificaron el muramildipéptido (MDP), como un componente con actividad adyuvante de las micobacterias ^{6, 7, 31}.

Sin embargo, muchas veces los adyuvantes son seleccionados más por costumbre que por beneficios que involucren factores como: el tipo de respuesta deseada o que se quiere evitar, la especie vacunada, la ruta de administración y los efectos colaterales inducidos por el adyuvante. Lo que muchas veces puede generar reacciones adversas locales, caracterizadas por lesiones que incluyen dolor, inflamación local, necrosis en el sitio de la inyección o en zonas adyacentes, linfadenopatías regionales y, en raras ocasiones, la inducción de granulomas y la formación de abscesos estériles; o bien una reacción sistémica que incluyen náuseas, fiebre, artritis por adyuvante y uveítis, anafilaxis, toxicidad específica de órgano e inmunotoxicidad, como por ejemplo, liberación de citocinas, inmunosupresión y enfermedades autoinmunes ^{39, 42}.

1.6.1. Tipos de adyuvantes

Los adyuvantes inmunológicos pueden ser clasificados dependiendo de su fuente de origen, mecanismos de acción y propiedades fisicoquímicas.

Los adyuvantes pueden ser separados en tres clases amplias:

- ***Inmunoestimulantes activos***: Son agentes que aumentan la respuesta inmune específica contra el antígeno.
- ***Portadores***: Son proteínas inmunogénicas que proporcionan ayuda de células T.
- ***Adyuvantes tipo vehículo***: Como las emulsiones oleosas y los liposomas, que sirven como matriz para el antígeno y para la inmunoestimulación.

También se han dividido en adyuvantes:

- Mucosales
- Sistémicos

Teniendo en cuenta que las características fisiológicas en cuanto a la toma y procesamiento del antígeno para ambas vías de inoculación generan procedimientos diferentes de adyuvación.

Otra clasificación aceptada, los divide en:

- Sales de aluminio y otros adyuvantes minerales.
- Agentes tensoactivos.
- Derivados de bacterias.
- Vehículo y materiales de liberación lenta.
- Citocinas.

Una clasificación reciente de los adyuvantes considera su separación en los grupos siguientes:

- Adyuvantes de tipo gel.
- Agentes tensoactivos.
- Productos bacterianos.
- Productos basados en aceites y emulsiones.
- Adyuvantes particulados.
- Proteínas de fusión y lipopéptidos.

De acuerdo con la definición general de adyuvantes, a esta lista se pudieran adicionar los:

- Inmunomoduladores
- Inmunoestimulantes

Otra clasificación comúnmente utilizada comprende el uso de adyuvantes adecuados para animales de distintas categorías y su uso en humanos según se requiera eficiencia o seguridad de estos como se muestra en la siguiente tabla ^{6, 39, 42}.

Tabla 2-. Clasificación de adyuvantes correspondientes para animales y humanos ⁴²

Adyuvantes	La eficiencia es más importante que la seguridad		La seguridad es más importante que la eficiencia	
	Animales de lab.	Animales de alim.	Animales de comp.	Humanos
FCA	+	-	-	-
Emulsiones Aceite/agua	+	+	(-)	-
Emulsiones Agua/aceite	+	+	-	-
Materiales inertes	+	(+)	(+)	(-)
Compuestos de aluminio	+	+	+	+
Liposomas	+	+	(+)	(-)
Saponinas	+	(+)	(+)	(-)
DDA*	+	(+)	(+)	(-)
NBP **	+	(+)	(+)	(-)

+: Aplicado de rutina en productos comerciales, (+): No aplicado, pero se considera aplicable en función de su seguridad, -: No aplicado y considerado no aplicable por problemas de seguridad, (-): No aplicado y considerado no aplicable, excepto para fines específicos. Tomado de H, J. M. (1999).

***DDA bromuro de dimetil dioctadecil amonio **NBP polímeros no iónicos en bloque**

Dentro de esta amplia clasificación de adyuvantes encontramos ejemplos de ellos como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.- Clasificación de adyuvantes y ejemplos ⁷

TIPO	EJEMPLO GENERAL	EJEMPLO ESPECÍFICO
Sales minerales	Hidróxido de Al Fosfato de Al	
Microbiológicos	Muramil dipéptido Exotoxinas bacterianas Endotoxinas bacterianas	Freund Toxina colérica / diftérica Monofosforil lípido A (MPL) Oligonucleótidos CpG trehalosa dimicolato (TDM) muramil dipeptido
Particulados	Microsfemas de polímeros degradables liposomas liposomas micro esferas nano-beads complejos inmunoestimuladores(ISCOMs) virus-like particles(VLPs)	
Emulsiones oleosas en agua	Adyuvante incompleto de Freund Adyuvantes montanide Microfluidificadas Saponinas	MF59 / AS03 SAF QS21
Sintéticos	Derivados de muramil Copolímeros no iónicos	Murabutide Threony MDP L121
Citocinas	Factor estimulante y de crecimiento	IL-02 IL-12 GM-CSF IFNg
Genéticos	MPL + sales de aluminio	AS04

Tomado de (C A. J., 2007).

1.2.2. Vacunas

A lo largo de la historia, fueron varios los hechos que antecedieron el inicio de la era de la vacunación. Los primeros estuvieron relacionados con la variolización, procedimiento que consistía en la inoculación de costras variólicas procedentes de personas que padecían de viruela, con lo cual la enfermedad podía ser transmitida de forma más débil a individuos sanos.

A pesar de que esta práctica se realizaba desde tiempos antiguos, no fue sino hasta 1786 cuando Edward Jenner llevó a cabo el primer experimento médico en el campo de la vacunación al inocular en una herida que realizó en el brazo de un niño de ocho años, la secreción obtenida de las pústulas de las manos de una lechera que se había infectado con el virus de la viruela de las vacas (*vaccinia*). Seis semanas después inoculó de nuevo al pequeño, pero con secreciones de un enfermo de viruela. El niño no desarrolló la enfermedad, con lo cual se demostró la acción profiláctica de la inoculación contra la viruela humana. A raíz de esto, surge el término vacunación, empleado por primera vez por Jenner y adoptado posteriormente por Louis Pasteur, quien lo generalizó empleándolo para referirse a inmunizaciones para otras enfermedades infecciosas¹⁰.

Las experiencias de Jenner y Pasteur permitieron la introducción progresiva de vacunas activas, las cuales se desarrollaron inicialmente con métodos de atenuación (conocidas como vacunas de primera generación), luego con la inactivación, para proseguir con la elaboración de vacunas polisacáridas y recombinación genética.

Hoy día una vacuna se define como, cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos (Definición de la OMS)

¹⁵.

1.2.2.1. Tipos de vacunas

Las vacunas pueden clasificarse en base a diferentes criterios, según su composición, la tecnología de su fabricación, la utilización sistémica o particular, etc. Como factores altamente distintivos de éstas, encontramos los siguientes:

- Las vacunas que contienen microorganismos atenuados remedian mejor la infección natural, pero también tienen mayor riesgo de reactogenicidad.
- Las vacunas inactivadas, especialmente las compuestas por subunidades suelen ser menos inmunogénicas y por ello precisan más dosis y adyuvantes más potentes.
- Las vacunas sistémicas se administran a toda la población incluyéndose en el calendario de vacunación. Con ellas además de protección individual, se consigue la llamada inmunidad de grupo.
- Las vacunas no sistémicas se administran como una indicación individual ante una situación particular de riesgo.
- Las vacunas combinadas al disminuir el número de inyecciones favorece el mejor cumplimiento del calendario, simplifica la administración y abarata costos.
- Las vacunas conjugadas son inmunógenas en niños menores de dos años y proporcionan memoria inmunológica por lo que la protección conferida es de por vida y la respuesta de anticuerpos es principalmente tipo IgG^{6, 28}.

En resumen, es posible denominar y clasificar las vacunas siguiendo criterios diferentes. Ya que prácticamente todas las vacunas provienen de microorganismos que son patógenos para el hombre, siguiendo la idea inicial de Pasteur, lo más habitual es dividir las vacunas en víricas y bacterianas, y a su vez subdividirlas en vacunas de microorganismos atenuados o microorganismos muertos, y en una última subdivisión se contempla si se compone la vacuna de células completas o solo fracciones de ella.

Las vacunas muertas o inactivadas, son todas aquellas que contienen microorganismos muertos o productos derivados de ellos, sin capacidad patógena, como, toxinas modificadas o partículas celulares. Estas producen una respuesta inmune menos intensa y duradera que las vacunas con organismos vivos, por lo que suelen precisar la incorporación de algún adyuvante. En las Tablas 4 y 5 se muestran algunos ejemplos de vacunas de este tipo ^{6,38}.

Tabla 4. Vacunas víricas clasificación⁷

Vacunas víricas	Atenuadas	Inactivadas
Virus enteros	Polio oral	Gripe
	Varicela	Hepatitis A
	Sarampión	Rabia
	Rubeola	
Subunidades		Gripe
		Hepatitis B

Modificado de (C A. J., 2000)

Tabla 5. Vacunas bacterianas clasificación⁷

Vacunas bacterianas	Atenuadas	Inactivadas
Células enteras	BCG	Tos ferina
	Tifoide oral	Tifoidea
	Cólera oral	
Acelular		Tos ferina
Toxoides		Difteria
		Tetanos
Polisacáridos		Meningococo
		Neumococo
Conjugadas		Haemophilus influenzae

Modificado de (C A. J., 2000)

Las vacunas atenuadas al estar compuestas por microorganismos vivos que han sido modificados hasta conseguir que pierdan su virulencia conservan una alta inmunogenicidad ya que los organismos siguen multiplicándose.

Por ello no suelen precisar adyuvantes y mantienen una inmunidad persistente. Generalmente una dosis es suficiente y cuando se repite es para disminuir la probabilidad de fallo vacunal y no para reactivar la respuesta inmune.

Las vacunas sistémicas son aquellas que se administran a toda la población, siendo incluidas en el calendario vacunal universal. Con esta práctica, además de protección individual, se aporta la llamada inmunidad de grupo, ya que se disminuye la circulación del agente patógeno y así las personas no protegidas tienen menos posibilidades de infectarse.

En cambio las vacunas no sistémicas solo se administran con una indicación previa, para caso como viajes o en epidemias.

En el caso de las vacunas combinadas, al ser estas dos o más vacunas en una forma física se administran en el mismo momento y sitio. Por lo que tienen la ventaja de disminuir el número de inyecciones lo que facilita la administración y abarata el costo de éstas ²⁸.

Sin embargo estas vacunas poseen una gran desventaja, al momento de desarrollarlas ya que no es sencillo encontrar una forma estable o determinar las interacciones que habrá entre los componentes de estas vacunas.

Las vacunas conjugadas compuestas de antígenos polisacáridos al unirse a una proteína se comportan como antígenos proteicos, en ellas se utilizan polisacáridos de las cápsulas de las bacterias y se les conjuga con proteínas acarreadoras (albumina). Estas vacunas han sido de gran interés ya que al utilizarse componentes de las cápsulas bacterianas, las cuales al ser la primer parte reconocida de los microorganismos podría facilitar la inmunización sin crear infecciones en el organismo. Tales motivos siempre deben considerarse para llevar a cabo una correcta y eficiente inmunización (en la Tabla 6 se muestra una comparación de ventajas y desventajas en estas vacunas) ^{6, 28}.

Tabla 6. Comparación, vacunas atenuadas vs inactivas ²¹

	Atenuadas	Inactivas
Número de dosis	Una/pocas	varias
Necesidad de dosis de recuerdo	Menor	Mayor
Reactogenicidad	Mayor	Menor
Se replica en el organismo	Sí	No
Riesgo de enfermedad	Sí	No
Riesgo de transmisión	Sí	No
Posibilidad de reversión	Sí	No
Respuesta inmune humoral	Sí	Sí
Respuesta inmune celular	Sí	Escasa

Modificado de (K G. R., 2011)

1.2.2.2. Preparación de una vacuna

Como hemos podido observar, las vacunas al ser tan variadas en sus componentes y actividad, implica que la preparación de éstas sea igualmente variada, pero conservando una orden lógico en sus componentes básicos:

- Antígeno, éste, ya sea el microorganismo completo o solo un fragmento, requiere ser obtenido mediante un proceso controlado y estandarizado de cultivo en medios de cultivo como caldos o incluso en células o huevos embrionados.

Posteriormente el antígeno deberá ser aislado y purificado tanto como sea posible para evitar reacciones adversas al administrar la vacuna (como alergias a los medios donde se cultivó el microorganismo).

En los casos donde la vacuna requiera un antígeno presente en un organismo que deba seguir replicándose, este deberá ser atenuado o inactivado con formaldehído. Por el contrario para la obtención de solo una fracción del microorganismo será necesario llevar a cabo un proceso de destrucción del microorganismo (por métodos como sonicación o choque osmótico) y el aislamiento del antígeno deseado ¹⁸.

- El adyuvante como ya se mencionó, es la otra parte indispensable de las vacunas y deberá ser seleccionado con respecto a criterios lógicos, como la vía de administración y la respuesta inmune que se desee activar. Aunado a esto se deberá confirmar que esta mezcla del antígeno con el adyuvante es estable.
- Dentro de otros componentes podemos encontrar a los antibióticos como parte de los agentes conservadores de las vacunas ⁴⁴.

- Finalmente los agentes estabilizantes permiten mantener en algunos casos, soluble, al antígeno o evitar el rompimiento de emulsiones ^{7, 28}.

1.2.2.3. Características

Finalmente ya que las vacunas son un producto farmacéutico inyectable deberá cumplir con requisitos tales como:

- Limpidez
- Neutralidad
- Isotonía
- Esterilidad
- Apirogeneidad

En general las preparaciones inyectables deberán ser preparadas de manera que permitan la disolución, la emulsión o la dispersión de los principios activos y, de las sustancias auxiliares añadidas. Las emulsiones inyectables no han de presentar una separación de fases. Las suspensiones inyectables pueden presentar un sedimento que deberá ser fácilmente dispersable por agitación y la suspensión ha de ser estable como para permitir la extracción homogénea de la dosis terapéutica.

1.2.3. Nuevos adyuvantes

En 2008 en Human Vaccines, los inmunólogos, Tagliabue y Rappuoli afirman que la era de los adyuvantes post-aluminio ha comenzado, que tanto MF59 como AS03 incrementan la respuesta inmunitaria y que sólo es el principio de una nueva era.

La EMEA (European Medicines Agency) ha aprobado con rapidéz nuevas vacunas adyuvadas con MF59 (emulsión antigénica con escualeno) y AS03 (sistema adyuvante número 3: emulsión con vitamina E y escualeno) frente a la gripe, basándose en estudios

previos sobre vacunas modelo. Sin embargo, la FDA, el organismo encargado de aprobar el uso de nuevas vacunas en EE.UU. se ha mostrado más reservada ⁷.

En estos momentos hay estudios muy avanzados de nuevos adyuvantes:

1. **IC31**, es un oligodeoxinucleótido unido a un péptido antimicrobiano que actúa activando vías del sistema inmune innato.
2. **AS02 y AS01** son en realidad la unión del lípido A y un componente de la corteza de un árbol. El mecanismo de acción no se relaciona con la estimulación de receptores celulares, sino que acelera la maduración de células dendríticas y al ser un derivado de la saponina, es muy lítico promoviendo la liberación de ATP y ácido úrico, factores importantes en el mecanismo de acción de los adyuvantes.
3. **MPL-TLR7**, un adyuvante desarrollado para disminuir la cantidad de antígeno necesario para inmunizar frente al virus de la gripe H5N1.
4. Además se están usando mutantes no tóxicas de *Escherichia coli* enterotoxigénica para vacunas frente a la diarrea del viajero usando como vía de administración la vía cutánea.

Finalmente un tipo de adyuvantes que ha generado gran interés en el desarrollo de nuevas vacunas es, el uso de fragmentos de ADN.

A principios de la década de 1990, se pensó que las vacunas basadas en ADN desnudo, como su nombre lo indica, no tendrían ningún componente adyuvante ni ninguna estrategia de adyuvación ^{28, 31}.

El aumento del número de antígenos evaluados con esta tecnología, permitió comprobar que no todos los antígenos tienen el mismo comportamiento y que compuestos que se usan rutinariamente en ensayos en modelos murinos, no pueden ser extrapolados a humanos por motivos obvios de reactogenicidad ⁶.

La Co-inoculación de plásmidos, es otro intento de adyugar, aquí se pretende que codificando 2 o más secuencias de ADN inmunopotenciadoras produzcan citocinas y factores coestimuladores, con el objetivo de potenciar la respuesta inmune generada por el plásmido vacunal⁶.

Para los sistemas particulados y vacunas de ADN, la creación de un sistema de envío genético eficiente es un reto de la terapia génica. Recientemente, se estudió la asociación y la estabilidad de un ADN plasmídico que codifica la ovoalbúmina, y de partículas poliméricas que alcanzan un tamaño de micras: microesferas biodegradables de ácido poliláctico y coglicólico, poliDTH-carbonato (pseudopoliaminoácido), y partículas de poliestireno de alrededor de 1 μm ⁶.

Estas partículas difieren en carga eléctrica e hidrofobicidad y han sido evaluadas tanto para la inmunización mucosal como parenteral. El ADN se adsorbe tanto sobre las partículas biodegradables como sobre las que no lo son. Los resultados obtenidos demostraron que se logran respuestas superiores luego de la administración de ADN asociado a partículas, comparado con la inoculación del ADN solo. La inoculación intranasal e intramuscular de ADN en sistemas particulados, ha generado respuestas similares a nivel sérico^{7, 31, 43}.

1.3. La quitina

1.3.1. Características

Un polímero es, toda aquella sustancia constituida por moléculas que se caracterizan por la repetición de uno o más tipos de unidades monoméricas. Los monómeros son por tanto moléculas de bajo peso molecular capaces de reaccionar consigo mismo o con otras moléculas para formar un polímero¹⁴.

Dentro de los polímeros podemos encontrar tres grupos de ellos:

- A. Polímeros naturales
 - a. Polisacáridos (almidón, celulosa, etc.)
 - b. Proteínas
 - c. Ácidos nucleicos
 - d. Caucho natural
- B. Polímeros naturales modificados
 - a. Derivados de la celulosa (nitrato y acetato de celulosa)
 - b. Caucho vulcanizado.
- C. Polímeros sintéticos
 - a. De adición (Polietileno, polipropileno, policloruro de vinilo)
 - b. De condensación (poliamida, poliésteres)

Dentro de los polímeros naturales encontramos a la quitina en forma de hojuelas blancas, duras, inelásticas y siendo el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Este homopolímero lineal compuesto por unidades de N-acetil glucosamina unidas por un enlace β (1,4) y de estructura tridimensional α -helicoidal, se encuentra de forma común en los exoesqueletos de los insectos, crustáceos, arácnidos y como el componente principal de la pared celular de los hongos.

