

10524
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



Departamento de Exámenes Profesionales

“ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DE
EXTRACTOS DE MEMBRANA DE *Mycoplasma
capricolum*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

BEATRIZ EUGENIA AGUILAR RAMIREZ

ASESORES: DR. ANDRES ROMERO ROJAS
Q.F.B. CARLOS PONCE HERNANDEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

A
2003



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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AVENIDA DE
 MEXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio de la capacidad adyuvante de extractos de membrana
 de *Mycoplasma capricolum*".

que presenta la pasante: Beatriz Eugenia Aguilar Ramírez
 con número de cuenta: 9555562-4 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

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 ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 6 de Enero de 2003

PRESIDENTE

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL

M.en C. Luisa Martínez Aguilar

SECRETARIO

Dr. Andrés Romero Rojas

PRIMER SUPLENTE

O.F.B. Martha P. Zuñiga Cruz

SEGUNDO SUPLENTE

Dr. Victor M. Zendejas Buitrón

B

AGRADECIMIENTO A DIOS

Dios tú, que me examinas y conoces; sabes cuándo me siento y cuando me levanto, tú conoces de lejos lo que pienso; tú sabes si camino o si me acuesto y tú conoces bien todos mis pasos. Aún no está en mi lengua la palabra cuando ya tu Señor, la conoces entera. Tú ciencia es un misterio para mí, tan grande que no puedo comprenderla.

¿A dónde podré ir lejos de tu presencia? Si subo a las alturas, allí estás, si bajo a los abismos allí también estás.

Por eso te doy gracias por tantas maravillas que has hecho conmigo, en efecto admirables son tus obras y mi alma bien lo sabe, por este momento de mi vida que solo tú has permitido.

Pues tú, Señor formaste mis entrañas, me tejiste en el seno de mi madre.

Tus ojos ya veían mis acciones y ya estaban escritas en tu libro, los días de mi vida estaban ya trazados antes que yo naciera.

¿Cuán difíciles son tus pensamientos y su suma es oh Dios, incalculable?.

Te doy gracias Dios, por mis padres porque por medio de ellos me lo diste todo, devuélveles todo el bien que me han hecho.

A MIS PADRES:

Les agradezco que me hayan heredado el tesoro más valioso que pueda dársele a un hijo: Amor, que sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, que la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho.

Hemos llegado a la meta los tres si los tres porque gracias a ustedes he logrado mi más grande anhelo, a quienes nunca podré pagar sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo por esto y más GRACIAS.

A MI TÍA CARMEN, TÍO OSCAR, TÍO CARLOS, TÍA CRISTI, TÍA CLARITA + :

Tíos yo se que ustedes en donde quiera que estén van a estar muy felices, les agradezco que siempre me hayan dado ánimos para seguir adelante.

A MI TÍO JESÚS RAMÍREZ + :

Gracias tío por que desde chica me impulso y me dio el ejemplo de salir adelante en todo lo que emprendiera.

A MI TÍO ARTURO:

Gracias tío por siempre darme ánimos a seguir adelante.

A CHUY, CLARITA, SARITA, ROGELIO, ANITA, CARMEN, JESÚS, ELOY, BETO, CRISTI, CARLITOS, KARLA, JUSTO:

Gracias primos por darme su cariño, ejemplo y apoyo.

A FABIOLA, ALMA, ROCIO, MINE:

A ustedes mis amigas por haberme brindado su amistad y que en todo momento estuvieron conmigo.

A MIS ASESORES DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS Y QFB CARLOS PONCE:

Les agradezco la paciencia, dedicación y conocimientos que me transmitieron para la realización de este trabajo.

A MIS SINODALES:

Les agradezco el tiempo que emplearon para la revisión de este trabajo.

A MIS PROFESORES:

Quienes me formaron intelectualmente y me ayudaron a constituirme como profesional.

Oración del QFB

En los campos de observación,
universidades, laboratorios,
con un microscopio o computadora
trabajamos en el misterio de la vida.
Avanzamos de sorpresa en sorpresa
inmersos en los infinitos enlaces
de un universo que nos abraza.

Lo que descubrimos hoy, allí ha estado desde siempre,
y lo que nos falta por saber es abrumador.

Concédenos, Dueño de la vida,
respeto profundo por todas las manifestaciones de la vida,
un sentido sagrado por la armonía de lo creado,
que en todos nuestros acercamientos a tu misterio,
procedamos decididos a cooperar
al bien de toda la humanidad.

(Anónimo)

F

No estudies para ti mismo
No estudies para tu exclusivo progreso.
No estudies para tu prestigio personal,
ni para tu bienestar económico.
Aprende, conoce,
critica, investiga y piensa,
para que los que tanto sufren hoy
no prolonguen por más tiempo su dolor,
para los que no tienen hogar
puedan vivir en una casa digna
para los que están sin trabajo
tengan cómo sustentar a su familia,
para que tanta lágrima derramada
pueda encontrar sensibilidad para el consuelo,
para que tantos que piden justicia
puedan ser escuchados en sus derechos,
para que los que necesitan la verdad en la noticia
puedan informarse libremente,
y para que aquellos que buscan a Dios
puedan encontrarlo y dialogar con El.

¿Tiene sentido tu estudio?
¿Vale la pena tu rutina y tu sacrificio?
Sí, siempre que no estudies para ti mismo.
Sí, siempre que estudies para los demás.

(Miguel Ortega)

**"No descuides un solo instante; todos son infinitamente preciosos
para tejer sin agujeros la tela de tu vida"**

Creo en una juventud
comprometida en el mundo de hoy;
capaz de tomar el relevo de los
mayores,
sin prisas ni atropellos,
en paz y amistad.

Creo en una juventud
que siente los problemas de los
hombres
y no se cruza de brazos
ante la injusticia y la opresión.

Creo en una juventud
que aborrece de su vocabulario
el verbo destruir;
y no tiene como norma de actuación
la violencia.

Creo en una juventud
que, sobre todo y a pesar de todo,
no pierde sus ilusiones
y espera y lucha por un ideal.

Creo en una juventud
sincera y abierta a la generosidad;
con defectos y derrotas;
con deseos siempre de más.

Creo en una juventud
con fuerzas espirituales suficientes
para salvar a nuestro mundo de los
peligros
de deshumanización, cansancio,
indiferencia,...
que le acechan.

Creo en una juventud
con valores trascendentales
en sus categorías intelectuales.

Creo en una juventud
que no desprecia el ayer,
pero que ama su hoy con pasión
y se preocupa de edificar
un mañana más digno y humano.

Creo en una juventud
que construirá un mundo mejor
en nuestro planeta, la Tierra,
y logrará abrir el misterio
de otros mundos siderales
con el tesón de su ciencia
y el empeño en su empresa.

Creo en una juventud
que busca con afán
"el camino, la verdad y la vida".

Si no puedes ser pino en la cima de la colina,
sé maleza en el valle.....pero sé la maleza mejor del torrente,
sé arbusto, si no puedes ser árbol.
Si no puedes ser camino real, sé un sendero
Si no puedes ser sol, sé estrella.
No vencerás por el volumen
sino por ser el mejor de lo que sea.

(De Mallock)

Jugando al partido de la vida

En este mundo, Señor, cada uno de nosotros tiene un sitio;
Tú entrenador providente, nos lo marcaste desde la eternidad.
Porque tu tienes necesidad de nosotros aquí;
nuestros hermanos tienen necesidad de nosotros
y nosotros tenemos necesidad de todos.

Lo importante no es el puesto que ocupo
sino la perfección y profundidad de mi presencia.
¿qué importa que yo sea defensa o delantero,
si soy al máximo lo que debo ser?

Ahora vuelvo a descansar.
Mañana, si Tú me seleccionas, yo volveré a jugar, y así cada día.