Al ser tan común en múltiples formas de vida y principalmente en las marinas, se ha convertido a su vez en la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas cercanas al mar ¹².

Además, de los múltiples usos dentro de la industria farmacéutica que se le dan hoy día a este biopolímero, se destaca como un factor estimulante del sistema inmunológico; Esto se ha probado al ser administrado por vía intravenosa en forma de micropartículas (en ratones), estas son fagocitadas por las células NK y macrófagos, lo que induce la liberación de citoquinas como IL-2, IL-18, TNF, INF- γ ³⁰.

1.3.2. Fuentes de obtención

La quitina es fácil de obtener del exoesqueleto de camarones o cangrejos, para ello se requiere un tratamiento químico con el fin de remover los pigmentos, las sales tales como el carbonato de calcio y las proteínas que se encuentran asociadas con ella ¹².

1.4. El quitosán gran material en la industria

1.4.1. Características

El quitosán, un polvo blanco, grueso derivado de la quitina, es un polisacárido natural, formado por dos copolímeros, glucosamina y N-acetil-glucosamina unidas por un enlace β (1,4) y siendo poseedor de características interesantes como, su capacidad antifúngica, antivírica, antimicrobiana, ser no tóxico, emulsionante, absorbente de grasas, adsorbente de metales contaminantes, filmogénico y cicatrizante. Además de ser biocompatible, biodegradable, capaz de formar poros, ser soluble a pH's ácidos, sin olvidar que es el único bipolímero catiónico ^{2, 3, 14, 19}.

1.4.2. Obtención

Su obtención está mediada por la remoción de proteínas presentes en los caparazones de crustáceos así como pigmentos y una posterior desacetilación parcial de la quitina, con una solución alcalina concentrada.

La facilidad de obtención del quitosán junto con sus características únicas y variadas, hacen que el quitosán sea considerado de gran utilidad en distintos campos de la industria alcanzando hasta más de doscientas aplicaciones ^{12, 14, 21, 24}.

1.4.3. Usos en la industria

La búsqueda de aplicaciones de este polímero se inició en la década del 70 y se han ido incrementando hasta nuestros días. Las principales aplicaciones fueron en un principio, el tratamiento de aguas y efluentes, procesamiento de alimentos y quelación de iones metálicos.

Actualmente la tendencia consiste en la producción de derivados de valor agregado como por ejemplo aquellos usados en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia y medicina.

Es precisamente en este último campo, en el que se concentra la mayoría de los esfuerzos científicos a nivel mundial, ya que tanto el quitosán como sus derivados han presentado excelentes propiedades físicas y químicas para desarrollar un amplio número de productos con características sumamente interesantes para el sector de la salud. Se han realizado varios estudios a nivel mundial, que han obtenido resultados muy positivos en cuanto a la utilización del quitosán en la liberación controlada de diferentes principios activos, como es el caso de la liberación nasal de vacunas y más recientemente se ha estudiado su aplicación en la liberación nasal de insulina.

Además, se ha encontrado una amplia cantidad de aplicaciones para el quitosán en los dispositivos farmacéuticos convencionales, como, potencial excipiente de formulación, cumpliendo funciones varias, como; ligante, desintegrante y de revestimiento de comprimidos ^{12, 14, 21, 32}.

Una de las características fundamentales del quitosán para ser utilizado en este tipo de aplicaciones son sus propiedades muco adhesivas, que facilitan la liberación de los principios activos directamente al tracto nasal o peri oral, contribuyendo a que la asimilación del principio sea más rápida y efectiva. De la misma manera sus propiedades biológicas permiten que el quitosán sea útil para el tratamiento de reconstrucción de la piel, convirtiéndolo en una película súper delgada que sirve como soporte para las células epiteliales y, que por medio de sus características humectantes y bactericidas, sea útil para

personas con quemaduras graves o con problemas de la piel. A continuación se muestran algunos usos del quitosán en diversas áreas dentro de la industria.

Tabla 7. Usos generales del quitosán

Área	Usos
Cosméticos:	Hidratante, emulsificante, emoliente, espesante, formación de películas. Salud: control del colesterol, liberación de drogas, prótesis dentales, suturas, biomateriales, vendas para los ojos, antibacterial, anticongelante.
Agricultura:	Nematicida, alimentación animal, liberación continua, tratamiento de semillas.
Alimentos:	Clarificación, fibra dietética, remoción de taninos, cromatografía, agentes gelatinizados y espesante, reutilización de proteínas, procesos de desecho.
Biotecnología:	Inmovilización de enzimas, encapsulamiento, filtro ayuda, inmovilización de células, reutilización de proteínas.
Tratamiento de aguas:	Procesamiento de alimentos, agua potable, remoción de colorantes, remoción de metales.

Compilación de diversas fuentes

Sin embargo dentro de estas aplicaciones destacan el uso del quitosán como un vehículo liberador de fármacos, en vías de administración con mucosa, como vía oral, nasal y ocular, que en común tienen ser vías no invasivas.

Se ha encontrado que el quitosán es capaz de inducir una respuesta inmune celular y humoral. Además se ha demostrado que una solución de quitosán es similar al adyuvante de incompleto de Freud³⁰.

1.5. Animales de experimentación (en la investigación)

Para la investigación y desarrollo de nuevas vacunas y adyuvantes siempre será necesario probarlos primero en animales. Es por ello que se creó la experimentación animal como una actividad que tiene como misión evidenciar o aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas. No obstante, también es toda acción de carácter científico o experimental que pueda llegar a suponer un ataque al estado de bienestar del animal, susceptible de causarle dolor, sufrimiento, angustia o agravio.

Dentro de los animales más comunes para uso experimental encontramos a, los ratones, conejos, cobayos, ratas. Siendo estas últimas (preferentemente la rata wistar) uno de los predilectos para experimentación vinculada a medicina humana, debido a similitudes metabólicas y una anatomía igualmente parecida a la de los humanos, si bien no tanto como animales con mayor escala taxonómica, como los simios, la cantidad de espacio y cuidados que requiere una rata es mucho menor volviéndolos el animales de experimentación más común.

Para probar todo tipo de fármaco en un animal se debe utilizar algún tipo de vía de administración, siempre pensando en la más adecuada, para el objetivo del proyecto y que cause menos estrés físico o mental en los animales.

Algunas de las vías de administración que podemos encontrar en la rata son:

- Intramuscular
- Intraperitoneal
- Subcutánea
- Intravenosa
- Inhalatoria
- Oral

Además de la vía de administración, para obtener un resultado de los animales, es necesario obtener una muestra de sangre, excreciones o tejido, mediante técnicas como punción cardiaca, intraocular, corte de dedos, corte cola, flebotomías de las venas del mayor calibre en el animal (técnicas relacionadas a muestras de sangre).

Para la obtención de excreciones solo se requiere una recolección directa de estas (requiere generalmente jaulas especiales).

En caso de una muestra de tejido se deberá recurrir a una biopsia o una necropsia según sea el caso (para algunos proyecto lo único que se desea obtener como resultado es la observación de comportamiento en los animales u otros signos evidentes) ^{36, 27}.

1.6. Almacenamiento y traslado de muestras de sangre

Ya que una de las muestras más utilizadas dentro de la experimentación con animales es la sangre, hay que tomar en cuenta con qué tipo de muestra se trabajará, ya que, bien puede requerirse suero (remanente líquido de una muestra de sangre centrifugada donde ya no hay factores de la coagulación) o plasmas (remanente líquido de una muestra de sangre a la cual se le agrega un anticoagulante y donde aún hay factores de la coagulación) ¹⁷.

Cuando una muestra de sangre no sea ocupada dentro de un lapso de 2 hrs, se requerirá del almacenaje de estas. Este almacenaje deberá cumplir con especificaciones diversas para evitar factores como:

- a) Metabolismo de las células sanguíneas.
- b) Evaporación o sublimación.
- c) Reacciones químicas.
- d) Descomposición microbiológica.
- e) Procesos osmóticos.
- f) Efecto de la luz.
- g) Difusión de gases.

Estos factores pueden dañar y alterar la muestra. Por ello para almacenar y transportar una muestra de sangre que será utilizada en un lapso mayor a 2hrs, pero menos de 24hrs:

- La muestra deberá estar en un contenedor rígido y bien sellado.
- Este contenedor deberá estar refrigerado a una temperatura de 2-6°C.
- Aislada de la luz.

En el caso de que la muestra no vaya a ser utilizada dentro de un lapso de 24 hrs o más:

- La muestra deberá ser almacenada en un contenedor rígido.
- Asilado de la luz.
- Sin fugas.
- De manera vertical.
- Forzosamente a una temperatura de -20°C .
- No se deberán realizar múltiples procesos de congelación y descongelación.

Tomando en cuenta estos cuidados, una muestra puede permanecer almacenada y en buen estado por mucho tiempo, meses e incluso años con el uso de criopreservadores ³⁴.

JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que adyuvantes comúnmente utilizados en el desarrollo de vacunas, como el hidróxido de aluminio, crea depósitos de metales pesados en la zona de la administración donde al paso del tiempo llegan al torrente sanguíneo causando múltiples problemas.

Por tal motivo el presente proyecto fue dirigido hacia la búsqueda de un adyuvante no tóxico, biodegradable y de liberación prolongada, proponiéndose un termogel de quitosán.

HIPÓTESIS

El uso del termogel como posible adyuvante de liberación lenta, inmovilizara al antígeno (*B. bronchiseptica*) en una zona específica y mediante degradación enzimática el depósito será eliminado lentamente prolongando la inmunización.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la acción liberadora de un antígeno mezclado en un termogel de quitosán, mediante su administración en un modelo de ratas Wistar, y la posterior determinación del título de anticuerpos presentes en sangre periférica, por el método de microaglutinación en placa para conocer el comportamiento del termogel como posible adyuvante.

OBJETIVO PARTICULAR 1

Desarrollar un termogel de quitosán, mediante el tratamiento del biopolímero con buffer a bajas temperaturas, para utilizarlo como el vehículo del antígeno (*B. bronchiseptica*), que se administrará a los animales.

OBJETIVO PARTICULAR 2

Obtener una bacterina, mediante el tratamiento de una suspensión bacteriana (*B. bronchiseptica*), con formaldehído 3%, para su posterior uso en la inmunización de los animales.

OBJETIVO PARTICULAR 3

Evaluar el uso de un termogel de quitosán como posible adyuvante mediante pruebas de aglutinación y compararlo con un gel de hidróxido de aluminio para comprobar su utilidad como agente liberador de antígenos en un organismo.

Capítulo II
METODOLOGIA

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. Material

- **Tubos cónicos (2ml y 15ml)**
- **Ácido pícrico**
- **Violeta de genciana**
- **Coagulante vitamina K**
- **Alimento para ratas (formulab-5001)**
- **Cepo**
- **Lámpara de intensidad regulable**
- **Hielera**
- **Lámpara de luz UV**
- **Gel de hidróxido de aluminio**

2.2. Formación de lotes

El proyecto se llevó a cabo con 40 animales de sexo indistinto (el proyecto no se enfoca en un género en particular y si en un análisis general) formando 5 lotes de 8 animales cada uno (4 hembras y 4 machos).

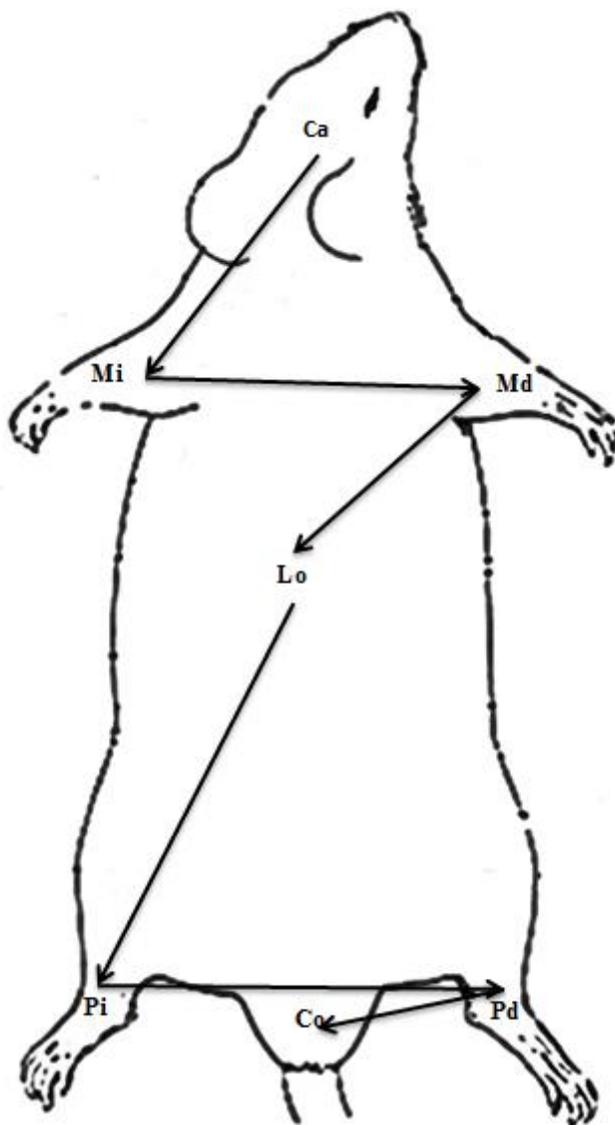
Los lotes formados son los siguientes, nombrados según su tratamiento:

1. Lote 1- Control (sin tratamiento)
2. Lote 2- Tratamiento: Suspensión bacteriana
3. Lote 3- Tratamiento: Termogel
4. Lote 4- Tratamiento: Termogel + suspensión bacteriana
5. Lote 5- Tratamiento: Gel hidróxido de aluminio + suspensión bacteriana

2.3. Marcado de los animales

Los animales fueron marcados según el siguiente diagrama, dando posibilidades a múltiples combinaciones.

Figura 1.- Técnica de marcado de los animales por prioridad de extremidades



La asignación de nombre se da respetando la prioridad como se muestra en el dibujo, con posibilidad de saltar una extremidad o utilizarla en el siguiente nombre.

2.4. Preparación de la suspensión bacteriana

A partir de una cepa de *B. bronchiseptica* (4617), se sembraron 5 cajas de Agar MacConkey y se incubaron a 37°C por 5 días, al finalizar este plazo se realizaron pruebas de identificación para comprobar que las colonias obtenidas fueran de *B. bronchiseptica*.

De estas cajas se tomó una colonia aislada para inocular 3 matraces (250ml) de caldo BHI y se incubó a 37°C por 5 días. Se realizó una tinción de Gram para verificar que no se encontraran contaminados.

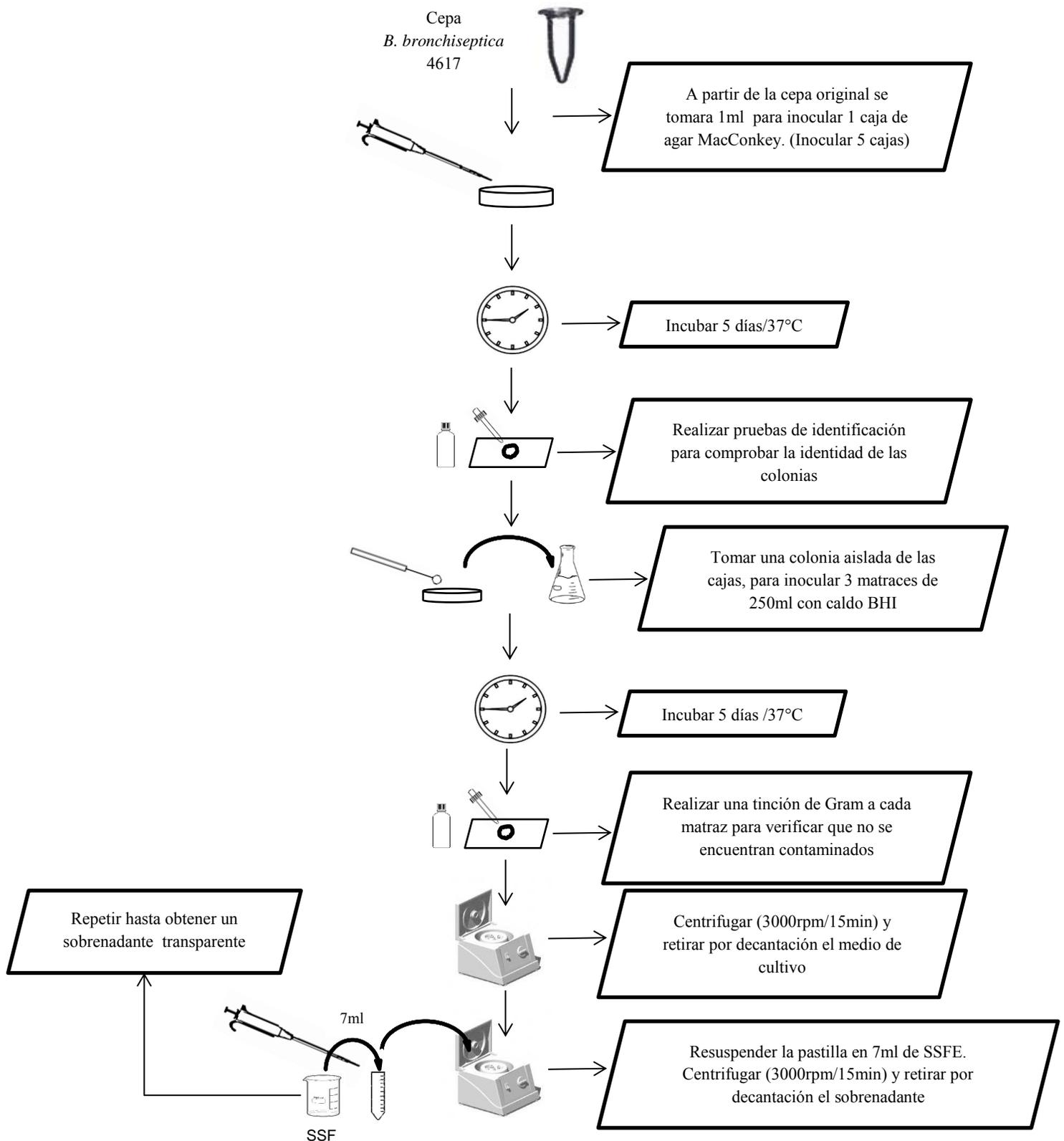
Posteriormente se retiró el medio de cultivo por centrifugación y se lavó la pastilla tantas veces como fuera necesario para obtener un sobrenadante transparente y poder colectarlo en un tubo cónico (estéril).