Haz que este partido, celebrado con todos mis hermanos,
sea la solemne liturgia, que tú esperas de nosotros, a fin de que cuando tú silbes,
al final de nuestras vidas, seamos seleccionados para la copa del cielo.

(Michel Quoist)

I. RESUMEN

Existen diversas sustancias que pueden aumentar significativamente la inmunogenicidad de algunos antígenos. Estas sustancias se denominan adyuvantes y la mayoría de ellas todavía se utilizan con fines experimentales exclusivamente, ya que su administración implica ciertos riesgos, particularmente la producción de reacciones de hipersensibilidad o la inducción de fenómenos de autoinmunidad.

En la actualidad la búsqueda de nuevos adyuvantes constituye una de las tendencias más importantes en la investigación inmunológica actual.

A nivel internacional, la lista de productos naturales y derivados de la síntesis química, con propiedades adyuvantes, es cada vez mayor, sin embargo sólo un número reducido se utiliza en la formulación de vacunas veterinarias y humanas, existiendo una tendencia relacionada con la valoración de nuevas sustancias con esta finalidad, para lo cual en el presente trabajo se estudia el efecto adyuvante de las membranas del *Mycoplasma capricolum* completo inactivado y de algunas de sus fracciones, demostrando que una de estas fracciones tiene esa capacidad adyuvante, para lo cual se tomaron en cuenta ciertos criterios de evaluación como son la determinación de anticuerpos contra albúmina sérica bovina por el método de ELISA.

II.INDICE

Página

RESUMEN.....	I
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Características del adyuvante ideal.....	4
1.3. Ventajas del uso de adyuvantes en las vacunas.....	5
1.4. Desventajas del uso de adyuvantes.....	5
1.5. Mecanismo de acción de los adyuvantes.....	6
1.6. Clasificación de Adyuvantes.....	8
1.7. Los Micoplasmas.....	21
1.8. Evaluación de la efectividad de un adyuvante.....	27
1.9. Actualidad en la evaluación.....	28
2. JUSTIFICACIÓN.....	30
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
6. RESULTADOS.....	40
7. DISCUSIÓN.....	47
8. CONCLUSIONES.....	55
9. BIBLIOGRAFÍA.....	56
10. APÉNDICE.....	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Lista de adyuvantes según su eficiencia y seguridad.....	19
Tabla 2	Valores de absorbancia obtenidos para preparar la curva patrón utilizando la técnica de Bradford.....	41
Tabla 3	Valores en peso obtenidos de las fracciones de las membranas de <i>Mycoplasma capricolum</i> después de liofilizarlos.....	42
Tabla 4	Cuadro que muestra valores de absorbancia obtenidos al titular los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inoculados con 100 µg/ml de la FRACCION I y sacrificados a los 5 días después de la inoculación.....	44
Tabla 5	Cuadro que muestra los títulos de anticuerpos anti-albúmina sérica bovina que fueron producidos por la inoculación de esta proteína mezclada con las diferentes fracciones y otros componentes bacterianos.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía al microscopio electrónico de partículas de ISCOM.....	12
Figura 2. Estructura química de las saponinas.....	16
Figura 3. Fotografía en microscopio óptico de <i>Mycoplasma capricolum</i> con 5 días de crecimiento.....	23
Figura 4 Diagrama que representa la secuencia de pasos realizados para la obtención de membranas de <i>Mycoplasma capricolum</i>	34
Figura 5 Diagrama que muestra el procedimiento seguido para el fraccionamiento de las membranas de <i>Mycoplasma capricolum</i>	36
Figura 6 Curva Patrón de proteína utilizando albúmina sérica bovina como proteína estándar.....	40
Figura 7 Gráfica que representa los valores de absorbancia obtenidos al titular los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inoculados con 100 µg/ml de las FRACCION I y sacrificados a los 5 días después de la inoculación.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

CD28: receptor de la célula T para moléculas B7

col: colaboradores

CRL 1005: bloque de copolímeros P1205

CWS: esqueleto de la pared celular

DDA: dimetil 1 dioctadecil amonio

FCA: adyuvante completo de Freund

IFN: Interferón

IL: Interleucina

ISCOM: Complejo inmunoestimulante

LPS: lipopolisacárido

MDP: muramil dipéptido.

mg: miligramos

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

ml: mililitros

μl: microlitros

μm: micrómetros

μg: microgramos

NBP: copolímeros no iónicos en bloque

nm: nanómetro

PM: peso molecular

poe: polioxi-etileno

pop: polioxi-propileno

PPLO: organismos parecidos a la pleuroneumonía

QS-21: Quillaja saponaria Molina

rpm: revoluciones por minuto.

SSF: solución salina fisiológica

TCR: receptor de células T

VSC: vesículas secas reconstituidas

ATCC: American type culture collection

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES.

El descubrimiento de las sustancias adyuvantes fue realizado por Gastón Ramón (considerado el padre de los adyuvantes por sistematizar los trabajos iniciales de Lemoinc y Pinoy quienes en 1916 aumentaron la respuesta de anticuerpos al unir *Salmonella typhimurium* en aceite mineral)⁽¹⁶⁾, en 1925 Ramón en sus estudios sobre las antitoxinas diftérica y tetánica, demostró que sí las vacunas se mezclaban con diferentes sustancias, como sales, agar, tapioca, lecitina, aceite de almidón o bacterias piógenas, se obtenía una mejor respuesta de anticuerpos antitoxinas diftérica y tetánica⁽¹⁾. En 1926, Glenn y col., introduce la alúmina de potasio para incrementar la respuesta a la antitoxina diftérica, la cual desencadenó el estudio y uso de otras alúminas siendo las únicas autorizadas para uso en humanos por mucho tiempo⁽¹⁷⁾.

Por otra parte, la inoculación de bacilos de la tuberculosis inducen hipersensibilidad retardada (HR) y poca respuesta de anticuerpos y la aplicación de la proteína purificada, estimulan altos títulos de anticuerpos y no HR. Estos hallazgos coinciden con los de Dienes en 1936, quien encuentra que la aplicación de una proteína en un foco tuberculoso induce HR contra la proteína. En 1942 Freund, teniendo en cuenta estos resultados, crea sus adyuvantes completo e incompleto, con los cuales induce anticuerpos con HR y anticuerpos sin HR respectivamente⁽¹⁾.

La búsqueda de nuevas sustancias con actividad adyuvante constituye una de las tendencias más importantes en nuestra era, la investigación inmunológica actual esta enfocada en gran parte, a la investigación de principios activos, el empleo de sustancias biodegradables y sobre todo la utilización de nuevas formulaciones sencillas o complejas que tengan esa actividad⁽³⁾.

Los avances experimentales, en la última década han estado relacionados con la síntesis de péptidos, sin embargo, la utilización exitosa de estas nuevas tecnologías requieren de la realización de un mayor esfuerzo para descubrir o producir nuevas sustancias (adyuvantes), que sean eficaces en la estimulación de la respuesta inmunitaria y desprovistas de propiedades biológicas adversas, ya que su administración implica ciertos riesgos, particularmente la producción de reacciones de hipersensibilidad o la inducción de fenómenos de autoinmunidad⁽²⁾.

Para entender el concepto de adyuvante, tenemos que saber, primero para que sirve una vacuna y así comprender mejor el concepto de adyuvanticidad⁽³⁷⁾. La vacunación es la inducción y producción de una respuesta inmunitaria específica protectora (anticuerpos y/o inmunidad mediada por células), por parte de un individuo sano susceptible, como consecuencia de la administración de un producto biológico, la vacuna, que puede estar constituida por un microorganismo, una parte de él, o un producto derivado del mismo (inmunogénos), tiene como objeto producir una respuesta similar a la de la infección natural, pero sin peligro para el vacunado.

Se basa en la respuesta del sistema inmunitario a cualquier elemento extraño (antígeno) y en la memoria inmunológica ⁽⁴⁾.

Al necesitarse una alta inducción y producción de respuesta inmunitaria para tener el mayor tiempo posible de protección, se tienen a los adyuvantes, que como su nombre lo dice van a ayudar a que se tenga una mayor e intensa protección.

El término **adyuvante**: proviene del latín *adjuvans* = ayudar y se refiere a toda sustancia o preparado químico, que incorporado al antígeno (vacuna) o inyectado simultáneamente con él en el mismo lugar, **acelera, eleva, prolonga, potencia o modula** la respuesta inmunológica, favoreciendo la presentación de los antígenos al sistema inmunitario y con esto la realización de una respuesta inmunitaria específica protectora^{(19) (24) (20)}.

1.2. CARACTERÍSTICAS DEL ADYUVANTE IDEAL⁽¹⁷⁾

Para decir que se tiene un adyuvante ideal se deben de cumplir las siguientes características:

1.2.1. Que dé una seguridad esencial, esto es que exista ausencia de reacciones locales y sistémicas, autoinmunidad, hipersensibilidad, carcinogenicidad, teratogenicidad, inflamación crónica, abscesos, entre otros.

1.2.2. Tiene que estar químicamente definido para poder ser producido consistentemente.

1.2.3. Ser eficaz con antígenos débiles, como conjugados para incluir en la formulación antígenos escasos y disminuir dosis.

1.2.4. Que sea efectivo en niños y lactantes dando protección contra enfermedades de la infancia.

1.2.5. Que dé una respuesta intensa y duradera, con una buena respuesta celular y anticuerpos de alta afinidad e isotipo deseado.

1.2.6. Que sean estables en adyuvanticidad y toxicidad, teniendo una larga vida útil.

1.2.7. Que sea biodegradable, dando una liberación lenta y que sea efectivo en menor dosis.

1.2.8. Que sea aplicable por diferentes vías, esto daría pauta para la inducción de una respuesta inmunitaria en diversas zonas incluyendo las mucosas⁽⁴⁸⁾.

1.3. VENTAJAS DEL USO DE ADYUVANTES EN LAS VACUNAS

1.3.1. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos. Además se disminuye el número de inoculaciones. Se puede inducir una respuesta más temprana, más potente y más duradera.

1.3.2. Inmunización eficaz de personas con capacidad inmunitaria disminuida, en neonatos, ancianos y personas inmunodeprimidas⁽¹⁾.

1.4. DESVENTAJAS DEL USO DE ADYUVANTES

1.4.1. La toxicidad de ciertas sustancias.

1.4.2. Adyuvancia limitada frente a determinados antígenos.

1.4.3. La ausencia de patrones antígenicos o algunos sin relevancia biológica.

1.4.4. Características fisicoquímicas del adyuvante.

1.4.5. pH con la eficiente adsorción del inmunógeno.

1.4.6. Modelos animales ausentes para muchas enfermedades.

1.4.7. Diferencias biológicas entre animales y humanos.

1.4.8. Diferencia de respuesta entre varias cepas murinas.

1.4.9. Problemas con ensayos por uso de diferentes unidades.

1.4.10. Falta de controles adecuados.

1.4.11. Ausencia del estudio de la inmunidad celular.

1.4.12. Falta de correlación con pruebas funcionales y de reto⁽¹⁷⁾.

1.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ADYUVANTES.

El mecanismo con el que funcionan los adyuvantes ha sido objeto de numerosos estudios y al parecer existen diversos factores que lo explican:

1.5.1. Efecto de depósito: en el cual el adyuvante mantiene al antígeno atrapado en el sitio de la administración de la vacuna precipitándolo y permitiendo un estímulo inmunológico prolongado con esto el antígeno tiene mayor tamaño, por lo que puede ser fagocitado más fácilmente.

Este efecto es muy importante cuando se utilizan pequeños antígenos solubles que podrían ser eliminados rápidamente, impidiendo una liberación masiva del antígeno, que podría dar lugar a tolerancia inmunitaria y causar una respuesta inflamatoria local que atrae a macrófagos y a otras células ⁽⁴⁾. El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de las funciones importantes del adyuvante es crear un reservorio o depósito del antígeno de larga duración⁽²⁸⁾.

Las sales de aluminio con iones monovalentes de NH_4^+ , Na^+ y K^+ pueden formar compuestos solubles, como los sulfatos o insolubles como los óxidos, los hidróxidos y los fosfatos de aluminio. Los primeros provocan la agregación de las proteínas, mientras que los segundos, insolubles las adsorben y de este modo impiden su difusión. En cualquiera de los casos, la inyección de los antígenos mezclados con sales de aluminio conduce a una mejor exposición de los determinantes antigénicos, los cuales van a ser fagocitados más fácilmente⁽⁷⁾.

1.5.2. Mejoran la presentación del antígeno: esto se da al inducir la formación de granulomas, los cuales son infiltrados celulares con una masa densa y rica en macrófagos, con lo que se mejora el procesamiento y presentación del antígeno, actuando como coestimuladores de los macrófagos aumentando en su superficie el número de moléculas B7, lo que facilita su interacción con el receptor CD28 del linfocito, con ello se da la llamada señal coestimuladora que incrementa la interacción entre el MHC (del macrófago), antígeno procesado y TCR (de la célula T) ⁽⁴⁾.

Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos; éstos cuando son activados promueven la respuesta inmunitaria por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y la eficiencia de su presentación a los linfocitos⁽⁴⁾.

1.5.3. Inducen la secreción de citocinas: provocando una buena liberación de IL-1 de los macrófagos, que activa a los linfocitos, utilizando ciertas citocinas, las cuales tienen la capacidad de favorecer respuestas TH₁ o TH₂⁽²²⁾.

Los adyuvantes han sido clasificados de diferentes maneras, entre las cuales podemos mencionar la de Cox y Couter⁽⁸⁾ :

1.6. CLASIFICACIÓN DE ADYUVANTES.

1.6.1. Particulados:

Son partículas adyuvantes microscópicas. Una de sus características, es que el inmunógeno es incorporado dentro o asociado con la partícula. Entre los adyuvantes particulados se encuentran los siguientes:

1.6.1.1. Sales de aluminio:

Forman un precipitado de gel con hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio. Tienen un tamaño de partícula de 100 a 1000 nm. Mantienen una interacción electrostática con el inmunógeno en el gel preformado o durante la formación del gel *in situ*. Éstas han sido usadas en vacunas humanas y veterinarias desde 1930 y han dado excelentes resultados de seguridad. Inducen una respuesta TH₂ buena y una excelente presentación. Las sales de aluminio son seguras y su fórmula es simple^{(27) (29) (35)}.

1.6.1.2. Emulsión agua/aceite:

Éstas son microgotas de agua, estabilizadas por un surfactante (monoleato) y en una fase oleosa (comúnmente aceite mineral, escualeno). El adyuvante incompleto de Freund, consiste en una solución acuosa con el antígeno, junto con un aceite mineral y un aceite dispersante como el manoleato. Es usado en vacunas humanas y veterinarias, pero es ahora en gran parte desacreditado, debido a la larga incidencia de reactividad y toxicidad en el sitio de inoculación. Estos adyuvantes producen abscesos y efectos locales irritantes. Proveen un buen depósito, liberando lentamente el antígeno, con lo que se logra un estímulo persistente, ejemplo de estos es el Montanide ISA 57⁽⁸⁾ ⁽¹⁸⁾ ⁽³⁸⁾.