Con la finalidad de utilizar esta suspensión bacteriana como un antígeno solamente, se sometió el volumen total a una concentración del 3% de formaldehído durante 2 h para inactivarla. Se lavó y retiró todo el formaldehído. Ya que esto no garantiza que la bacteria ha dejado de ser posiblemente patógena, se le realizaron pruebas de viabilidad, inoculando 10 cajas de agar MacConkey con 0.5ml de esta nueva suspensión e incubándolas a 37°C durante 5 días.

Ya que al finalizar el periodo de incubación no se encontró crecimiento, se concluye que no es posible que la bacteria se siga multiplicando dentro de un organismo. De lo contrario se debe repetir la inactivación.

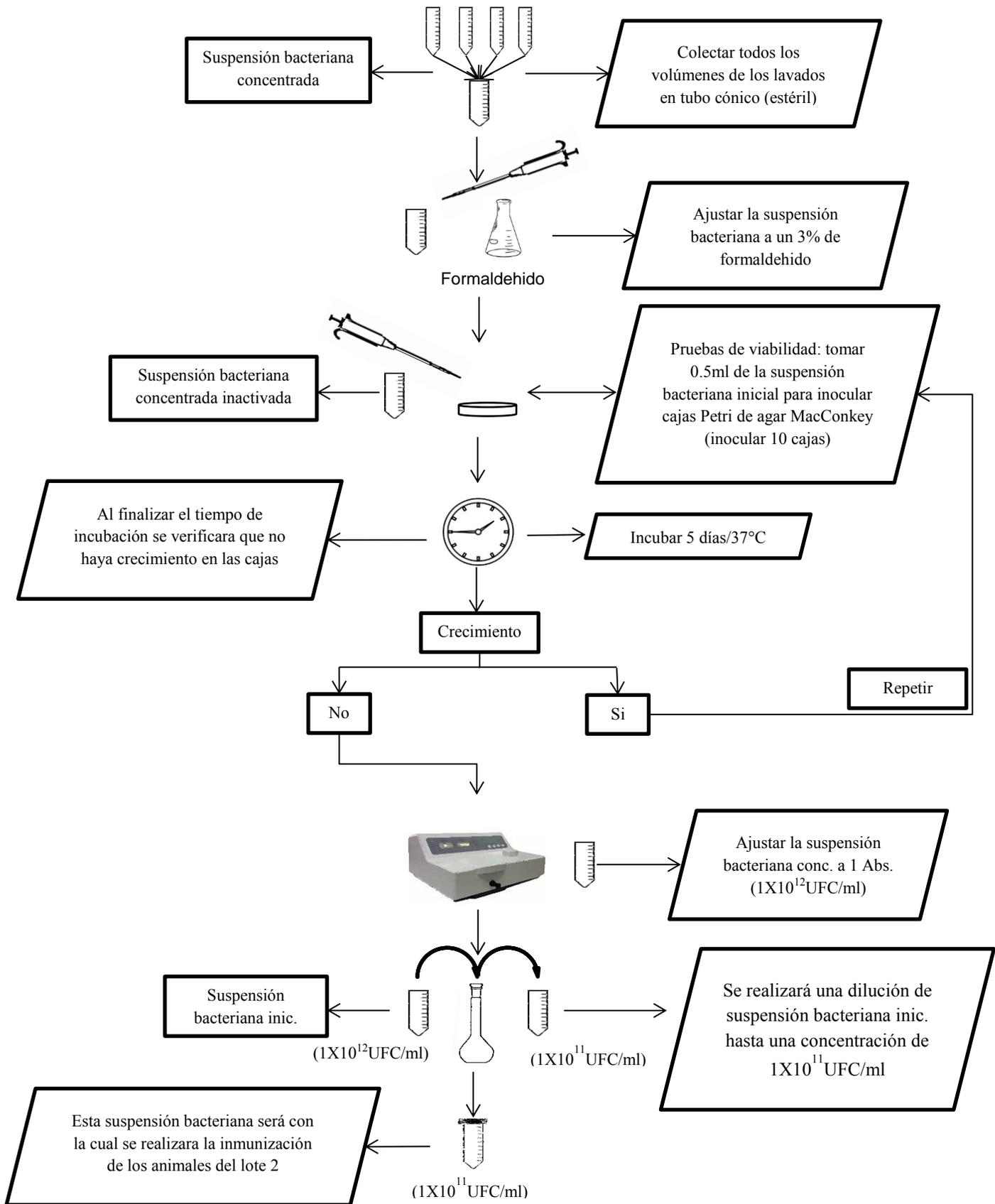
Finalmente se ajustó la suspensión bacteriana a una absorbancia de 1.0 que equivale a una concentración de 1×10^{12} UFC/ml con la cual se realizarán todos los procesos siguientes^{11, 16}.

Figura 2.- Diagrama preparación de la suspensión bacteriana



NOTA: Se deberá repetir la verificación de la viabilidad de la susp. bact. tantas veces como sea necesario, para comprobar que no le es posible desarrollarse y producir una infección en los animales

Figura 3.- Diagrama preparación de la suspensión bacteriana



NOTA: Se deberá repetir la verificación de la viabilidad de la susp. bact. tantas veces como sea necesario, para comprobar que no le es posible desarrollarse y producir una infección en los animales.

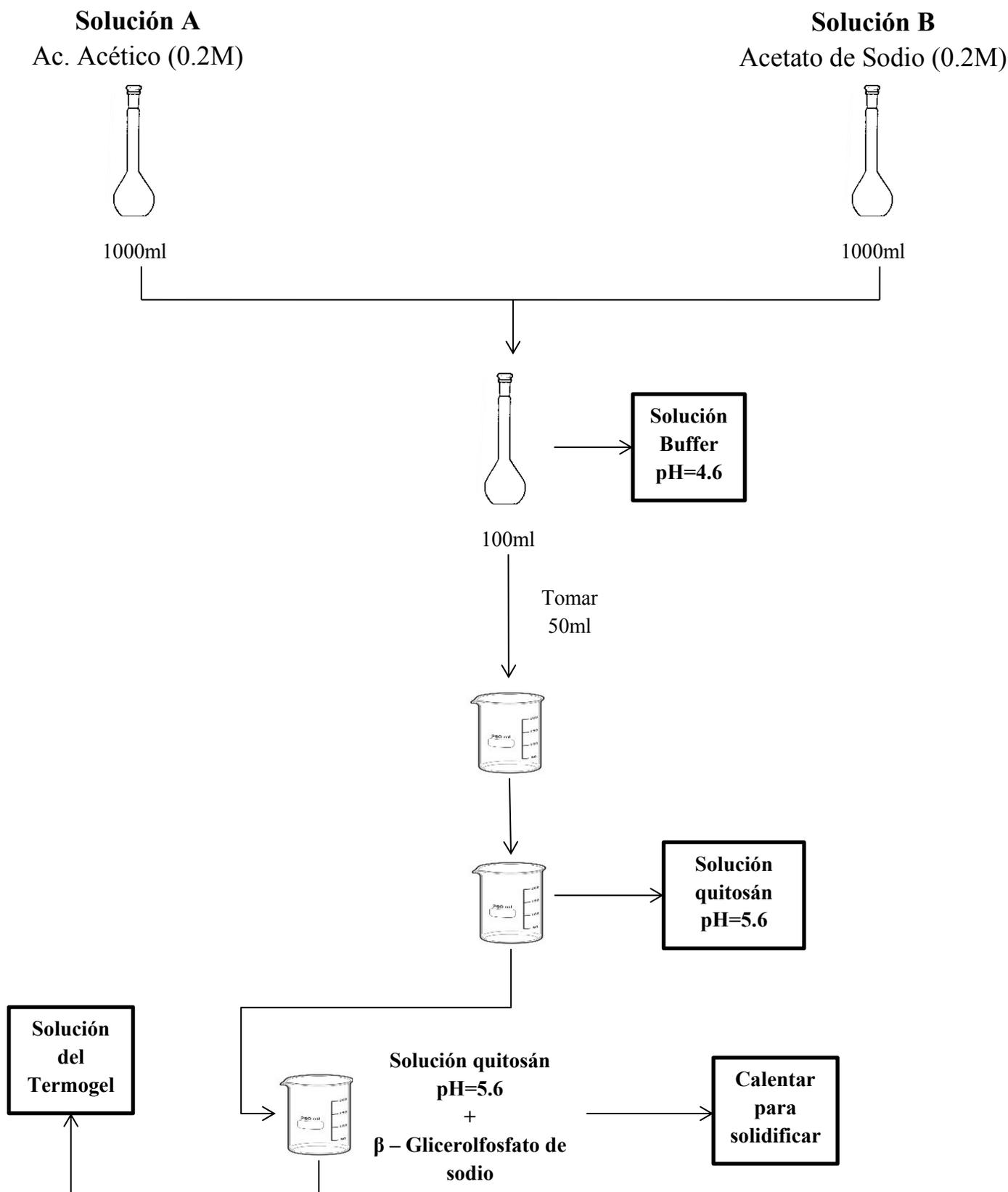
2.5. Preparación del termogel

El quitosán fue obtenido a partir de la extracción de quitina de exoesqueletos de camarón, en donde las condiciones de extracción así como la forma de desacetilación del biopolímero fueron estudiadas previamente por la Dra. Miranda (Miranda, 2011)²².

Para disolver el quitosán, todas las soluciones fueron preparadas por separado (Sol. A: Ac. Acético 0.2M y Sol. B: Acetato de sodio 0.2M) para formar la solución buffer en la cual se disolvió el quitosán hasta alcanzar una concentración del 2%.

De la solución (previamente enfriada) de quitosán al 2% se tomaron 5ml y se agregó y disolvió suavemente 0.5g de β - Glicerolfosfato de sodio (se mantendrá fría hasta su uso).

Figura 4.- Diagrama preparación del Termogel



NOTA: Al momento de agregar el β - Glicerolfosfato de sodio a la solución de quitosán 2% pH=5.6 deberá estar fría (en baño de hielo), para evitar que comience a gelificar el termogel

2.6. Preparación de los tratamientos

2.6.1. Preparación del tratamiento del lote 4 (Termogel + Susp. bacteriana)

La preparación debe realizarse estrictamente el mismo día en que se realice su administración.

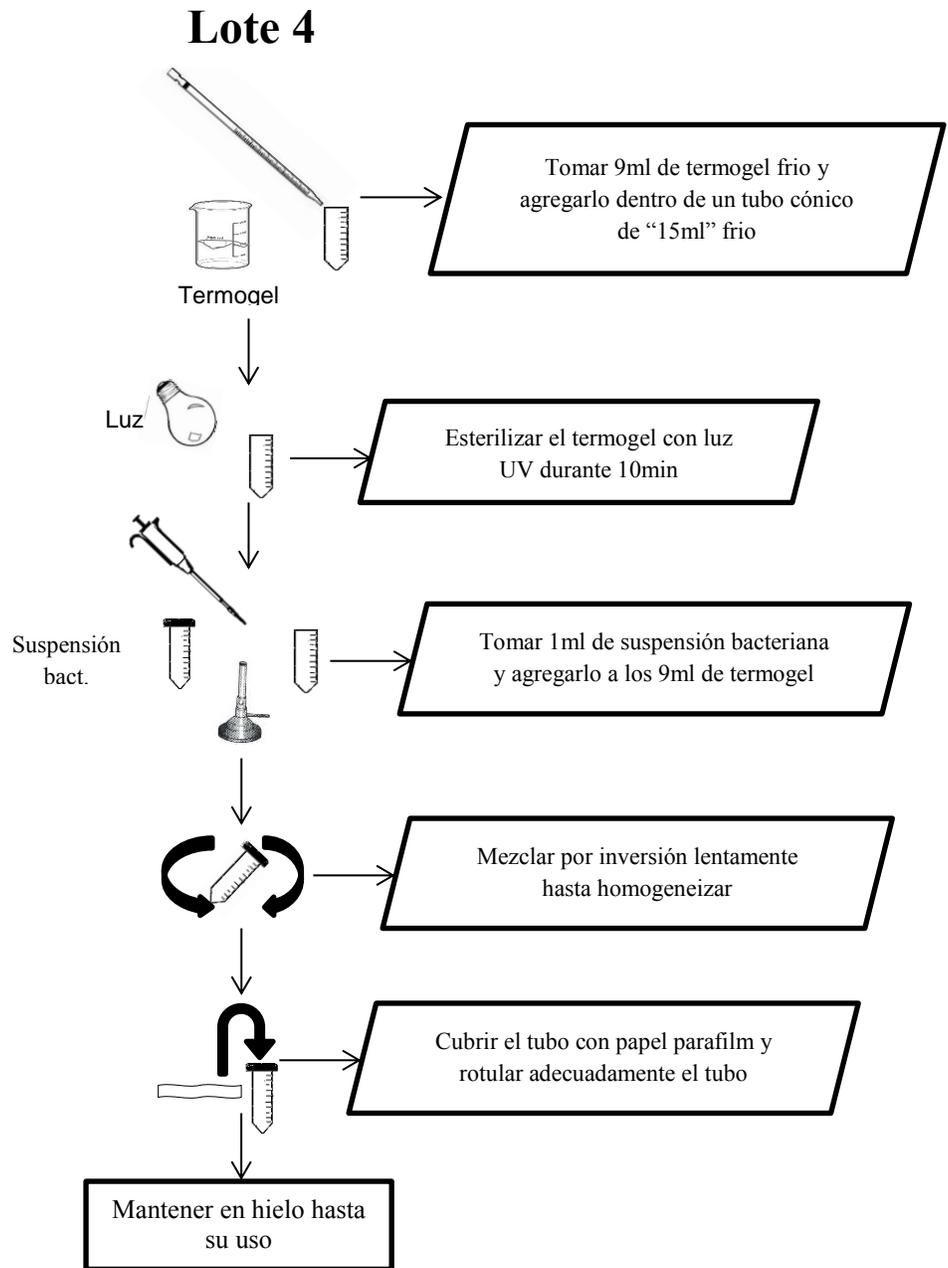
Se tomaron 9ml del termogel frío y se agregaron en un tubo cónico (15ml). Debido a que no es posible esterilizar esta solución con métodos que utilicen calor, se sometió 10 min a luz UV.

Desde este punto todo el proceso continuo bajo condiciones de esterilidad y enfriamiento continuo.

Se tomó 1ml (1×10^{12} UFC/ml) de la suspensión bacteriana y se agregó a los 9 ml del termogel en el tubo cónico, se tapó y se mezcló suavemente por inversión (Tratamiento lote 4).

Para evitar fugas o contaminación de la bacteria, se cubrió la tapa del tubo con papel parafilm y se le colocó dentro de una bolsa, para poder ser transportado dentro de una hielera.

Figura 5.- Preparación del tratamiento del



NOTA: La preparación de la bacterina deberá realizarse estrictamente el mismo día que se realice su administración

2.6.2. Preparación del tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bacteriana)

A partir de una presentación comercial, se tomaron 9 ml de gel de hidróxido de aluminio y se agregaron en un tubo cónico de 15ml. Con la finalidad de mantener las mismas condiciones en todos los tratamietos, se sometió 10 min a luz UV para esterilizar.

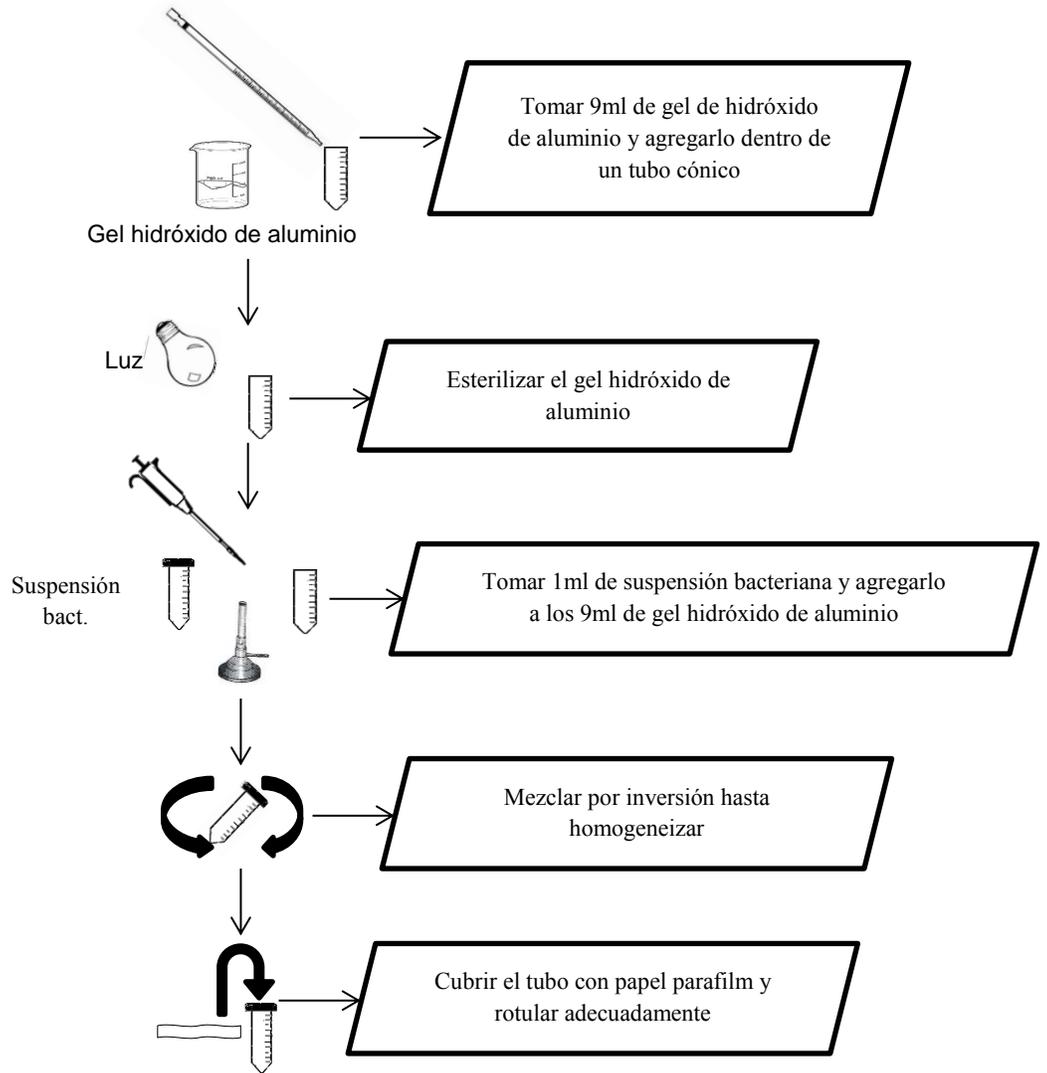
De la suspensión bacteriana se tomó 1ml (1×10^{12} UFC/ml) y se agregó a los 9 ml del gel de hidróxido de aluminio.

Desde este punto todo el proceso continuó bajo condiciones de esterilidad.

Para evitar fugas o contaminación de la bacterina se cubrió la tapa del tubo con papel parafilm y se le colocó dentro de una bolsa, para poder ser transportado.

Figura 6.- Preparacion del tratamiento del

Lote 5



2.7. Administración de los tratamientos

2.7.1. Tratamiento del lote 1 (Sin tratamiento)

No requerida.

El propósito del lote 1 como el blanco de la experimentación implicó que solo se alimentara y mantuviera a los animales en condiciones normales para ser tomados como una muestra sin cambios.

2.7.2. Tratamiento del lote 2 (Suspensión bacteriana)

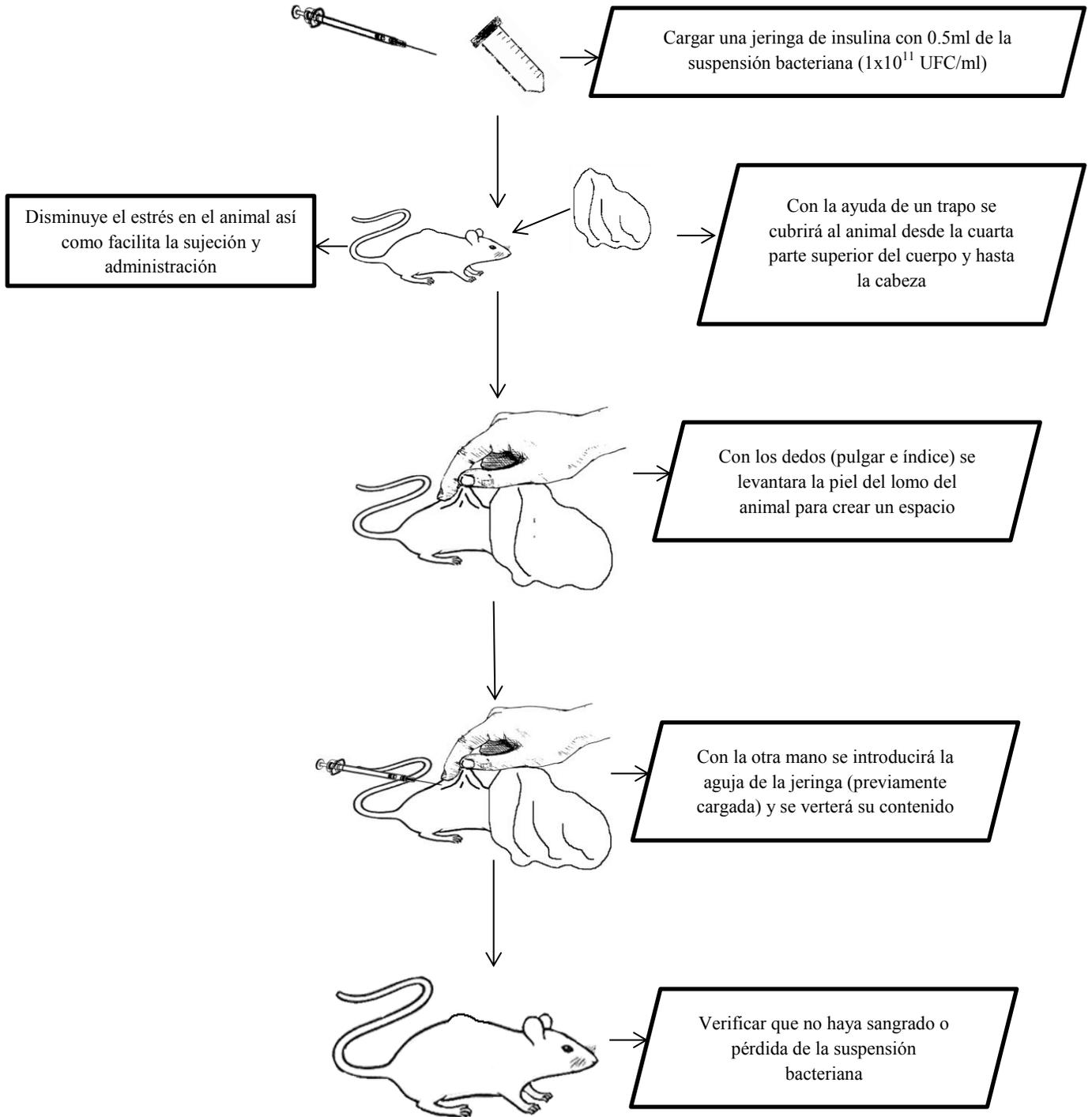
Para la administración de la suspensión bacteriana en los animales, se realizó una dilución 1:10 de la suspensión inicial para obtener una concentración igual a los otros tratamientos (1×10^{11} UFC/ml) de la cual se tomaron 0.5ml con una jeringa (1ml) nueva para cada animal (para evitar posibles procesos infecciosos).

Con la ayuda de un trapo, se sujetó a los animales cubriendo la mitad superior de su cuerpo (para disminuir el estrés y facilitar el procedimiento) y con los dedos pulgar e índice se levantó un poco la piel del animal para crear un espacio donde poder introducir la aguja y verter su contenido, se retiró la jeringa y se liberó al animal para su observación, cuidando que no hubiera pérdida de la suspensión bacteriana o un sangrado excesivo.



Figura 7.-Sujección y administración de los tratamientos en los animales

Figura 8.- Administración del tratamiento del Lote 2 (Suspensión bacteriana)



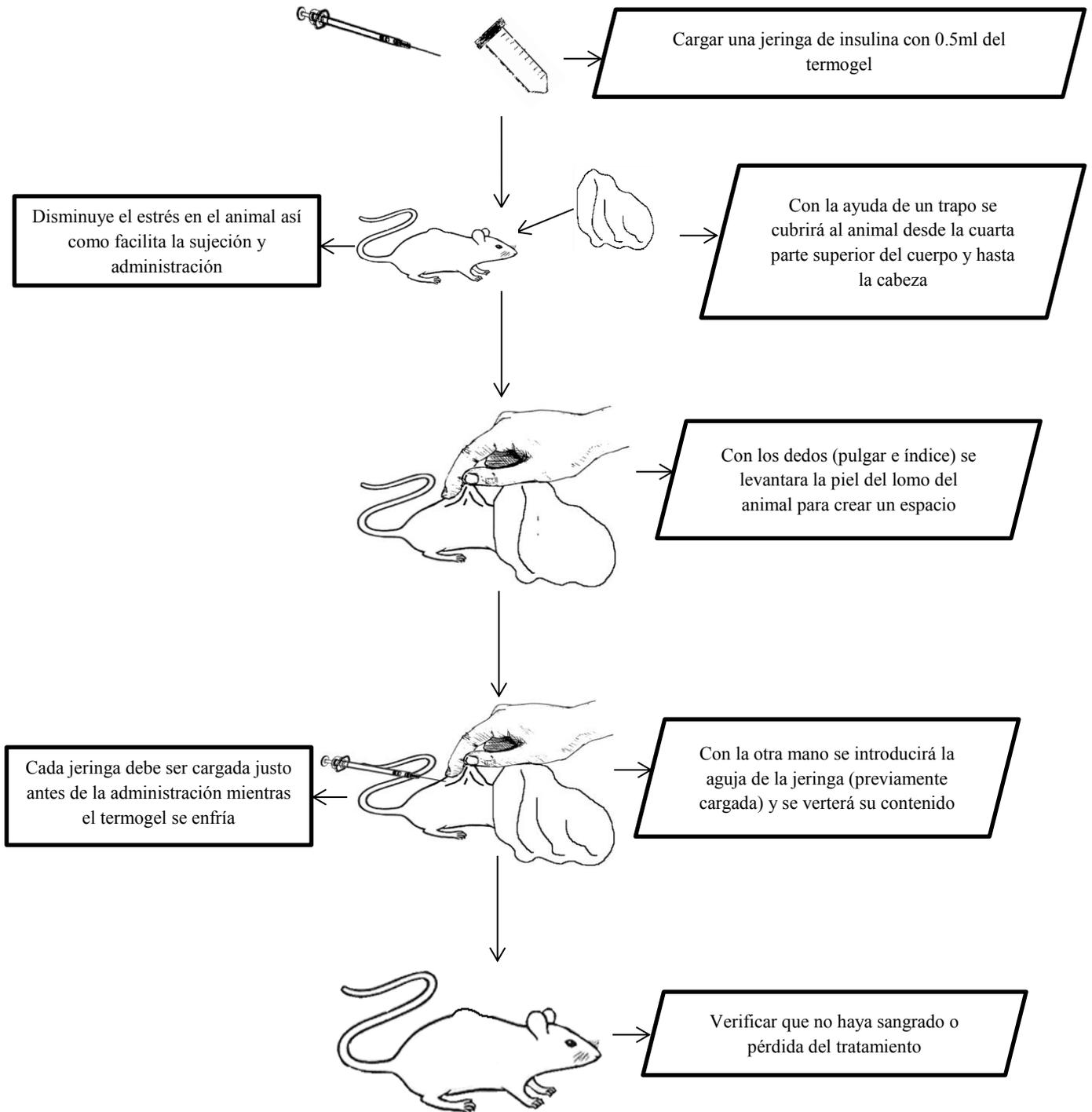
2.7.3. Tratamiento del lote 3 (Termogel)

La administración se llevó a cabo con la ayuda de una jeringa de 1ml nueva para cada animal con la cual se administraron 0.5ml de termogel.

Todo el proceso se realizó de forma rápida, administrando y cargando una jeringa a la vez para evitar el calentamiento del termogel que permaneció en todo momento en baño de hielo.

Con la ayuda de un trapo, se sujetó a los animales cubriendo la mitad superior de su cuerpo (para disminuir el estrés y facilitar el procedimiento) y con los dedos pulgar e índice se levantó un poco la piel del animal para crear un espacio donde poder introducir la aguja y verter su contenido, se retiró la jeringa y se liberó al animal para su observación, cuidando que no hubiera pérdida de termogel o un sangrado excesivo.

Figura 9.- Administración del tratamiento del Lote 3 (Termogel)

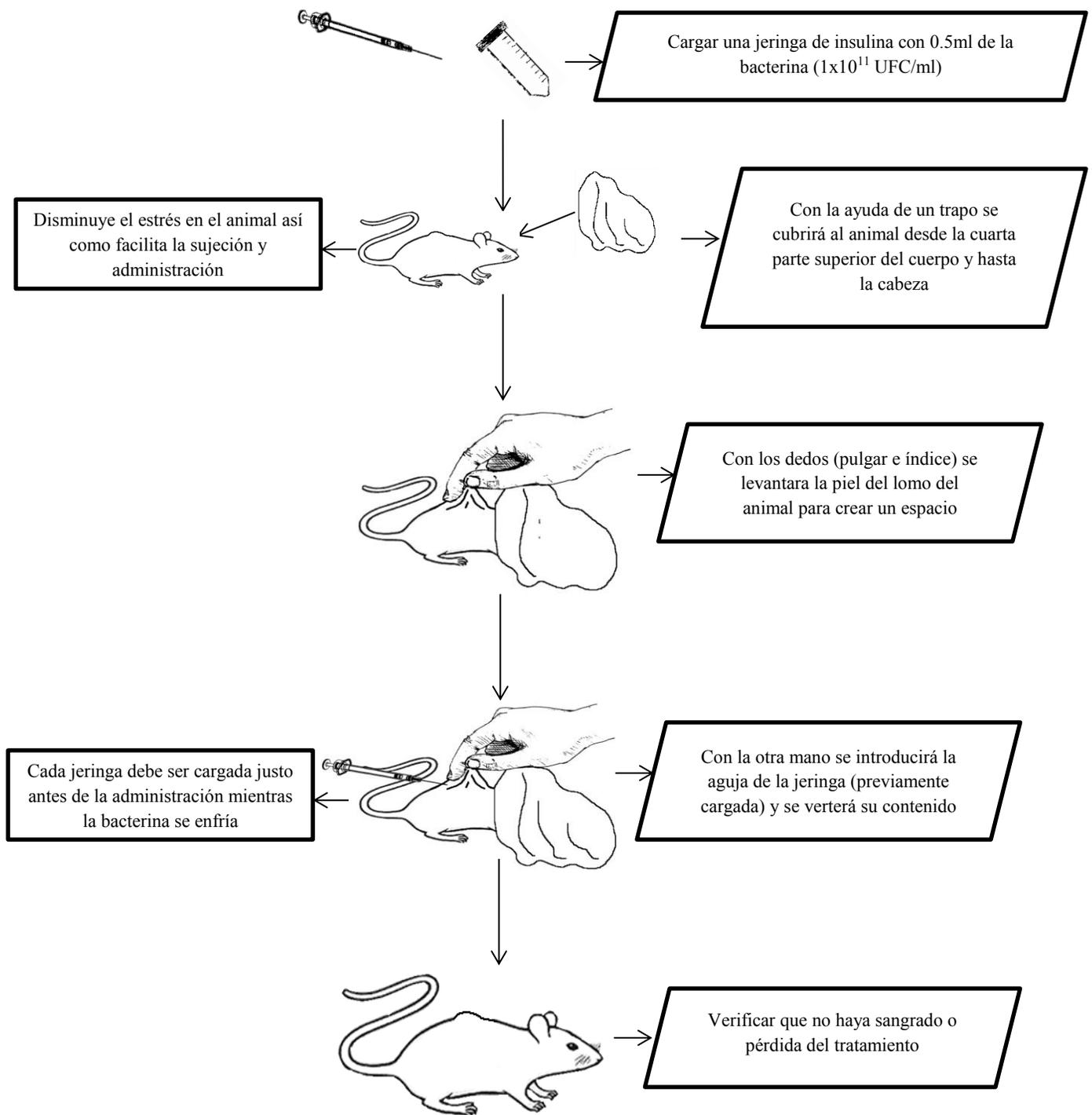


2.7.4. Tratamiento del lote 4 (Termogel + suspensión bacteriana)

Al igual que el lote 3 (Temogel) la administración de los animales del lote 4 se realizó de forma rápida, administrando y cargando con 0.5ml de tratamiento (1×10^{11} UFC/ml) una jeringa a la vez para evitar el calentamiento de este, permaneciendo todo momento en baño de hielo.

Con la ayuda de un trapo, se sujetó a los animales cubriendo la mitad superior de su cuerpo (para disminuir el estrés y facilitar el procedimiento) y con los dedos pulgar e índice se levantó un poco la piel del animal para crear un espacio donde poder introducir la aguja y vaciar su contenido, se retiró la jeringa y se liberó al animal para su observación, cuidando que no hubiera pérdida del tratamiento o un sangrado excesivo.

Figura 10.- Administración del tratamiento del Lote 4 (Termogel + Suspensión bacteriana)



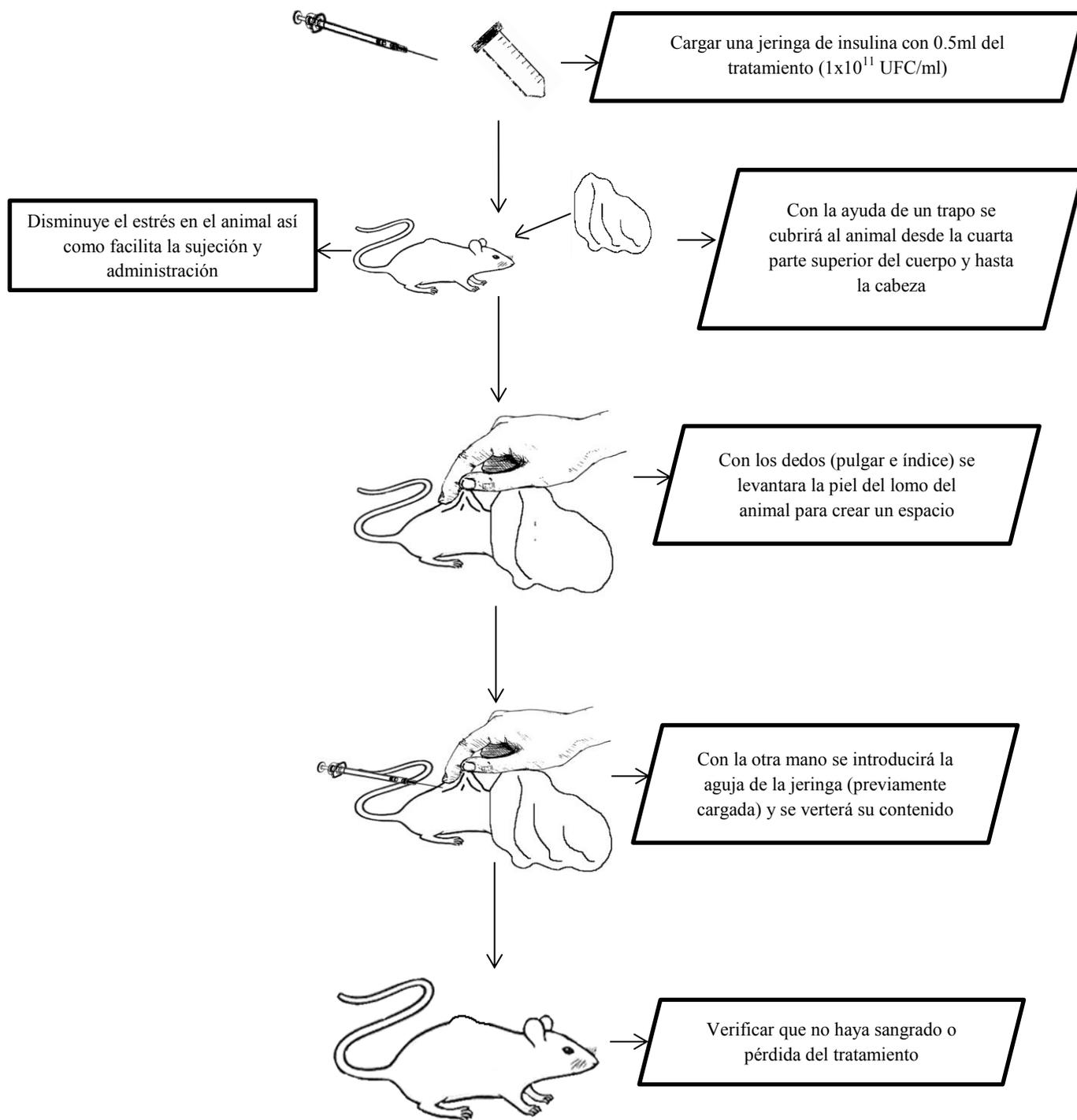
2.7.5. Tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + suspensión bacteriana)

La administración se llevó a cabo con la ayuda de una jeringa de 1ml nueva para cada animal con la cual se administraron 0.5ml de tratamiento (1×10^{11} UFC/ml).