1.6.1.3. Emulsión aceite/agua:

Éstas son microgotas de aceite mineral (escualeno), con un tamaño de 200 nm estabilizados por surfactantes como (Tween 80 y/o Span 85) en una fase acuosa, siendo usados en vacunas veterinarias, frecuentemente en asociación con antígenos solubles ejemplo, MDP muramil dipéptido y/o derivados de copolímeros, que dan una excelente presentación del antígeno y pueden ser incorporados en ellos como inmunomoduladores lipofílicos, además de moléculas anfipáticas donde la presentación es importante. El inmunógeno se incorpora en la fase oleosa⁽⁸⁾ ⁽¹⁸⁾.

1.6.1.4. Liposomas:

Son vesículas con un tamaño de 20 nm a 3 μm , compuestos de colesterol y fosfolípidos, como la fosfatidilcolina y el diacetilfosfato, cuya estructura, composición y proporción son prácticamente igual a la membrana de las células del hospedero. Los fosfolípidos tienen una cola hidrófoba y una cabeza hidrófila que al disolverse en agua se autoorganizan de la siguiente manera: las colas hidrófobas se atraen entre sí y las cabezas hidrófilas contactan con el exterior e interior acuoso. De este modo se forman bicapas de lípidos que se cierran formando pequeñas vesículas, similares a las células corporales. Estos liposomas, son pequeños depósitos en los cuales cualquier antígeno que sea liposoluble puede ser incorporado en la membrana y cualquier antígeno que sea hidrosoluble también puede ser llevado al interior. Además se pueden incorporar algunos otros adyuvantes liposolubles en la membrana como lípido A, LPS, o en el interior MDP y citocinas⁽¹⁾. Una de las características es que son fagocitados con avidéz por macrófagos y otras células, lo que los convierte en adyuvantes para muchos antígenos purificados, por ejemplo exopolisacáridos bacterianos o proteínas recombinantes⁽⁶⁾.

Al liofilizar los liposomas las vesículas se rompen, precisamente esta fragmentación se aprovecha para la producción de vesículas secas reconstituidas (VSC); en el proceso de liofilización, el agua congelada se sublima, se transforma directamente en gas sin pasar por el estado líquido, aumentando la concentración de sales y con ello, la presión osmótica rompe a los liposomas. En el sistema VSC, los liposomas se fabrican sin introducir en ellos el antígeno, de modo que éste queda en el exterior, en el momento de la liofilización la membrana de los liposomas se rompe y en la reconstitución con agua los liposomas se vuelven a cerrar, atrapando así el antígeno en su interior^{(8) (32)}.

La gran ventaja de este sistema en la fabricación de vacunas, es que permite emplearlos como vehículo para los antígenos y adyuvantes vacunales y al mismo tiempo permite disponer de un producto liofilizado, de muy fácil conservación y transporte. Utilizando hidróxido de aluminio para resuspender los liposomas minimiza los efectos secundarios en el punto de inoculación^{(8) (32)}.

1.6.1.5. ISCOM (Complejo inmunoestimulante).

Son partículas sólidas, generadas por la mezcla de un antígeno, colesterol, fosfolípidos y saponinas como el Quil-A, únicamente se pueden utilizar con antígenos que puedan mezclarse con lípidos y con el Quil-A, normalmente son proteínas, induce reacciones TH₁, TH₂ y una buena presentación de antígenos, se utiliza en numerosas especies incluyendo primates; (ver figura 1)^{(30) (31) (23)}.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

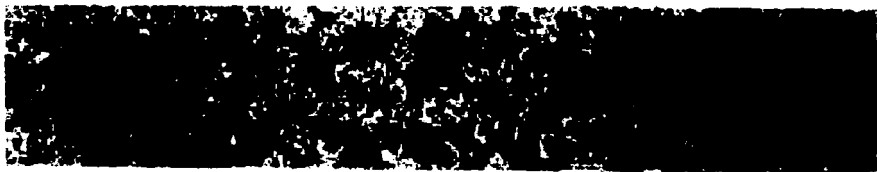


Figura 1: Fotografía al microscopio electrónico de partículas ISCOM

1.6.1.6. Nano y micropartículas:

Éstas son partículas sólidas, pequeñas que van de un rango de 10 a 1,000 nm (nanopartículas) y de 1 a 100 µm (micropartículas), formando un rango de biocompatibilidad y polímeros biodegradables. Éstos pueden actuar como depósitos de largo plazo (semanas y meses) dando una excelente presentación de < 5 µm al día, incorporando adyuvantes inmunomoduladores^{(8) (18)}.

1.6.1.7. Otros:

Sales de calcio: similar a sales de aluminio pero con actividad inmunomoduladora. Aprobado para uso en humanos⁽²³⁾.

Otros adyuvantes desarrollados son: Proteasomas, Virosomas, Tirosina, Gama-inulina y el algamilin^{(8) (36)}.

1.6.2.No particulados:

Son adyuvantes donde su actividad no es dependiente de cualquier naturaleza particulada o multimérica. Éstos son generalmente inmunomoduladores aunque algunos aumentan la actividad de células inmunocompetentes. La mayoría mejora su actividad al asociarse con adyuvantes particulados⁽⁸⁾.

1.6.2.1. Muramil dipéptido:

(MDP) N- acetil muramyl- L- alanyl- D-isoglutamina, es el adyuvante activo componente del peptidoglicano extraído de la *Mycobacteria*.

Los compuestos que han sido reportados como derivados y que son menos tóxicos incluyen al treonil-MDP, la murabutina, la N-acetilglucosamina-MDP (GMDP) la murametida y el nor-MDP. Los derivados lipófilicos incluyen el MTP-PE. El MDP y sus derivados son potentes inductores de IL-1, los derivados hidrófilicos estimulan TH₂, mientras que los derivados lipófilicos estimulan TH₁. Estos son usados en asociación con adyuvantes particulados, especialmente en emulsiones agua/aceite, aceite/agua y liposomas, pero han sido asociados con reacciones adversas en ensayos clínicos^{(28) (8) (46)}.

1.6.2.2. Copolímeros no iónicos en bloque (NBP):

Estos polímeros muestran típicamente una región compuesta de polioxipropileno hidrófobo (pop) rodeada por regiones de polioxietileno (poe). Los pesos moleculares van de un rango de 2,500 a 12,500 daltones, con una composición de poe del 5-20% del total. Son usados como aditivos en la fase oleosa y en emulsiones aceite/agua y agua/aceite. Su primera acción, es la presentación de moléculas anfipáticas, teniendo una actividad inmunomoduladora. Los NBP no son biodegradables y esto implica reactividad en el sitio de inoculación. Se ha encontrado en estudios recientes un NBP de peso molecular elevado, un ejemplo de estos es: CRL 1005⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾ ⁽²⁴⁾.

1.6.2.3. Saponinas:

Éstas son una compleja mezcla de triterpenoides, con peso molecular promedio de 2000 daltons, es un extracto del árbol de *Quillaja saponaria* Molina. La Saponina es un extracto crudo, el Quil A y el Spikoside son parcialmente purificados mientras que el QS21 (Stimulon) y ISCOPREP 703 están definidos como mezclas. Las Saponinas inducen una gran respuesta a TH_1 , TH_2 y una moderada respuesta de células citotóxicas, probablemente siendo las proteínas con la mezcla de micelas de saponinas y proteínas. El Quil-A es un adyuvante extensamente usado en vacunas veterinarias y está siendo propuesto para el uso en humanos; es barato, la formulación es simple y generalmente es seguro (ver figura 2)⁽⁹⁾⁽³³⁾.

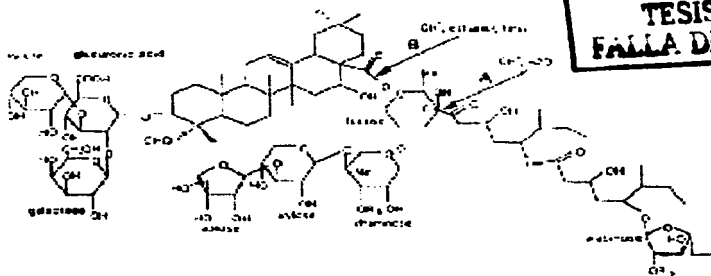


Figura 2: Estructura química de las saponinas.

1.6.2.4. Lípido A:

El lípido A es un disacárido de la glucosamina con dos grupos fosfato y cinco o seis cadenas de ácidos grasos, esta propuesto como adyuvante en vacunas humanas, este adyuvante se asocia con emulsiones de aceite/agua, liposomas, QS21 o CWS (esqueleto de la pared celular). Induce una fuerte respuesta TH₁⁽⁸⁾.

1.6.2.5. Citocinas:

Las citocinas son generalmente glicoproteínas con un peso molecular de aproximadamente 20 kilodaltones siendo propuestas como aditivos en vacunas humanas y veterinarias; son específicas de cada especie evaluando estabilidad y toxicidad.

Estas tienen diferentes acciones, por ejemplo:

- IL 1: Maduración de linfocitos T y B
- IFN: mayor expresión de MHC^{(20) (22)}.

1.6.2.6. Polímeros de carbohidratos:

Estos son polímeros de la manosa (Manana) y de β1-3 glucosa (glucanos, acemanan, lentinan), siendo propuestos como adyuvantes en vacunas humanas mezcladas con el inmunógeno, estos pueden estimular y presentar a los macrófagos (vía del receptor de manosa), células dendríticas (vía receptor DEC 205) y regular la respuesta TH₁⁽⁸⁾.

1.6.2.7. Derivados de polisacáridos

Éstos generalmente son de peso molecular alto como los dextranos o el dietiletilaminoetil (DEAE) dextran usado en veterinaria⁽⁸⁾.

1.6.2.8. Toxinas bacterianas

Éstas son complejos de proteínas como la toxina del cólera o la toxina termolábil de *Escherichia coli*, siendo esta última un potente adyuvante mucosal en algunos modelos animales⁽²⁸⁾.

En el nivel internacional, la lista de productos naturales y derivados por síntesis química, con propiedades adyuvantes, es cada vez mayor; sin embargo, sólo un reducido número se utiliza en la formulación de vacunas humanas existiendo una tendencia relacionada con la evaluación de nuevas sustancias con esta finalidad, en función del campo de aplicación y de la relación eficiencia/seguridad se pueden reconocer diferentes categorías de adyuvantes presentados a continuación⁽²⁾:

Adyuvantes	La eficiencia es más importante que la seguridad		La seguridad es más importante que la eficiencia	
	Animales de laboratorio	Animales para la alimentación	Animales de compañía	Humanos
Adyuvante Completo de Freund	+	-	-	-
Emulsiones aceite/agua	+	+	(-)	-
Emulsiones agua/aceite	+	+	-	-
Materiales inertes	+	(+)	(+)	(-)
Compuestos de aluminio	+	+	+	+
Liposomas	+	+	(+)	(-)
Saponinas	+	(+)	(+)	(-)
DDA	+	(+)	(+)	(-)
NBP	+	(+)	(+)	(-)

Tabla 1: Lista de adyuvantes según su eficiencia y seguridad

+: aplicado de rutina en productos comerciales; (+): no aplicados, 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 muy específicos⁽²⁾.

El criterio más importante, sin lugar a dudas, para la selección de un adyuvante destinado a vacunas humanas es la bioseguridad y en la práctica, los compuestos de aluminio son los únicos adyuvantes licenciados para uso humano. Las nuevas vacunas recombinantes y sintéticas poseen una baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas tradicionales, consistentes en los microorganismos intactos, atenuados o inactivados por el calor; de ahí el interés por la búsqueda de diferentes adyuvantes para incrementar la efectividad de estas nuevas vacunas para uso humano⁽²⁾. En este sentido, existe un género de microorganismos que se han estado investigando y son los *Micoplasmas* cuyos componentes celulares se han reportado como elementos que afectan al sistema inmunitario⁽¹¹⁾.

1.7. LOS MICOPLASMAS.

Los *Micoplasmas* fueron descritos por primera vez, en 1898 por Nocard y Roux, ellos aislaron al *Mycoplasma mycoides* de algunos casos de pleuroneumonía bovina. En ese mismo siglo se aisló de carneros y cabras, la segunda especie de *Micoplasmas* y se le denominó "PPLO" (pleuro neumoniae like organism) organismos parecidos a la pleuroneumonía. Todos los *Micoplasmas* fueron descritos en el siglo XX.

El primer *Mycoplasma* aislado de humanos fue el *Mycoplasma hominis* fue recuperado en 1938 de un absceso de las glándulas de Bartholin.

En 1944, Eaton y col. lograron aislar al *Mycoplasma pneumoniae* de un caso de neumonía atípica primaria, pero pensaron que se trataba de algún virus, mientras que Marmion y Goodburn en 1960 sugirieron que era un "PPLO". Sin embargo no fue sino hasta la década de los 60's cuando se definió correctamente al género *Mycoplasma* ⁽¹³⁾.

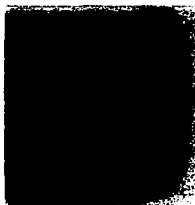
El nombre genérico *Mycoplasma* se deriva del griego "myco" que quiere decir filamento o micelio y del latín "plasma" que se refiere a la plasticidad y pleomorfismo del mismo ⁽¹²⁾.

1.7.1. Clasificación y características:

Los *Micoplasmas* pertenecen a la clase Mollicutes, al orden Mycoplasmatales y a la familia Mycoplasmataceae, ésta cuenta con tres géneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma* y *Spiroplasma*. En la actualidad la familia Mycoplasmataceae está formada por más de 60 especies^{(39) (15)}.

Sus principales características son:

Son los microorganismos celulares más pequeños generalmente miden de 300 a 800 nm de diámetro, son anaerobios facultativos, el tamaño es cercano al mínimo de una célula de vida libre y es apenas adecuado para contener al genoma y al mecanismo sintético necesario para realizar las funciones requeridas por una unidad reproductiva mínima^{(25) (39)}.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3: Fotografía en microscopio óptico de *Mycoplasma capricolum* con 5 días de crecimiento.

Son muy pleomórficos (*pleon*: muchos *morphe*: forma), se han descrito una gran variedad de tipos morfológicos entre los cuales se incluyen: filamentos largos, algunas veces ramificados o estrellados, estructuras cocoides pequeñas o de lágrima, arreglos en forma de anillo y cuerpos grandes redondos, algunas veces vacuolados. En parte la multiplicidad de conformaciones se debe a la plasticidad celular resultante de la ausencia de una pared celular rígida, siendo incapaces de sintetizar una peptidoglicana o sus precursores, por lo tanto son resistentes a la penicilina y a sus análogos, pero sensibles a la lisis por choque osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos más completos. También son sensibles a los antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteínas como las tetraciclinas y algunas veces a la eritromicina. Se encuentran limitados únicamente por una membrana plasmática que constituye la estructura más externa de la célula^{(13) (50)}.

Una de las características de estos microorganismos es su capacidad de atravesar filtros que retienen bacterias comunes. Por tanto se describen como filtrables propiedad que comparten con los virus. Se piensa que estas características de filtración están relacionadas con la naturaleza plástica de la célula o sea que son forzados a pasar a través de los poros muy pequeños por medio de alta presión⁽¹⁵⁾.

Los *Micoplasmas* no tienen flagelos, pero se puede apreciar movilidad en pocas especies. El mecanismo de movilidad es incierto⁽¹⁵⁾.

Por ser la forma de vida celular más pequeña, la ultraestructura del *Micoplasma* no es compleja, por lo menos en comparación a las células bacterianas⁽¹⁵⁾.