Con la ayuda de un trapo, se sujetó a los animales cubriendo la mitad superior de su cuerpo (para disminuir el estrés y facilitar el procedimiento) y con los dedos pulgar e índice se levantó un poco la piel del animal para crear un espacio donde poder introducir la aguja y verter su contenido, se retiró la jeringa y se liberó al animal para su observación, cuidando que no hubiera pérdida del tratamiento o un sangrado excesivo.

No se requirió enfriamiento del tratamiento.

Figura 11.- Administración del tratamiento del Lote 5 (Gel aluminio + Suspensión bacteriana)



2.8. Flebotomía

Se realizó una toma de muestra sanguínea a cada animal de cada lote (500µl de sangre), una vez cada 2 semanas durante 4 meses, dando un total de 8 muestras por animal.

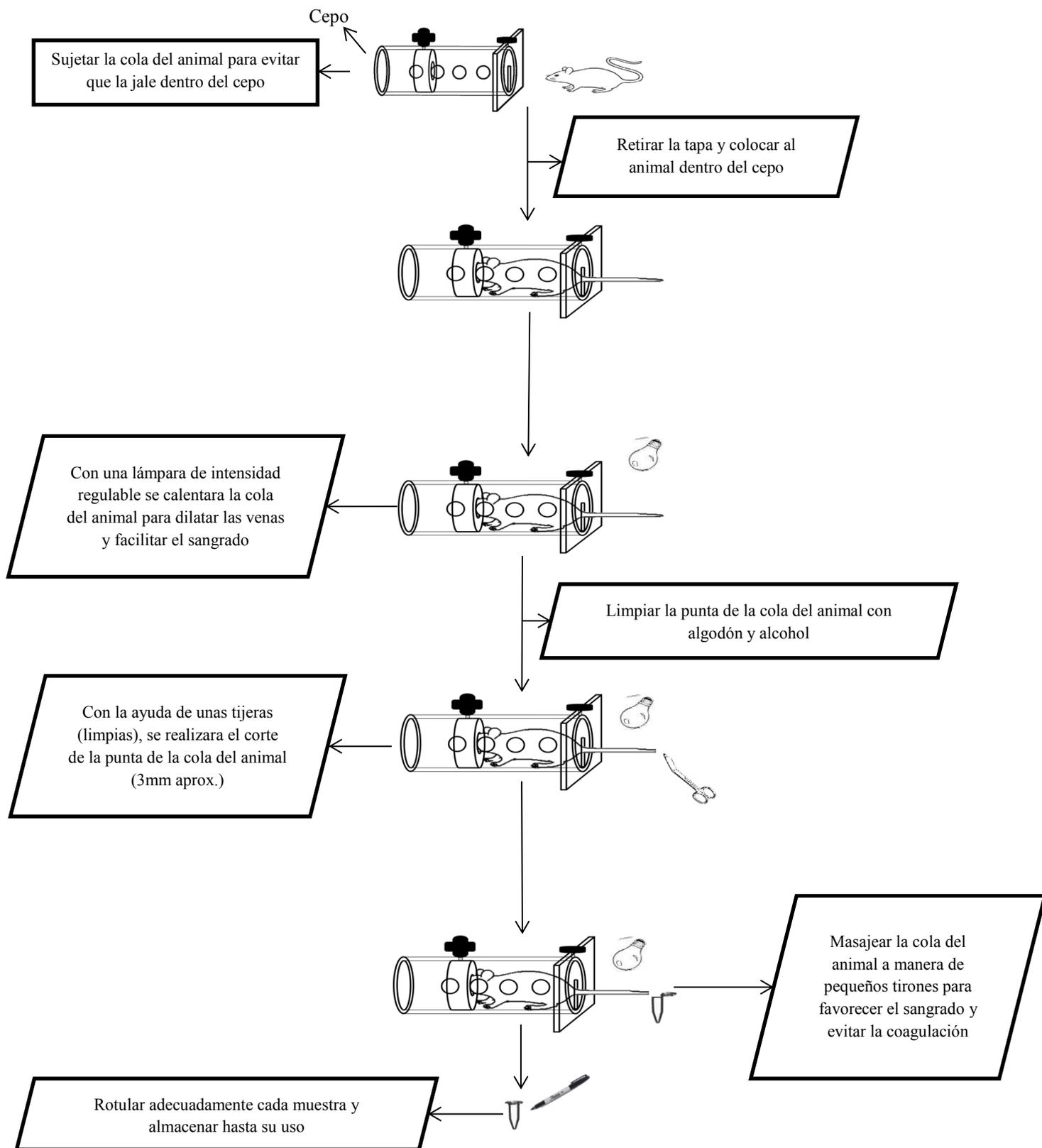
A cada animal se le colocó en cada ocasión dentro de un cepo para facilitar el manejo de éste.

Con la ayuda de una lámpara, se calentó la cola de los animales para dilatar los vasos sanguíneos y obtener un mayor volumen de sangre permitiendo colectarlo en un tubo cónico (2ml).

Con la finalidad de evitar posibles infecciones se limpió con alcohol la punta de la cola del animal previo a su corte y posterior a este se aplicó violeta de genciana.

Cada tubo fue rotulado con fecha, lote, nombre del animal y número de toma de muestra.

Figura 12.- Flebotomía



2.9. Aglutinación directa en suspensión de antígenos

En una micro placa tituladora se agregó a cada pozo de una fila 25µl de SSFE para tener un volumen constante en donde realizar las diluciones. En el primer pozo se agregaron 25µl de suero, posteriormente de este se tomaron 25µl y se pasaron al siguiente y sucesivamente hasta completar todas las diluciones.

Finalmente para completar la reacción Ag-Ac se agregó a cada pozo 25µl de una suspensión bacteriana 5×10^{10} UFC/ml y se agitó para homogenizar. Posteriormente se incubó a 37° durante 20 minutos; al finalizar la incubación se observó la placa para observar la presencia de botones o mallas ¹⁶.

Figura 13.- Aglutinación directa en suspensión de antígenos

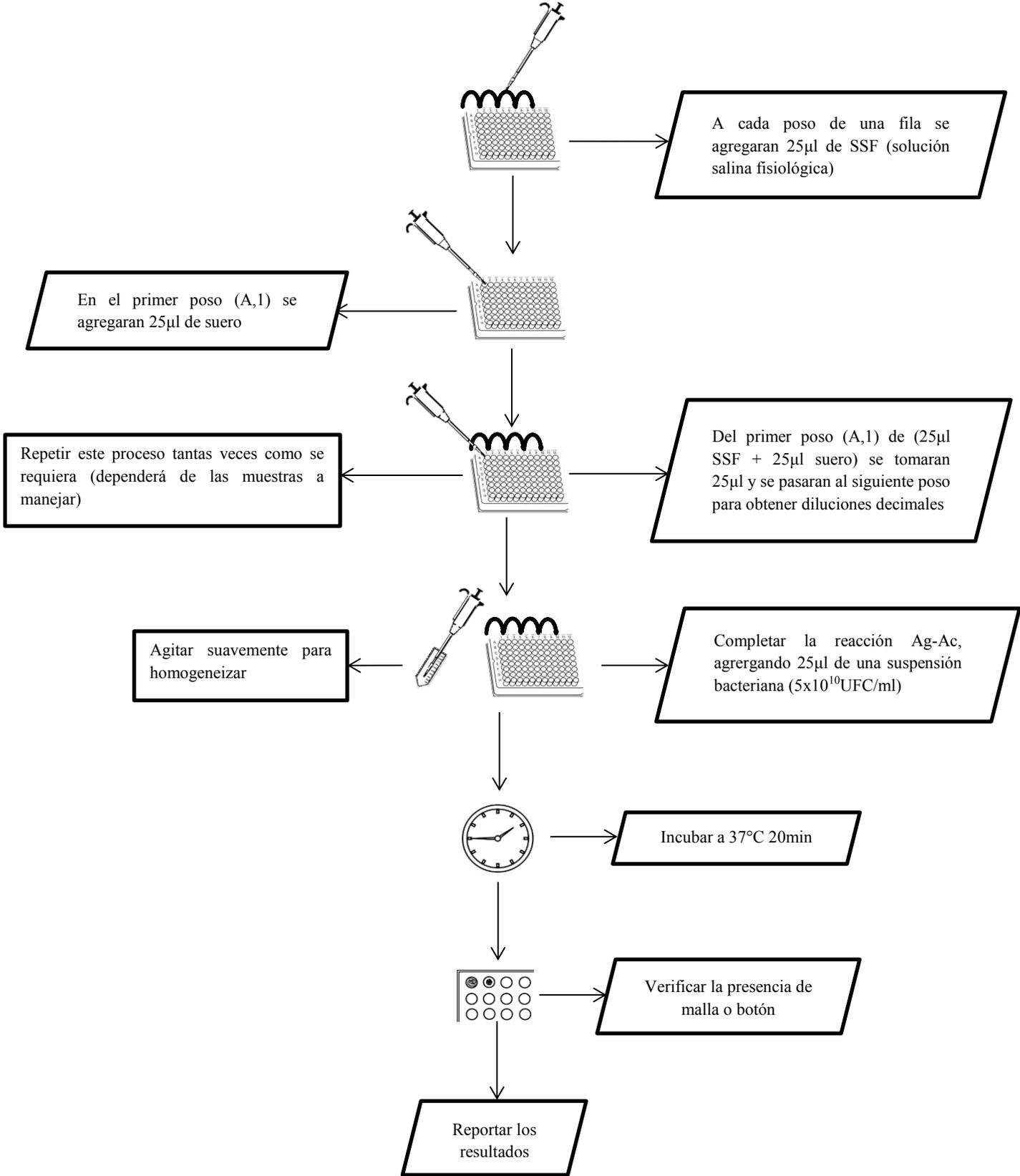
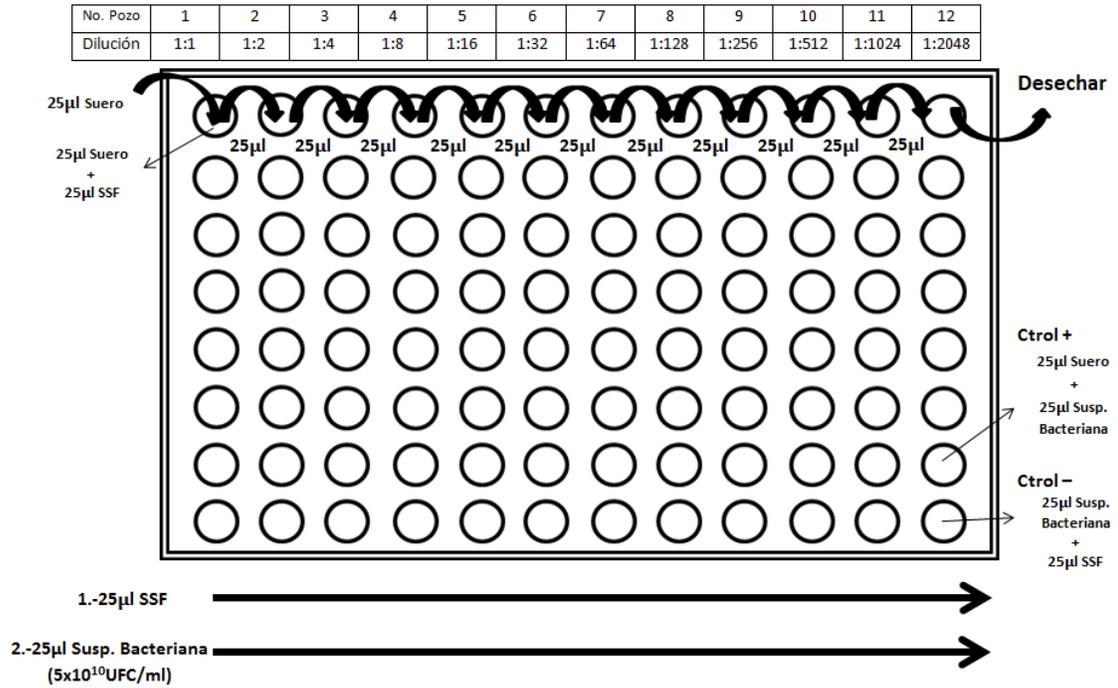


Figura 14.- Preparación de microplaca para aglutinacion



Capítulo III
RESULTADOS Y
DISCUSION

3. RESULTADOS

3.1. Marcado de los animales

Todos los animales fueron marcados y nombrados según la técnica mostrada en el tema 2.3.



Figura 15.- Marcado temporal con ácido pícrico

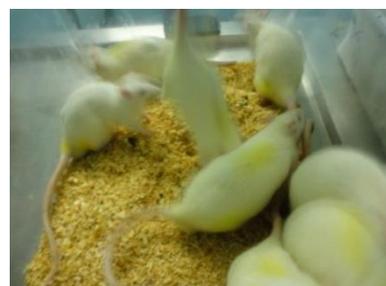


Figura 16.- Lote marcado con ácido pícrico

Tabla 8.- Animales asignados a cada lote marcado

Tratamientos	Control	Susp. Bact.	Termogel	Termo. + Susp. Bact.	Alum. + Susp. Bact.
Lote	1	2	3	4	5
Marcas asignadas a cada animal	Ca	CaCo	MiLo	PiCo	CaMiLo
	Lo	CaMi	MdPd	PdCo	CaMdPi
	Co	CaMd	MdCo	CaMiMdLo	CaMdPd
	Mi	CaPi	CaLoCo	CaMiLo	CaMdCo
	Md	CaPd	MiPd	LoPi	CaPiPd
	Pi	CaPiCo	MiCo	LoPd	CaMiPi
	Pd	MiMd	MdLo	LoCo	CaMiPd
	CaLo	MiPi	MdPi	PiPd	CaMiCo

Los animales tuvieron que ser remarcados una vez más durante el trayecto de la experimentación.

3.2. Preparación de la suspensión bacteriana (Tratamiento Lote 2)

La cepa *B. bronchiseptica* (4617) fue sembrada sin inconvenientes mostrando un crecimiento constante durante el período de incubación.

Para mayor seguridad se decidió realizar pruebas de identificación a las colonias obtenidas de la siembra de esta cepa, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 9.- Resultados obtenidos de las pruebas de identificación para *B. bronchiseptica*

Prueba	Resultado
Gram	Cocobacilos gram (-)
Catalasa	++
Oxidasa	+
SIM	H ₂ S(-), Ind.(-), Mot.(+)
Lisina	-
Ornitina	-
Arginina	-
O/F	Ligero O y F
Urea	+++
Citrato	+
Nitrato	+

Posteriormente para obtener una mayor cantidad de antígeno (bacterias) se tomó una de las colonias de *B. bronchiseptica* (ya comprobada) para inocular cada matraz de caldo BHI, donde el crecimiento fue abundante durante una semana.

Finalmente se extrajo todo el antígeno (bacterias) de cada matraz según la técnica indicada en el tema 2.4. obteniéndose así una suspensión bacteriana en un volumen total de 50ml, para luego ser sometida a una concentración del 3% de formaldehído para inactivarla.

Para comprobar la inactivación de las bacterias se inocularon 10 cajas de agar MacConkey en las cuales después de un periodo de 5 días de incubación a 37°C no se encontró ningún crecimiento.

Posteriormente a la centrifugación, la pastilla de células obtenidas se lavó y resuspendió en 50 ml de solución salina fisiológica. Se ajustó el volumen total con SSF a 1 de absorbancia en un espectrofotómetro para obtener una concentración de 1×10^{12} UFC/ml solución con la cual se realizaron todos los procesos siguientes¹¹.

Para la administración de esta solución en los animales, se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración igual a los otros tratamientos (1×10^{11} UFC/ml).

3.3. Preparación del termogel (Tratamiento Lote 3)

El quitosán utilizado fue obtenido en el Laboratorio de Biotecnología bajo el procedimiento de la patente (Miranda, 2011) posee las siguientes características: polvo fino de color blanco con un peso molecular promedio de 90,297 KDa y el grado de desacetilación fue de 83%

Este quitosán mostro una gran solubilidad en el buffer (pH=4.6) obteniéndose una solución transparente sin partículas suspendidas con un pH final de pH=5.6 y la solución continuo sin cambios.

Al agregar el β - Glicerolfosfato la solución comenzó a tornarse turbia y de color blanco. Todo este procedimiento se llevó a cabo en un baño de hielo ya que la elevación de la temperatura podría provocar que el termogel gelificara.

Posterior a ello se mantuvo todo el tiempo frio hasta su uso.

3.4. Preparación del tratamiento del lote 4 (Termogel + Susp. bacteriana)

Se comenzó con la solución del termogel frío (9ml) en un tubo cónico y se sometió 10 min a luz UV sin causar un cambio aparente en el termogel. Bajo condiciones de esterilidad se agregó 1ml de la suspensión bacteriana y se mezcló por inversión, sin causar un cambio perceptible.

Esta preparación final se mantuvo en estado líquido gracias que permaneció en hielo hasta su uso.