Los *Micoplasmas* son procariontes, con un cromosoma circular de DNA de tira doble, se piensa que el tamaño del genoma es aproximadamente de una quinta parte del de *Escherichia coli*, su reproducción es por fisión binaria. Aparentemente el citoplasma no contiene organelos membranosos, aunque están presentes algunos ribosomas, bajo la forma de gránulos citoplasmáticos, la membrana más externa es una membrana citoplasmática trilaminar, constituida por proteínas y lípidos^{(15) (50)}.

1.7.2. Características de cultivo

Los *Micoplasmas* para su crecimiento requieren de un medio de cultivo exigente, el cual debe contener el medio infusión de corazón de bovino con peptona y estar enriquecido con la adición de suero y extractos de levadura, las especies de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* requieren colesterol, algunos *Micoplasmas* toleran una variación de pH amplia pero algunos mueren en un pH de 7.0 o menor y requieren de un pH de 7.8 a 8.0 para crecer. Las variedades saprófitas pueden crecer a 22°C, con temperatura óptima de 30°C pero las parasitarias requieren 37°C.^{(13) (39) (40) (51)}

Algunas especies pueden también necesitar suplementos de dióxido de carbono.

Después de varios días de incubación, las colonias son planas traslucidas, crecen dentro del medio y con frecuencia presentan el aspecto de "huevo frito", con la porción central de la colonia embebida en el agar y la periferia sobre la superficie como se muestra en la figura 3.

Las placas del agar se incuban normalmente entre 2 y 10 días hasta que el crecimiento de las colonias es aparente, aunque las colonias raramente son suficientemente grandes como para poder observarlas a simple vista necesitándose de un microscopio estereoscópico para su observación. Para observar las colonias al microscopio, se utilizan preparaciones de las muestras con la tinción de Dienes⁽¹⁵⁾.

Los *Micoplasmas* son un grupo variado y heterogéneo de microorganismos, algunos son saprófitos de vida libre, la mayoría son parásitos adaptados, que se presentan no sólo como comensales o agentes patógenos en los vertebrados sino también como agentes causales de enfermedades en animales y plantas⁽¹⁵⁾.

Muchos productos derivados de diferentes cepas de *Micoplasmas* han sido propuestos como moduladores del sistema inmunitario en diferentes formas entre las cuales tenemos: estimulan la proliferación de linfocitos, la producción de interferón, estimulan la síntesis del factor de necrosis tumoral, inducen la proliferación de macrófagos por la inducción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, inducen *in vitro* la producción de interleucina 6, entre otros.

Los efectos de los *Micoplasmas* sobre el sistema inmunitario pueden ser específicos de acuerdo a las cepas del *Micoplasma* y la información genética del hospedero⁽¹¹⁾.

1.8. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE UN ADYUVANTE.

En los estudios relacionados con la evaluación de la efectividad de diferentes adyuvantes se impone dejar líneas generales reglamentadas, que permitan solucionar las principales dificultades existentes actualmente en este campo, entre las que pueden citarse:

- La no existencia de criterios estandarizados para determinar la eficacia de los adyuvantes.
- La mayoría de los estudios adolecen de formulaciones estandarizadas con referencias apropiadas.
- Los niveles de inmunoestimulación alcanzados con los distintos adyuvantes no se indican de forma explícita en los trabajos publicados.
- En general las condiciones para lograr la eficiencia óptima (tipo de antígeno, ruta de inmunización, especies animales, etc) no han sido establecidas⁽²⁾.

Estos aspectos han sido reconocidos por Stewart-Tull⁽²⁾ quien propuso una estrategia para la estandarización de la eficacia de los adyuvantes, la cual contempla la utilización de la ovoalbúmina y el virus de la influenza como antígenos estándares, el empleo de adyuvantes de referencia y parámetros definidos por la inmunidad (determinación de los títulos de anticuerpos por ELISA)⁽²⁾.

1.9. ACTUALIDAD EN LA EVALUACIÓN.

Los adyuvantes deben ser analizados en el ámbito de la compleja dinámica de la respuesta inmunitaria, particularmente en su rama inductora y en los efectores específicos y no específicos que se estimulan. Tradicionalmente el efecto de los adyuvantes era evaluado a través de la producción de anticuerpos, inducción de hipersensibilidad retardada (HR), inducción de células T citotóxicas y por desafío con microorganismos vivos⁽¹⁾.

Hoy la evaluación de los adyuvantes se ha revolucionado con el paradigma Th₁ y Th₂ el cual ha sido demostrado en varias especies, no sólo en las subpoblaciones de células CD₄ sino también a nivel de las células CD₈. Este enfoque conlleva a que los efectores de la respuesta TH₁ (celular) no es sólo mediada por linfocitos T citotóxicos, sino también, se estimula tanto la obtención de isotipos particulares de anticuerpos como a células no linfoides para amplificar la respuesta celular. Este desarrollo de la inmunología ha hecho que la evaluación de los adyuvantes se desplace hacia el nivel molecular, principalmente a través de la evaluación de la producción de citocinas por ser éstas las que determinan el microambiente inductivo. Por otro lado, también se ha evaluado la simulación del efecto adyuvante por la administración de las citocinas y por el pleiotropismo de las mismas que han originado los fragmentos que intervienen en la inducción de la respuesta inmunitaria^{(1) (24)}.

Por otra parte para comprender mejor a los adyuvantes es necesario que se incorporen otros criterios cuantitativos, cualitativos y sobre todo funcionales. Esto está relacionado con la posibilidad de que se induzcan altos títulos de anticuerpos y ellos no sean efectivos, por tener una baja afinidad, por el antígeno natural⁽¹⁾.

En resumen en la actualidad la afinidad, el isotipo y las propiedades biológicas de los anticuerpos son tres elementos importantes a tener en cuenta en la respuesta inducida. Además es necesario la evaluación celular y no sólo incluir las técnicas clásicas de hipersensibilidad retardada, linfoproliferación y linfocitos T citotóxicos sino también la determinación de pruebas funcionales celulares como los son: Opsonofagocitosis, efectos bactericidas, entre otros y en especial los Patrones de citocinas inducidas⁽¹⁾.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen pocas sustancias que son utilizadas como adyuvantes en humanos, debido a que el criterio más importante para la selección de un adyuvante destinado a vacunas humanas es la bioseguridad y en la práctica los compuestos de aluminio son los únicos permitidos para el uso humano, por lo cual se está estudiando a nivel experimental a los *Micoplasmas* los cuales son favorecidos por las características de inmunomodulación que presentan y que no dan indicios de originar una producción de hipersensibilidad y de efectos adversos.

3.HIPÓTESIS

Si se presenta un alto nivel de anticuerpos contra el antígeno inoculado junto con las fracciones extraídas de las membranas de *Mycoplasma capricolum* entonces podemos decir que éstas pueden tener una capacidad adyuvante.

4. OBJETIVOS GENERALES

- Identificar nuevos agentes biológicos con actividad adyuvante.
- Estudiar la capacidad adyuvante de los componentes de la membrana de *Mycoplasma capricolum*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la separación de los componentes de las membranas de *Mycoplasma capricolum* utilizando técnicas de separación orgánica.
2. Inocular las fracciones obtenidas a ratones para determinar la producción de anticuerpos contra albúmina sérica bovina.
3. Determinar los niveles de anticuerpos inducidos en diferentes intervalos de tiempo, utilizando la técnica de ELISA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de biomasa de *Mycoplasma capricolum*

Se utilizó una cepa ATCC de *Mycoplasma capricolum* 27343 la cual se empleó para inocularla en medio PPLO líquido (ver apéndice), realizando los pases necesarios hasta obtener el volumen requerido siendo incubados a 37°C.