3.5. Preparación del tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bacteriana)

Previo a mezclar la suspensión bacteriana (1ml) con el gel de hidróxido de aluminio (9ml) se sometió este a una exposición de 10min de luz UV (con la finalidad de mantener el método de esterilización constante) sin causar un cambio aparente en el gel de hidróxido de aluminio procediendo a mezclarse con la suspensión bacteriana y almacenado hasta su administración.

3.6. Administración de los tratamientos

La administración de los animales, similar para cada tratamiento, se realizó sin inconvenientes ya que ningún animal mostro sangrado o excreción de fluidos, además de que el uso del baño de hielo evito la solidificación del termogel permitiendo administrar completo el tratamiento de todos los animales.

Con respecto a la zona de administración en los animales, cada tratamiento mostro diferentes características como, el tamaño de abultamiento y la textura de estos.

Los abultamientos que mostraron los lotes 3 (Termogel) y 4 (Termogel + Susp. bact.) fueron considerablemente grandes, hasta 2cm por encima del lomo de los animales y con una consistencia firme similar a un musculo.



Figura 17.- Abultamiento en la zona de administración en un animal del lote 3 (Termogel)



Figura 18.- Abultamiento en la zona de administración en un animal del lote 4 (Termogel + Susp. bact.)



Figura 19.- Abultamiento en la zona de administración

Cabe mencionar que a pesar de la textura solida del abultamiento en estos lotes los animales no mostraban señales que indicaran incomodidad o dolor al aplicar presión sobre ellos días posteriores a su administración.

El lote 2 (Suspensión bacteriana) posterior a su administración no mostro un abultamiento visible y solo perceptible al tacto.

Con lo que respecta al lote 5 (Alum. + Susp. bact.) el abultamiento mostrado fue igualmente grande como en los lotes 3 y 4 pero de consistencia más suave e igualmente indoloro al aplicar presión sobre ellos.

El propósito del lote 1 como el blanco de la experimentación implico que solo se alimentara y mantuviera a los animales en condiciones normales para ser tomados como una muestra sin cambios.

3.7. Flebotomía

La toma de muestras se comenzó desde un día antes de la administración de los tratamientos para tener el control de cada animal y asegurar que los resultados posteriores fueran debido al tratamiento.



Figura 20.- Calentado para dilatar capilares



Figura 21.- Corte de la punta de la cola

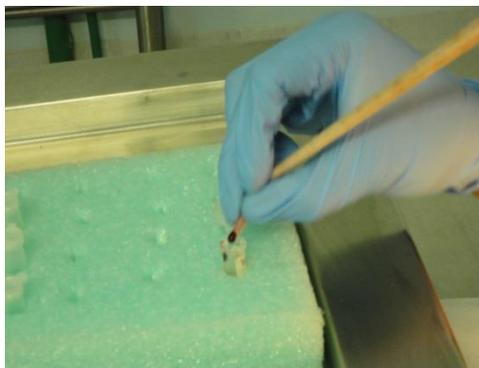


Figura 22.- Goteo y llenado de tubo

Al comienzo de la experimentación durante las primeras tomas de muestras el proceso fue sencillo y permitiendo obtener un buen volumen de sangre, sin embargo a partir de la 3° y 4° toma se tornó complicada y escasa. Incluso algunos animales a partir de la 4° toma de muestra comenzaron a mostrar ligeras lesiones cutáneas en la cola (Figura 23) que continuaron incrementándose con forme el proyecto avanzaba llegando a impedir algunas tomas de muestra y convirtiéndole en uno de los motivos principales para detener la experimentación.



Figura 23.- Lesión en la epidermis de la cola de los animales

La presencia de estas lesiones en la cola de los animales puede deberse a que no se brindó el tiempo suficiente para que cicatrizara adecuadamente la piel y los capilares de la cola, causando un traumatismo grave a las células, aunado a esto la exposición de la cola al calor de la lámpara y el masaje para facilitar el sangrado favorecieron la laceración de la piel incrementando el daño en cada toma de muestra ⁴⁰.

Aunado a esto desde de la 5° toma algunos animales con tratamientos que involucraron el uso del termogel, comenzaron a mostrar lesiones como enrojecimiento y costras en la zona de administración.

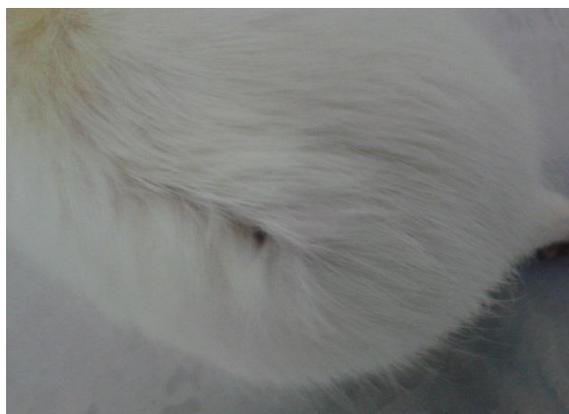


Figura 24.- Inicio de la lesión en la zona de administración

Dada estas lesiones se recurrió a un experto en el manejo y cuidado de estos animales para diferenciar si se trataban de lesiones cutáneas por inflamación, infección o tal vez a una posible lesión por un rascado excesivo de los animales o a una pelea.

Se confirmó que estas lesiones no se debían a rascado o peleas ya que el pelo de los animales permanecía en la zona afectada. Por tal motivo se prosiguió a una continua observación de los animales para comprobar que no se rascaran. Posterior a dos semanas de observación (en las cuales no se detuvo la experimentación) se comprobó que los animales no se rascaban ni mostraban alteración en su comportamiento como nerviosismo o irritabilidad.

Aun así después de la 6° toma de muestra se comenzó a considerar finalizar el proyecto debido a que los animales ya mostraban lesiones más grandes tanto en la cola como en la zona de administración (Figura 25) donde incluso ya se mostraba pérdida del tratamiento.

Dado que las lesiones no fueron causadas por factores externos como rascado es de suponer que la lesión fue causada por el tratamiento administrado justo en la zona lesionada y presente solo en animales con tratamiento de termogel⁴⁰.



Figura 25.- Evolución de la lesión en la zona de administración

La toma de muestra se continuó hasta 2 tomas más y se finalizó el proyecto.

3.8. Histopatología

Con los resultados obtenidos fue indispensable un diagnóstico más certero que una observación superficial, por lo que se realizaron estudios histopatológicos de cada tratamiento (1 por cada tratamiento) de la zona de administración.



Figura 26.- Corte de tejido cutáneo conteniendo el tratamiento después de 4 meses

Después de una semana se dio el diagnóstico histopatológico correspondiente a cada una de las muestras confirmando lo siguiente:

Lote 1 - Sin tratamiento

- SCPA (sin cambio perceptible aparente)



Figura 27.- Piel normal de un animal del lote 1 control (Sin tratamiento)

Lote 2 - Suspensión bacteriana

- Dermatitis linfocítica con fibroplasia moderada



Figura 28.- Piel normal de un animal del lote 2 (Suspensión bacteriana)

Desde el comienzo del proyecto al administrar a los animales con suspensión bacteriana no se notó un cambio en la zona de administración y de igual forma tampoco al finalizar (Figura 28), sin embargo el estudio histopatológico reveló que la administración directa de la suspensión bacteriana se localizó en una zona pequeña lo cual focalizó la respuesta inmune concentrando un gran número de células leucocitarias y lesionando la piel en un grado leve ya que también se muestra el inicio de la cicatrización (fibroplasia) de esta zona^{8, 29}.

Lote 3 - Termogel

- Dermatitis granulomatosa focal severa



Figura 29.- Piel lesionada de un animal del lote 3 (Termogel)

Lote 4 - Termogel + suspensión bacteriana

- Dermatitis granulomatosa focal severa



Figura 30.- Piel gravemente lesionada de un animal del lote 4 (Termogel + Susp. bact)

Gracias al estudio histopatológico realizado se confirmó el diagnóstico dado en el que se indica que la lesión no se causó por una pelea o rascado excesivo del mismo animal sino que la lesión fue provocada por una fuerte respuesta inmune focalizada atrayendo monocitos y fagocitos que comenzaron a atacar al antígeno (*B. bronchiseptica*) en estrecho contacto con células epiteliales y matriz extracelular destruyéndolas lo que, aunado a la cantidad de

termogel administrada causó un gran abultamiento sólido con la fuerza suficiente como para oprimir los capilares en la piel que rodea el cuerpo extraño impidiendo la oxigenación adecuada de las células obligándolas a morir (úlceras por presión) abriendo la piel e indicando que el daño no fue por toxicidad del tratamiento sino un simple exceso de éste en una zona pequeña ^{8, 29}.

Lote 5 - Gel aluminio + suspensión bacteriana

- Dermatitis linfocítica leve con destrucción leve de matriz pilosa y Necrosis de Zenker en músculo subcutáneo



Figura 31.- Piel con lesión ligera de un animal del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bact)

A diferencia de los otros tratamientos este resultó causante de un menor daño ya que solo presentó una fuerte respuesta inmune provocando daño cutáneo mínimo sin ulcerar la piel, debido a que la consistencia líquida del gel de aluminio generó un abultamiento menos rígido que el termogel y por lo tanto oprimiendo menos los capilares. Sin embargo la histopatología reveló que el daño a causa de la fuerte reacción inmunológica es evidente ya que se muestra la presencia de múltiples células linfocíticas en la zona dañando el tejido cercano (necrosis de Zenker) ²⁹.

3.9. Aglutinación directa en suspensión de antígenos

Al empezar a utilizar esta técnica se encontraron algunos problemas para su estandarización ya que no se lograba diferenciar la reacción antígeno anticuerpo de una sedimentación.

Ya que tanto el termogel como el gel de hidróxido de aluminio estaban pensados como agentes de liberación lenta, se comenzó trabajar con las primeras muestras del tratamiento 2 donde la suspensión bacteriana entraría en contacto directo con el organismo y por tanto desencadenaría una respuesta más rápida aunque de baja intensidad lo que dificultó la visualización de la reacción antígeno anticuerpo.

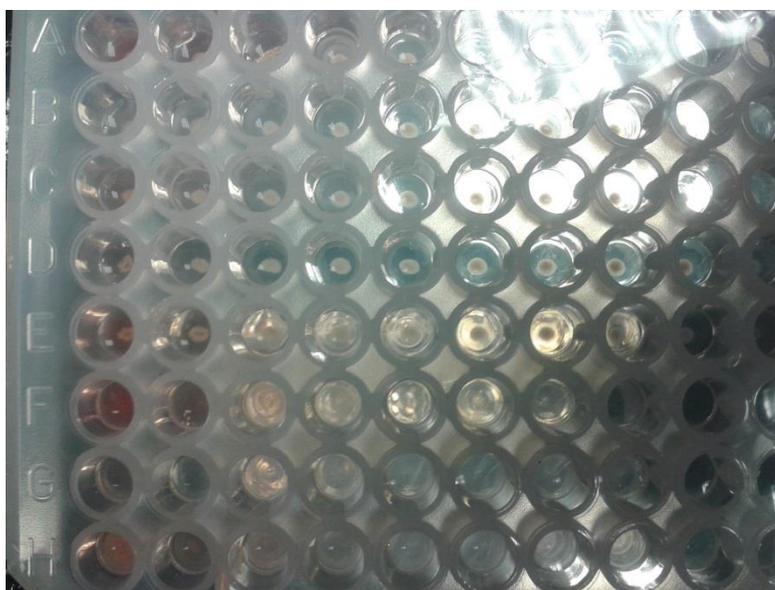


Figura 32.- Micro placa tituladora con difícil visualización de aglutinación

Por tal motivo se esperó a obtener una muestra posterior a un mes de la administración en la cual teóricamente se encontraría el punto más elevado de anticuerpos de acuerdo a la literatura^{25, 35}.

Finalmente al tener muestras posteriores a un mes de la administración se volvió a repetir la técnica pero con suero de los animales del tratamiento 4 donde se esperó encontrar un mayor título de anticuerpos gracias al efecto adyuvante del termogel y con lo cual fue posible obtener una fuerte reacción antígeno anticuerpo donde fue sencillo evidenciar la aglutinación.

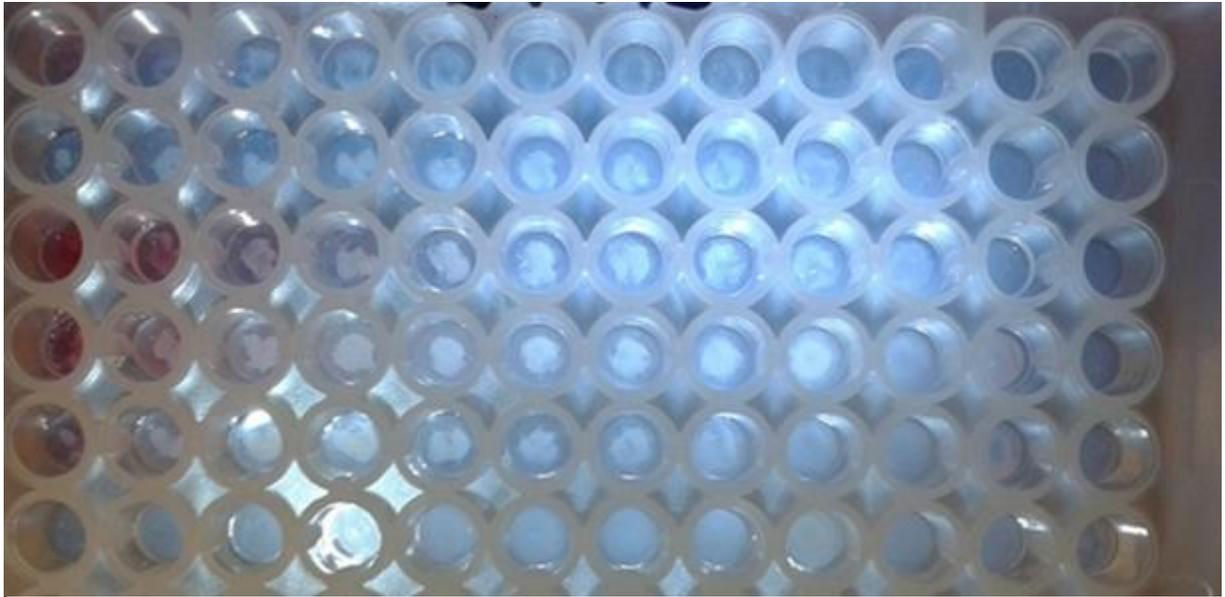


Figura 33.- Micro placa tituladora con evidente reacción de aglutinación

Se repitió la técnica varias veces para estandarizarla, posteriormente se procedió a determinar el título de anticuerpos de cada muestra obtenida y encontrándose con un coherente incremento de este conforme el avance del tiempo de cada toma de muestra.

Con lo que respecta a cada lote, mostraron un comportamiento único para cada uno.

3.10. Tratamiento del lote 1 (Sin tratamiento)

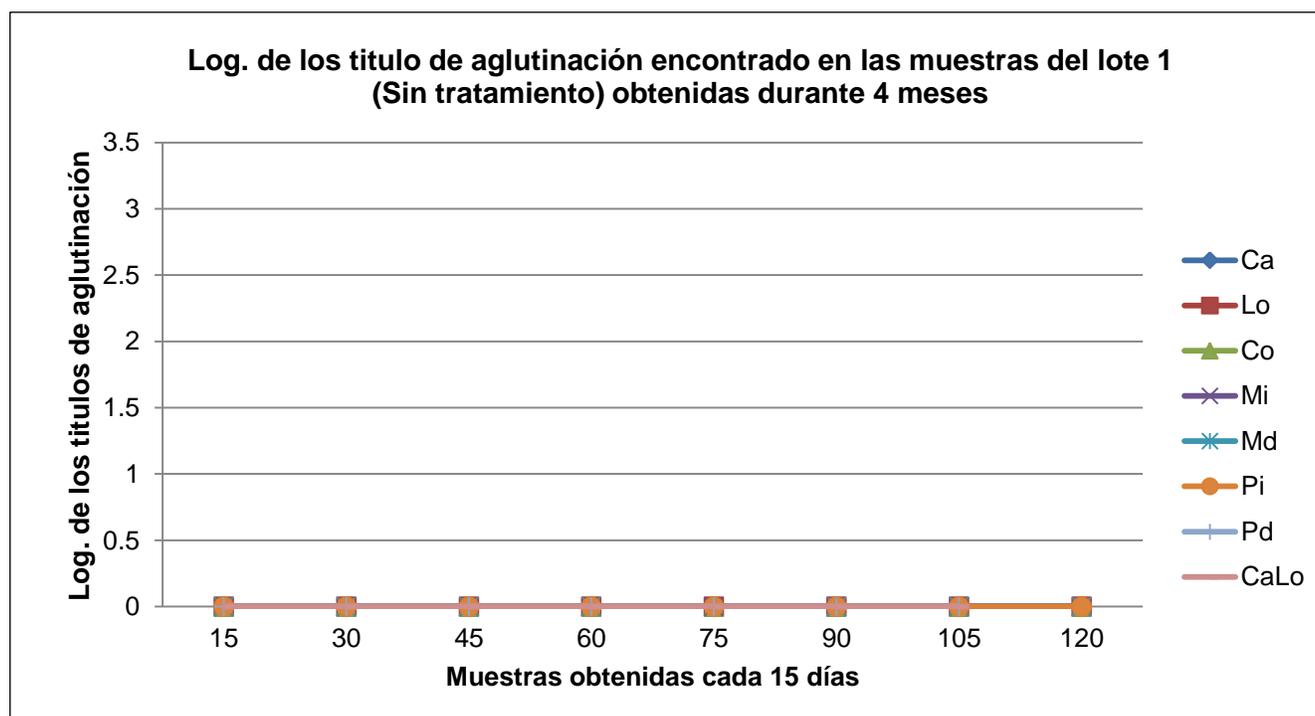
No mostraron anticuerpos.

Tabla 10.- Resultados obtenidos del lote 1 (Sin tratamiento) al finalizar el proyecto

Animales	Log. de los titulo de aglutinación encontrado en las muestras obtenidas durante 4 meses							
	15	30	45	60	75	90	105	120
Ca	0	0	0	0	0	0	0	0
Lo	0	0	0	0	0	0	0	0
Co	0	0	0	0	0	0	0	0
Mi	0	0	0	0	0	0	0	0
Md	0	0	0	0		0	0	0
Pi	0	0	0	0	0	0	0	0
Pd	0	0	0	0	0	0	0	
CaLo	0	0	0	0	0	0	0	

Nota: En ocasiones no fue posible obtener muestras de algunos animales.