Comprobando el crecimiento del *Mycoplasma capricolum* por medio de la inoculación del medio líquido ya crecido, en cajas de medio sólido de PPLO (ver apéndice)

5.2. Obtención de células

El medio PPLO líquido inoculado con el *Mycoplasma capricolum* se centrifugó a 4,500 rpm por 15 minutos para la obtención de las células, el sobrenadante obtenido se eliminó y la pastilla se resuspendió en 10 ml de agua desionizada y se volvió a realizar la misma operación para lavar las células obtenidas, las cuales se conservaron en congelación suspendidas en agua desionizada (ver apéndice) hasta su utilización.

5.3. Separación de membranas

Las células obtenidas se resuspendieron en 1 ml de agua desionizada para después transferir esta suspensión por cada 10 a 20 mg de proteína celular a 50-100 volúmenes de agua desionizada precalentada a 37°C, después de 5 minutos de incubación con agitación constante y se centrifugaron a 30,000 g = 25,000 rpm x 45 minutos para obtener las membranas del *Mycoplasma capricolum*. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 4,500 rpm x 15 minutos para remover las células que no se rompieron.

La preparación de membranas se resuspendió en SSF (ver apéndice) y se almacenó a -20°C hasta su utilización⁽²⁵⁾.

5.4. Determinación de proteínas (Método de Bradford)

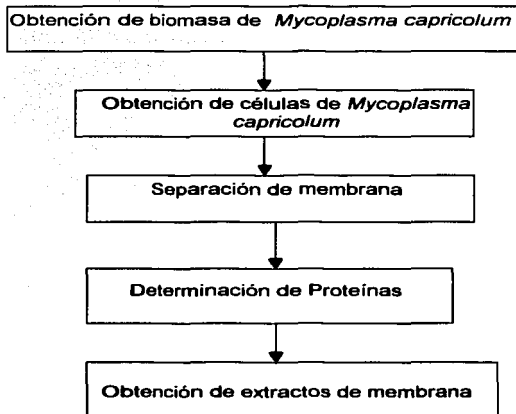
Se requirió el reactivo solución de azul brillante de Coomassie el cual se preparó disolviendo 100 mg en 50 ml de etanol al 95 % agregando 100 ml de H₃PO₄ al 85% aforando a 1 l.

Se pipeteó en tubos de ensaye de 12x100mm, 1 ml de solución de proteínas conteniendo entre 10 y 100 mg, se agregaron 5 ml del reactivo de azul de Coomassie y se mezclaron por inversión o utilizando un vórtex.

Se midió la absorbancia a 595 nm después de 2 minutos de incubación y antes de 1 h.

El blanco debe contener 0.1 ml de buffer y 5 ml de reactivo de Coomassie.⁽²¹⁾

En la figura 4 se muestra el diagrama que representa la secuencia de pasos para la obtención de las membranas de *Micoplasma capricolum*.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4: Diagrama que representa la secuencia de pasos realizados para la obtención de membranas de *Mycoplasma capricolum*

5.5. Obtención de extractos de membrana⁽²⁵⁾

Las membranas obtenidas utilizando el método anteriormente mencionado, se disolvieron en una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 (V:V), utilizando 30 volúmenes del solvente por cada volumen de membrana, en agitación por una hora. De esta mezcla se obtuvieron dos fracciones una soluble y una insoluble. La fracción soluble fue nombrada **FRACCIÓN I**

La fracción insoluble se mezcló con fenol al 45 % (70 ml por cada 2 g de materia insoluble) se dejó incubando a 70°C 15 minutos en agitación constante. De esta mezcla se obtuvieron tres fases:

-Fase acuosa: que se dializó contra agua hasta remover el fenol a temperatura ambiente y con agitación, esta fue marcada como **FRACCIÓN II**.

-Fase fenólica: la cual se dializó contra agua hasta remover fenol durante 24 o 48 horas a temperatura ambiente. A la vez de esta fase se obtuvieron dos fracciones:

- Fracción soluble en agua: la cual se liofilizó y fue **FRACCIÓN III**.

- Fracción insoluble en agua: la cual se liofilizó y fue **FRACCIÓN IV**

-Fase insoluble: la cual se lavó cuatro veces con cloroformo, después de esto se filtró y se secó con éter. De esta fase se obtuvieron dos fracciones:

- Fracción soluble en cloroformo: la cual se puso a evaporar el cloroformo y se obtuvo la **FRACCIÓN V**

-Fracción insoluble en cloroformo: la cual se liofilizó y fue la **FRACCIÓN VI**.

El procedimiento general para la obtención de las fracciones de las membranas de *Mycoplasma capricolum* se muestra en la figura 5.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

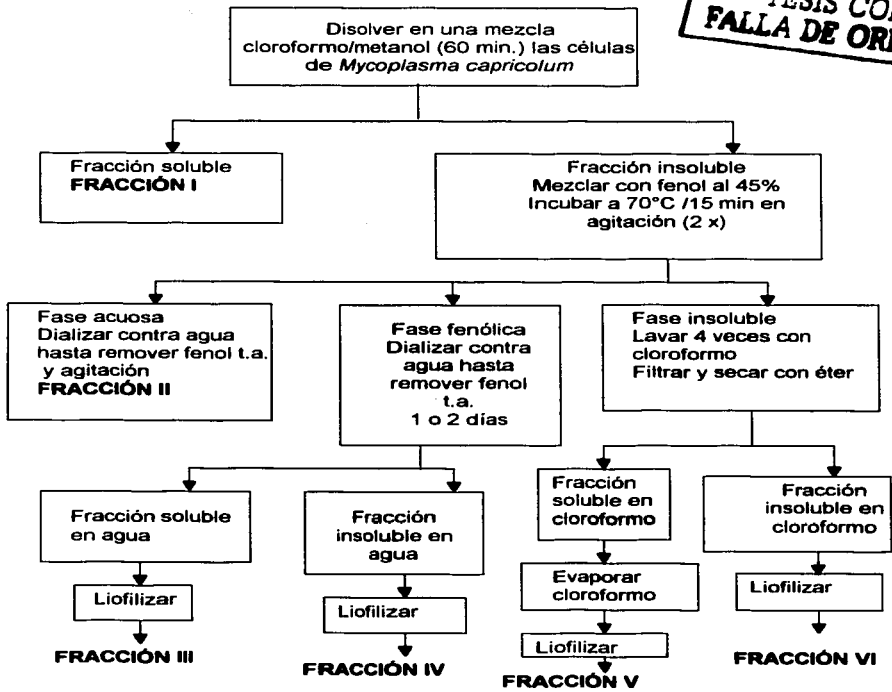


Figura 5: Diagrama que muestra el procedimiento seguido para el fraccionamiento de las membranas de *Mycoplasma capricolum* t.a: temperatura ambiente.

5.6. Inoculación de los extractos de membrana en animales de experimentación

Se utilizaron 90 ratones Balb/c de los cuales se hicieron grupos de diez ratones distribuyéndolos de la siguiente manera:

Grupo 1: 100 µg/ ml albúmina sérica bovina

Grupo 2: *Mycobacterium tuberculosis* 100 µg /ml + 100 µg/ ml albúmina sérica bov.

Grupo 3: Membranas de *Mycoplasma capricolum* 100µg/ml +100 µg/ml albúmina sérica bov.

Grupo 4: Fracción I 50µg/ ml + 100 µg/ ml albúmina sérica bovina

Grupo 5: Fracción I 100 µg/ ml + 100 µg/ ml albúmina sérica bovina

Grupo 6: Fracción III 50µg/ ml + 100 µg/ ml albúmina sérica bovina

Grupo 7: Fracción III 100 µg/ ml + 100 µg/ ml albúmina sérica bovina

Grupo 8: Fracción IV 50µg/ ml + 100 µg/ ml albúmina sérica bovina

Grupo 9: Fracción IV 100 µg/ ml + 100 µg/ ml albúmina sérica bovina

El calculo de las cantidades de las fracciones y membranas se realizó con base en su contenido de proteínas.