Gráfico 1.- Resultados obtenidos del lote 1(Sin tratamiento) al finalizar el proyecto



3.11. Tratamiento del lote 2 (Suspensión bacteriana)

El uso de un tratamiento que no incluye adyuvantes, nos permite observar el comportamiento del antígeno (*B. bronchiseptica*) solo y que tanto es capaz de inducir la respuesta inmune permitiéndonos comprobar que los resultados obtenidos de otros tratamientos sean consecuencia de los adyuvantes y no solo la respuesta al antígeno.

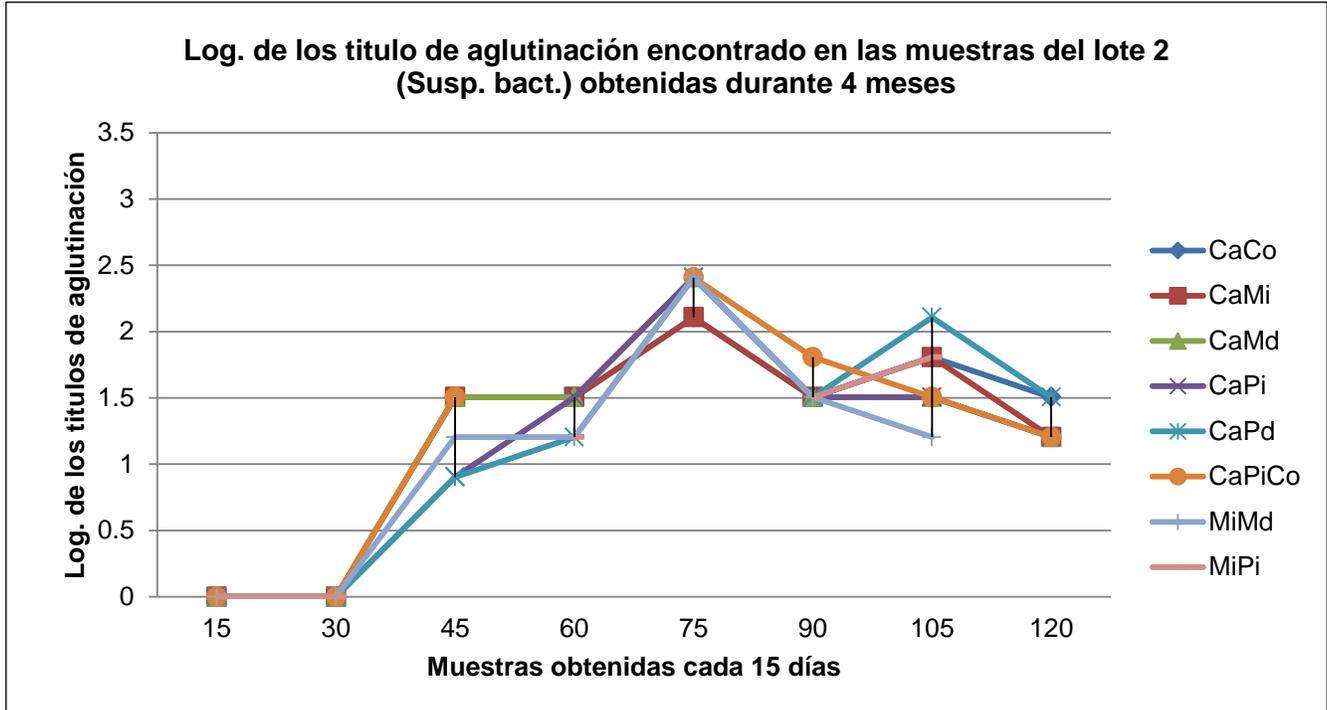
A pesar de ser un tratamiento donde todo el antígeno entro en contacto directo con el organismo, no mostro un incremento de anticuerpos de forma más rápida que los otros tratamientos ni muy elevado, sin embargo los incrementos se mostraron de forma similar a los tratamientos con adyuvante pero en menor grado. Esto debido a que de cualquier forma la respuesta inmune requiere de un tiempo para completarse y evidenciar anticuerpos en sangre periférica y que no se incluye un agente que favorezca la presencia de células inmunitarias.

Tabla 11.- Resultados obtenidos del lote 2 (Susp. bact.) al finalizar el proyecto

Animales	Log. de los titulo de aglutinación encontrado en las muestras obtenidas durante 4 meses							
	15	30	45	60	75	90	105	120
CaCo	0	0	1.50515	1.50515	2.10721	1.50515	1.80618	1.50515
CaMi	0	0	1.50515	1.50515	2.10721	1.50515	1.80618	1.20412
CaMd	0	0	1.50515	1.50515	2.40824	1.50515	1.50515	1.20412
CaPi	0	0	0.90309	1.50515	2.40824	1.50515	1.50515	1.20412
CaPd	0	0	0.90309	1.20412	2.40824	1.50515	2.10721	1.50515
CaPiCo	0	0	1.50515		2.40824	1.80618	1.50515	1.20412
MiMd	0	0	1.20412	1.20412	2.40824	1.50515	1.20412	
MiPi	0	0		1.20412		1.50515	1.80618	

Nota: En ocasiones no fue posible obtener muestras de algunos animales.

Gráfico 2.- Resultados obtenidos del lote 2 (Susp. bact.) al finalizar el proyecto



3.12. Tratamiento del lote 3 (Termogel)

Desde el comienzo se contempló que el termogel no sería capaz de desencadenar una respuesta inmune, sin embargo a partir de la 3^o toma de muestra comenzó a mostrarse un aumento del título de anticuerpos y que continuo en las siguientes dos tomas, sin embargo al alcanzar su punto máximo en la 5^o toma de muestra no fue tan alto como el punto máximo de los tratamientos 4 y 5 e incluso de menor duración ya que a partir de la 6^o toma de muestra empezó a decrecer considerablemente y llegando a desaparecer en la 8^o toma.

Sin embargo estudios recientes han demostrado que el uso de un gel implantado dentro de un organismo se ve rápidamente infiltrado (4 horas) por neutrófilos y macrófagos que a su vez atraen linfocitos. Además estas células al presentar receptores Toll que funcionan como detectores de agentes infecciosos uniéndose a PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) como los que presenta la quitina como precursor del quitosán ha demostrado tener la capacidad de estimular macrófagos tanto en vivo como invitro.^{2,3,4}

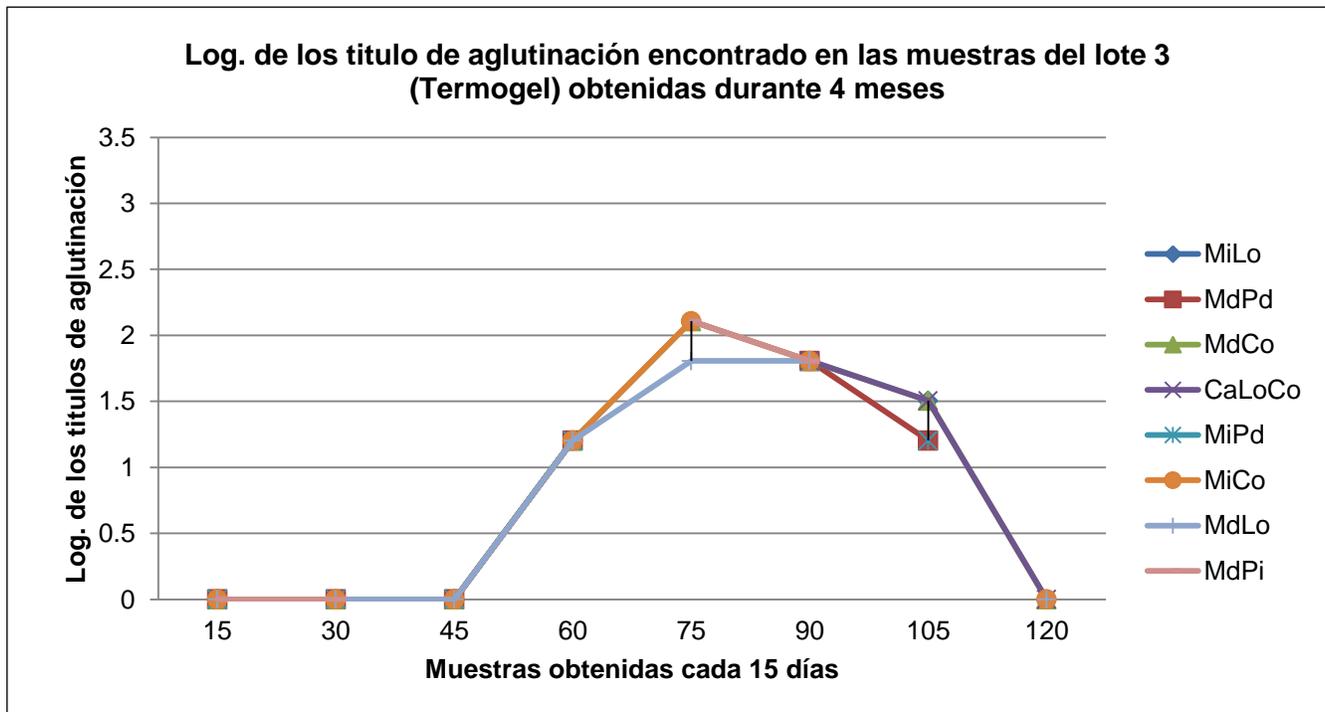
Con este conjunto de características es posible que el termogel al ser infiltrado por macrófagos y neutrófilos como lo revela la histología y junto con la degradación enzimática de éste, se genera una respuesta inmune contra el termogel y el desarrollo de anticuerpos contra éste.

Tabla 12.- Resultados obtenidos del lote 3 (Termogel) al finalizar el proyecto

Tiempo	Log. de los titulo de aglutinación encontrado en las muestras obtenidas durante 4 meses							
	15	30	45	60	75	90	105	120
MiLo	0	0	0	1.20412			1.50515	
MdPd	0	0	0	1.20412		1.80618	1.20412	
MdCo	0	0	0	1.20412	2.10721	1.80618	1.50515	0
CaLoCo	0	0	0	1.20412		1.80618	1.50515	0
MiPd	0	0	0	1.20412			1.20412	
MiCo	0	0	0	1.20412	2.10721	1.80618		0
MdLo	0	0	0	1.20412	1.80618	1.80618		0
MdPi	0	0			2.10721	1.80618		

Nota: En ocasiones no fue posible obtener muestras de algunos animales.

Gráfico 3.- Resultados obtenidos del lote 3 (Termogel) al finalizar el proyecto



Otro aspecto a considerarse es que, ya que el antígeno utilizado (*B. bronchiseptica*) como antígeno completo es una célula y por tanto se compone de múltiples moléculas que pueden actuar como un antígeno capaz de generar una respuesta inmune contra cada uno y generar un conjunto igual de anticuerpos.

Se sabe que las bacterias *Bordetella spp.* poseen un gran número de antígenos tan solo en su superficie, principalmente antígenos de tipo H ubicados como componentes esenciales de cilios y flagelos¹⁶.

Conociendo estos detalles, se considera que la aglutinación observada con células antigénicas (*B. bronchiseptica*) y suero de animales en tratamiento sin este antígeno, es consecuencia de un fenómeno inmunológico conocido como “Reactividad cruzada” donde un anticuerpo generado para un antígeno es capaz de reacciona con otro antígeno similar. Por ello se considera que un antígeno presente en las células de *B. bronchiseptica* posee características similares a las del quitosán permitiendo así completar la reacción antígeno anticuerpo a pesar de no haber sido expuestos estos animales al antígeno utilizado en los otros tratamientos²⁵.

3.13. Tratamiento del lote 4 (Termogel + Suspensión bacteriana)

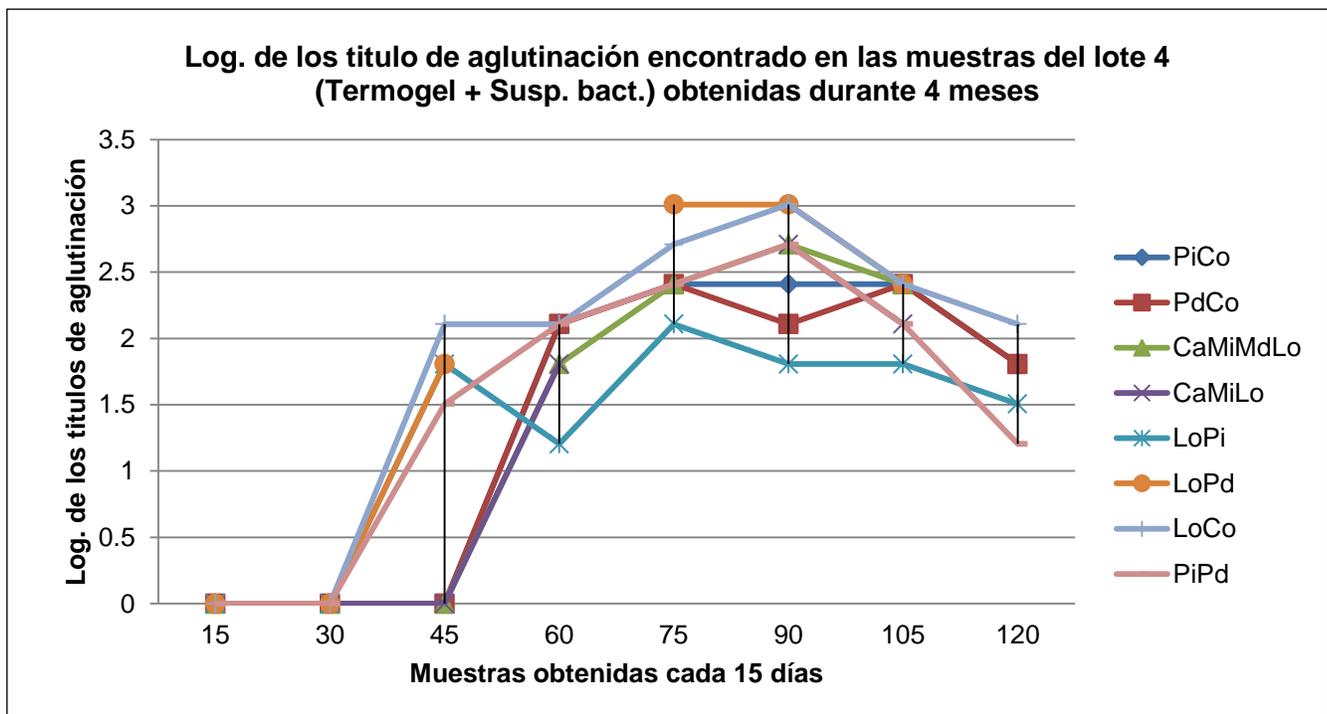
Como la hipótesis indico el termogel como adyuvante de liberación lenta fue capaz de liberar el antígeno en el organismo además de mostrar la mayor cantidad de anticuerpos a comparación de los otros tratamientos evidenciando claramente el efecto potenciador del termogel al focalizar la respuesta inmune en la zona de administración y si bien no se pudo continuar el proyecto, la tendencia de la gráfica indica que este tratamiento hubiera disminuido el título de anticuerpos hasta por lo menos un mes antes de desaparecer después de la última muestra obtenida sugiriendo que el efecto de liberación lenta del termogel por degradación es real.

Tabla 13.- Resultados obtenidos del lote 4 (Termogel + Susp. bact.) al finalizar el proyecto

Animales	Log. de los titulo de aglutinación encontrado en las muestras obtenidas durante 4 meses							
	15	30	45	60	75	90	105	120
PiCo	0	0	0	2.10721	2.40824	2.40824	2.40824	1.80618
PdCo	0	0	0	2.10721	2.40824	2.10721	2.40824	1.80618
CaMiMdLo	0	0	0	1.80618	2.40824	2.70927	2.40824	
CaMiLo	0	0	0	1.80618		2.70927	2.10721	
LoPi	0	0	1.80618	1.20412	2.10721	1.80618	1.80618	1.50515
LoPd	0	0	1.80618		3.0103	3.0103	2.40824	
LoCo	0	0	2.10721	2.10721	2.70927	3.0103	2.40824	2.10721
PiPd	0	0	1.50515	2.10721	2.40824	2.70927	2.10721	1.20412

Nota: En ocasiones no fue posible obtener muestras de algunos animales.

Gráfico 4.- Resultados obtenidos del lote 4 (Termogel + Susp. bact.) al finalizar el proyecto



Como se muestra en el gráfico 4 solo la mitad de los animales comenzó a mostrar un aumento en el título de anticuerpos a partir de la segunda muestra y la otra mitad de ellos 15 días después posiblemente a causa de que la degradación del termogel en unos animales requirió más tiempo que en otros.

Como se mencionó previamente el termogel posee características porosas permitiendo así ser infiltrado por células inmunitarias y brindando un soporte donde tomar el antígeno liberado de forma constante, lo que facilita el proceso de inmunización, lo que aunado a la degradación enzimática del termogel se conjunta con procesos tales como el hinchamiento la difusión y la erosión del polímero. Dichos procesos indican que el termogel al entrar en contacto con fluidos fisiológicos en el medio, este se verá rápidamente infiltrado aplicando fuerza sobre las cadenas del polímero creando espacios que brindaran mayor movilidad al antígeno permitiéndole así pasar a través de las cadenas poliméricas hasta el exterior. El proceso de erosión implica que la exposición del polímero al medio causara el desprendimiento de monómeros de la superficie liberando cada vez un poco del antígeno ⁴⁵.

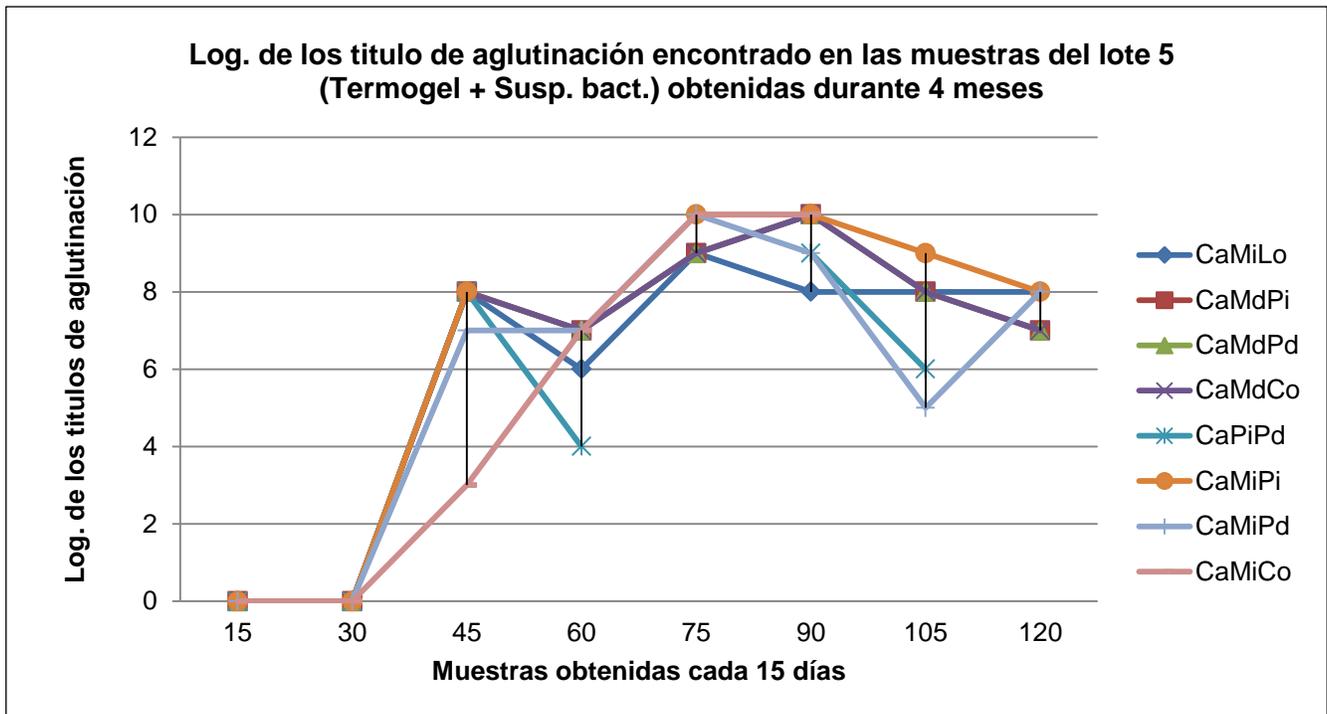
3.14. Tratamiento del lote 5 (Gel aluminio + Suspensión bacteriana)

Los resultados que mostro este tratamiento comparativo con el tratamiento 4 fueron similares aunque su punto máximo solo se mantuvo durante una de las tomas de muestra y después comenzó a disminuir mientras el tratamiento 4 permanecía con títulos por encima de este.

Tabla 14.- Resultados obtenidos del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bact.) al finalizar el proyecto

Animales	Log. de los titulo de aglutinación encontrado en las muestras obtenidas durante 4 meses							
	15	30	45	60	75	90	105	120
CaMiLo	0	0	2.10721	1.50515	2.40824	2.10721	2.10721	2.10721
CaMdPi	0	0	2.10721	1.80618	2.40824	2.70927	2.10721	1.80618
CaMdPd	0	0	2.10721	1.80618	2.40824	2.70927	2.10721	1.80618
CaMdCo	0	0	2.10721	1.80618	2.40824	2.70927	2.10721	1.80618
CaPiPd	0	0	2.10721	0.90309		2.40824	1.50515	
CaMiPi	0	0	2.10721		2.70927	2.70927	2.40824	2.10721
CaMiPd	0	0	1.80618	1.80618	2.70927	2.40824	1.20412	2.10721
CaMiCo	0	0	0.60206	1.80618	2.70927	2.70927		

Gráfico 5.- Resultados obtenidos del lote 5 (Gel aluminio + Susp. bact.) al finalizar el proyecto



Como lo muestra el grafico 5 este tratamiento muestra un incremento de anticuerpos en todos los animales a un mes después de la administración ya que la consistencia liquida del gel de aluminio le permite desplazarse fácilmente en el tejido subcutáneo abarcando un área mayor y exponiendo mayor cantidad de antígeno sin requerir ser liberado lentamente por degradación. Además esta exposición rápida y descontrolada parece causar una variación en el incremento del título de anticuerpos mostrando un gráfico de tendencia irregular con incrementos y disminuciones constantes.

3.15. Comparacion de los tratamientos

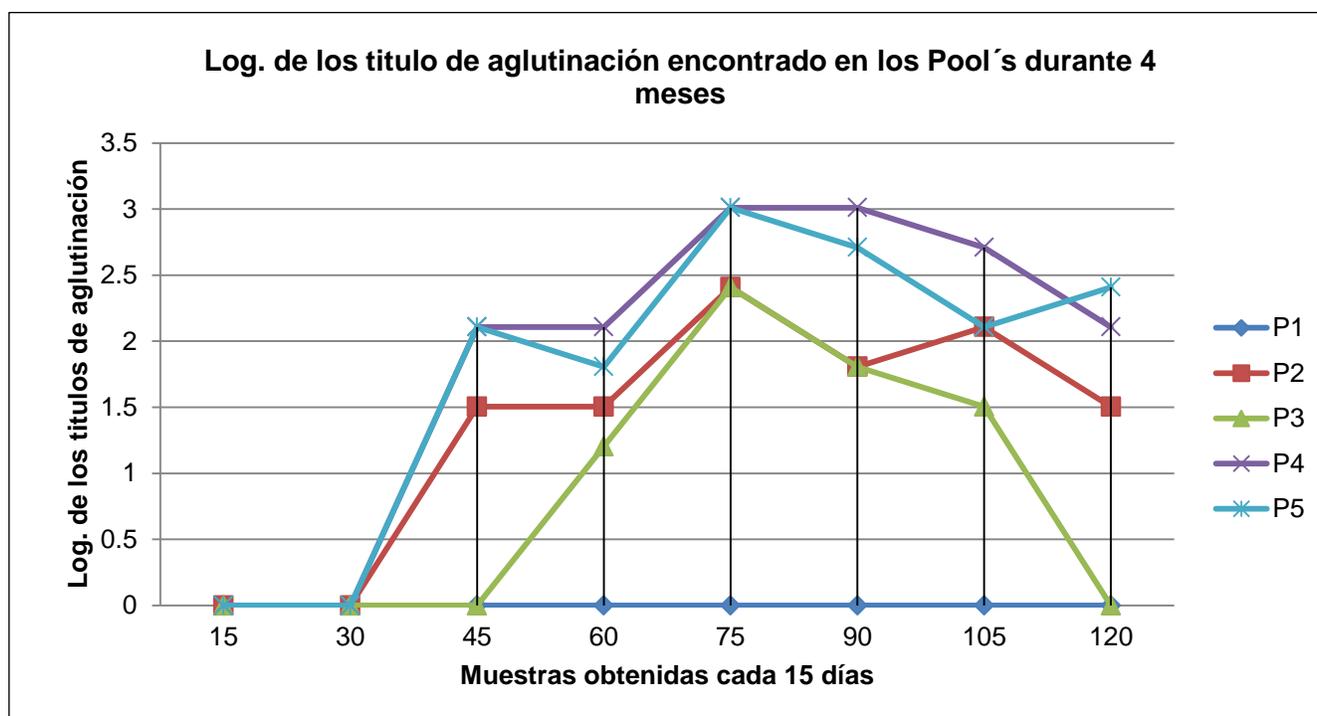
Con la finalidad de manejar un panorama más general de cada tratamiento y facilitar la comparación de los mismos, se procedió a tomar 10µl de suero de cada animal de cada tratamiento y de la misma fecha para formar un Pool (mezcla de suero). Y proceder de forma normal con la técnica de micro aglutinación.

La formación de estos Pool's nos brinda un promedio experimental y no matemático ya que esto es el resultado del comportamiento y concentraciones de cada muestra y no solo de la suma de los resultados ya obtenidos.

Tabla 15.- Resultados obtenidos de los pool's al finalizar el proyecto

No. Pool	Log. de los titulo de aglutinación encontrado en las muestras obtenidas durante 4 meses							
	15	30	45	60	75	90	105	120
P1	0	0	0	0	0	0	0	0
P2	0	0	1.50515	1.50515	2.40824	1.80618	2.10721	1.50515
P3	0	0	0	1.20412	2.40824	1.80618	1.50515	0
P4	0	0	2.10721	2.10721	3.0103	3.0103	2.70927	2.10721
P5	0	0	2.10721	1.80618	3.0103	2.70927	2.10721	2.40824

Gráfico 6.- Resultados obtenidos de los pool's al finalizar el proyecto



El grafico 6 muestra que los tratamientos que involucraron al antígeno fueron los primeros en mostrar un aumento del título de anticuerpos (1 mes), pero en niveles y condiciones diferentes, donde el tratamiento 2 (suspensión bacteriana) fue considerablemente menor a los tratamientos que incluyeron adyuvantes (4 y 5) que potenciaron la inmunización. Ahora como podemos observar en estos tratamientos su comportamiento es similar pero con tendencias y concentraciones de anticuerpos distintas, sin olvidar que el primer punto expresado del tratamiento 4 solo representa a los 4 animales que si mostraron los efectos de la inmunización. Aun así la tendencia más constante y los títulos del tratamiento 4 muestran al termogel como un buen potenciador de la respuesta inmune y con una clara capacidad liberadora de antígenos completos (*B. bronchiseptica*).

La utilidad de tener a los tratamiento 2 y 3 fue poder comparar los factores independientes a evaluar (antígeno-termogel) como adyuvante ya que podemos observar como el antígeno administrado directamente no es capaz de elevar los títulos de anticuerpos tanto, como lo haría junto con un adyuvante. Ahora como ya se mencionó en la discusión del tratamiento 3 (tema:3.12.) no se esperó que el termogel sería capaz de inducir una respuesta inmune, sin embargo se presentó de forma menor y corta que contra el antígeno solo ya que al ser rápidamente infiltrado por células inmunitarias (monocitos y macrófagos) interactúan con el quitosán reconociéndolo como PAMP's y permitiéndole reaccionar con los anticuerpos generados contra *B. bronchiseptica* en una reactividad cruzada, pero indicando que el termogel por si solo es capaz de favorecer la respuesta inmune atrayendo células inmunitarias.

4. ANALISIS GENERAL DEL PROYECTO

Desde el comienzo se contemplaron factores como, que concentración debía tener la suspensión bacteriana para poder elevar lo suficiente los anticuerpos y como evidenciarlo de forma sencilla (micro aglutinación en placa) que nos indicara que el termogel era capaz de liberar un antígeno tan grande como una célula (*B. bronchiseptica*) y llegando finalmente a utilizarse una concentración de 5×10^{10} UFC/ml. Aunado a esto otro factor a considerar fue la concentración que tendría el termogel ya que de ello depende la viscosidad de este alterando la forma de administrarlo, la facilidad con la que será degradado y que tan fácil expondrá el antígeno, por lo que se decidió utilizar un termogel al 2% de quitosan y que claramente ocasiono el principal problema en la experimentación lesionando a los animales y deteniendo el proyecto.

Sin embargo los resultados obtenidos mostraron ser de utilidad debido a que el termogel mezclado junto con la suspensión bacteriana son capaces de elevar considerablemente el título de anticuerpos y de comportarse similar al gel de aluminio. Siendo un precedente para futuros proyectos.

Considerando las dificultades presentes durante la experimentación es probable que haciendo modificaciones se disminuyan los principales problemas que detuvieron el proyecto.

Dentro estos factores podemos encontrar, el número de animales que pude incrementarse a 10 por lote permitiendo un mayor número de muestras y por tanto siendo más representativo del comportamiento de cada tratamiento además de asegurar un mayor número de muestras en caso de que no sea posible la recolección de una o más muestras; relacionado a esto para evitar lesiones en la cola de los animales, se deberá espaciar más los tiempos de las tomas por lo menos a cada 20 días.

Con el uso de un antígeno más sencillo (albumina) se puede evitar la reactividad cruzada y la determinación de anticuerpos brindara facilidad y sensibilidad.

“El proyecto pretendía determinar la capacidad del termogel para liberar un antígeno completo”

El uso de un termogel deberá ser de menor concentración para evitar lesiones lo que probablemente también facilitara su degradación y exposición del antígeno.

5. CONCLUSIONES

Mediante el tratamiento de quitosán y su dilución en un buffer de acetatos se logró formar un termogel líquido de fácil administración que solidifica a temperatura corporal, capaz de contener un antígeno inactivo (*B. bronchiseptica*) dentro de un organismo vivo (Ratas Wistar) y potenciar la respuesta inmune atrayendo células inmunitarias al área de administración donde se suministra el antígeno de forma constante por degradación, desencadenando una respuesta inmune y produciendo anticuerpos detectables por el método de microaglutinación.

Se demostró que el termogel posee alta capacidad para elevar el nivel de anticuerpos, incluso de forma mayor que un adyuvante conocido, sin embargo las lesiones causadas por este en los animales muestran un impedimento en el uso del termogel como un adyuvante eficaz.

Bibliografía

1. A, C. (2000). Novel injectable neutral solution of chitosan form biodegradable gel in situ. *Biomaterial*, 21, 2155-2161.
2. A, G. R. (1980). Biology of *Bordetella Bronchiseptica*. *Microbiol*, 722-738.
3. A, T. N. (2011). Improved immune responses in mice using the novel chitosan adjuvant Viscogel with a *Haemophilus influenzae* type b glycoconjugate vaccine. *Vaccine*, 8965-8973.
4. B, K. (2011). Chitin modulates innate immune responses of keratinocytes. *PLoS One*, 1348-1355.
5. C, A. A. (1991). Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular immunology*, 84, 279-284.
6. C, A. J. (2000). Adyuvantes vacunales: Estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología aplicada*, 17, 147-160.
7. C, A. J. (2007). Vaccine adjuvants revised. *Vaccine*, 3752-3762.
8. C, D. S. (2008). TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. *J Immunol*, 4279-4286.
9. C, E. S. (2007). Producción y evaluación serológica de una bacterina contra la leptospirosis bovina. *MVZ*, 12, 967-977.
10. C, J. T. (2008). *Manual de Vacunas*. Caracas: Arte S.A. de C.V.
11. C, M. J. (1994). *Efectos de la inmunización activa o pasiva sobre la replicación de Bordetella b. en el pulmón de ratón*. México: FESC-C1.
12. Caprile, M. (2010). *Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos*. Asociación para el estudio de los residuos sólidos. Buenos Aires: ISWA.
13. Eva, D. P. (2002). *Desarrollo y caracterización de Hidrogeles poliméricos con aplicación en la liberación controlada de fármacos*. Madrid: Facultad de farmacia.
14. F.J., L. (2007). *Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueletos de camarón*. México: Universidad Rafael Ladívar.
15. Federal, G. (2008). *Manual de vacunación 2008-2009* (20° ed.). México: Dependencia del Gobierno del D.F.
16. G, A. C. (2007). *Pruebas de aglutinación lenta en tubo y 2-Mercaptoetanol con suero de cerdos vacunados contra *Actinobacillus pleuropneumoniae**. México: FESC-C1.
17. G, R. A. (2009). *Fundamentos de Hematología* (4° ed.). Buenos Aires: Panamericana.

18. I, M. J. (2002). Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants. *Vaccine*, 9(11), 908-914.
19. J, K. J. (1997). Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes Nature Biotechnology. *Vaccines*, 641-646.
20. K, G. R. (2011). Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. *Pharm Biotechnol*, 6, 229-248.
21. K, G. R. (2011). Adjuvants properties of aluminium and calcium compounds. *Pharm Biotechnol*, 6, 229-248.
22. K, S. A. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects. *JPP*, 1047-1067.
23. L, J. M. (2008). *Prevencion y tratamiento de ulceras y escaras*. Madrid: Vertice.
24. Li, X. (2013). Chitin, Chitosan and Glycated Chitosan Regulate Immune Responses: The Novel Adjuvants for Cancer Vaccine. *Clinical and Developmental Immunology*, 2-3.
25. M, V. V. (2006). *Ciencia y tecnologia de polimeros* (4° ed.). Valencia: UPV.
26. M., R. I. (2006). *Inmunologia Fundamentos* (11° ed.). Argentina: Panamericana.
27. M.P., M. (Junio de 2011). Actualizacion en vacunas teorias, realidades y mitos. *SEMERGEN-MEDICINA FAMILIAR*, 38(4), 226-232.
28. Michael. (2007). *Introduccion a la bioetica*. Bogota: Giuffre.
29. P, O. (2000). *Los adyubantes. simples adyubantes o secretos e imprescindibles agentes vacunales*. Bogota: Instituto Finlay.
30. Patric, F. (2003). *Dermatologia en medicina general*. Madrid: Panamericana.
31. Patricia, M. S. (2000). *Proceso para la extraccion de quitina a partir de crustaceos y su conversion a quitosan*. Mexico: Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
32. Q, A. B. (2008). *Adyubantes vacunales*. Madrid: Asociacion española de pediatria.
33. R, I. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*, 15, 1326-1331.
34. R, R. J. (1997). *Inmunologia Biologia y Patologia del Sistema Inmune* (2° ed.). Madrid: Panamericana.
35. R, V. (2011). *Manual de toma de muestra de laboratorio clinico*. Mexico: Ministerio de Salud.
36. R, V. F. (2008). Modulation of the immune response to vaccine antigens. *Dev Biol Stand*, 241-248.

37. Saña, M. B. (2011). *La experimentacion animal*. Barcelona: Univercidad Autonoma de Barcelona.
38. Susana, F. G. (1994). *La inmunologia en el diagnostico clinico* (5° ed.). Bogota: CEJA.
39. U, M. A. (2013). *Recomendaciones nacionales de vacunacion argentina*. Argentina: Pronacel.
40. V, W. R. (2986). Uveitis introduction in the rabbit by muramyl dipeptides. *Infect Immunol*, 51, 816-825.
41. Z, C. E. (1995). *Patologi especial y diagnostico de las enfermedades de los animales domesticos*. Mexicali: Univercidad Autonoma de Baja California.
42. H, J. M. (1999). Adyuvantes inmunológicos. Cuba: Centro de Investigación Solar. p.p. 130-137.
43. Q, X. J. (2010). Biocompatibility of a chitosan-based injectable thermosensitive hydrogel and its effects on dog periodontal tissue regeneration. Oingdao university.p.p.1153-1160
44. E.A. (2011). Vacunas generalidades.Paraguay. Ministerio de salud pública y bienestar social.
45. P.A.S. (2008). Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosa. *Cienc. Quim. Farm. Colombia*. p.p. 105-121.