A estos ratones se les inoculó un volumen final de 0.5 ml de la fracción correspondiente por vía intradérmica. Se sacrificaron cinco ratones a los tres días de inoculados los extractos y se obtuvieron los sueros de los mismos y los cinco ratones restantes a los cinco días de la inoculación, también obteniendo el suero de los ratones. El suero obtenido se congeló para su posterior utilización.

5.7. Obtención del título de anticuerpos por el método de ELISA

5.7.1. Se sensibilizaron placas de ELISA con 100 μL de una solución de albúmina sérica bovina con una concentración de 100 μg por pozo diluida en un buffer carbonato bicarbonato con un pH de 9.4 (ver apéndice), se dejó incubando 18 horas a 4°C.

5.7.2. Se lavó tres veces la placa con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% (ver apéndice).

5.7.3. Se bloqueó la placa por incubación con 100 μl por pozo de una solución de leche descremada al 5 % preparada en PBS (ver apéndice) durante dos horas a 37°C.

5.7.4. Se lavó tres veces la placa con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% (ver apéndice).

5.7.5. Se realizaron diluciones seriadas en razón de 2 del suero anti-albúmina a analizar, en un volumen de 100 μl por pozo y se incubaron 1 hora a 37°C .

5.7.6. Se lavó diez veces la placa con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% (ver apéndice)

5.7.7. Se incubó la placa con 100 μl por pozo de conjugado antiglobulinas de ratón marcado con peroxidasa preparado en SSF (ver apéndice) con una dilución de 1:100 durante 1 hora a 37°C.

5.7.8. Se lavó diez veces la placa con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05%

5.7.9. Se incubó con 100 μl por pozo de una solución de revelado ABTS (ver apéndice) durante 15 minutos en la oscuridad.

5.7.10. Se detuvo la reacción al agregar 100 μl por pozo de H_2SO_4 4N.

5.7.11. Posteriormente se leyó la absorbancia 405 nm en un lector de placas de ELISA (MicroReader 4 plus Hyperion Inc)

5.7.12. Se graficó la absorbancia en función de la dilución de suero de ratón analizado.

5.7.13. Con los datos obtenidos se determinó el título de anticuerpos antialbúmina sérica bovina siendo éste representado por la máxima dilución del suero que aun presentaba absorbancia.

6. RESULTADOS

De acuerdo a la metodología mencionada se obtuvieron los siguientes resultados:

6.1. Determinación de proteínas.

Las membranas del *Mycoplasma capricolum* y el *Mycobacterium tuberculosis* se utilizaron de acuerdo a la cantidad de proteínas que contenían para lo cual se utilizó una curva patrón de proteínas preparada con la técnica de Bradford y cuyos valores se encuentran en la tabla 2 y la gráfica obtenida se muestra en la figura 6.

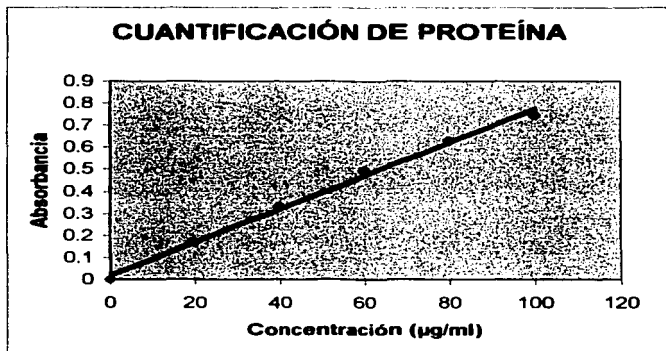


Figura 6 Curva patrón de proteína utilizando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

Concentración µg/ml	0	20	40	60	80	100
Absorbancia	0	0.171	0.332	0.494	0.63	0.746

Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos para preparar la curva patrón utilizando la técnica de Bradford.

6.2 Rendimiento de las fracciones

En cuanto al rendimiento de material obtenido de las fracciones de las membranas de *Mycoplasma capricolum* se obtuvieron las siguientes cantidades:

FRACCIÓN	PESO (g)
FRACCIÓN I	0.02
FRACCIÓN II	0.0013
FRACCIÓN III	0.1
FRACCIÓN IV	0.01
FRACCIÓN V	0.0006
FRACCIÓN VI	0.011

Tabla 3 Valores en peso obtenidos de las fracciones de las membranas de *Mycoplasma capricolum* después de liofilizarlos.

6.3. Determinación del título de anticuerpos

Para determinar el título de anticuerpos que indujo la inoculación de cada fracción mezclado con albúmina sérica bovina se utilizó la técnica de ELISA en la cual se determinaron las absorbancias de las diluciones del suero utilizado, en la tabla 4 y la figura 7 se muestra un ejemplo de los valores que se obtuvieron y la distribución de las absorbancias de estos utilizando la técnica de ELISA. El título se determinó como la máxima dilución del suero que aun presentaba absorbancia.

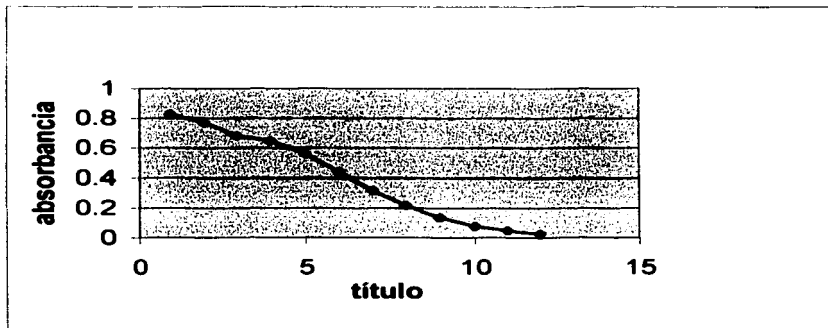


Fig. 7 Gráfica que representa los valores de absorbancia obtenidos al titular los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inoculados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de la FRACCION I y sacrificados a los 5 días después de la inoculación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TITULO	Absorbancia
1:20	0.827
1:40	0.773
1:80	0.682
1:160	0.0.646
1:320	0.560
1:640	0.440
1:1,280	0.380
1:2560	0.218
1:5,120	0.137
1:10,240	0.077
1:20,480	0.047
1:40,960	0.027

Tabla 4 Cuadro que muestra los valores de absorbancia obtenidos al titular los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inoculados con 100 µg/ml de la FRACCIÓN I y sacrificados a los 5 días después de la inoculación.

6.4. Determinación de la capacidad adyuvante

- a. La fracción I fue la que indujo el más alto título de anticuerpos inoculado en una concentración de 100 µg/ml ya que al día 5 se obtuvo un título de 1:40,960.
- b. La fracción II, V y VI no se obtuvieron en cantidad suficiente por lo que no se logró probar su capacidad adyuvante.
- c. La fracción III indujo un título de anticuerpos no significativo inoculado en una concentración de 50 µg/ml a los 3 días de inoculación.
- d. La fracción IV indujo un título alto inoculado en una concentración de 50 µg/ml a los 5 días después de la inoculación pero no en el mismo nivel de la fracción I.
- e. Las células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* indujeron títulos bajos de anticuerpos anti-albúmina sérica bovina comparados con las fracciones de *Mycoplasma capricolum*.
- f. Las membranas de *Mycoplasma capricolum* indujeron en general más altos títulos que las células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo los títulos fueron bajos comparados con las fracciones de las membranas de este microorganismo. (ver tabla 5)

FRACCIÓN	CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	DIAS	TÍTULO
FRACCIÓN I	50	3	1:20,480
FRACCIÓN I	50	5	1:20,480
FRACCIÓN I	100	3	1:20,480
FRACCIÓN I	100	5	1:40,960
FRACCIÓN III	50	3	1:20,480
FRACCIÓN III	50	5	1:5,120
FRACCIÓN III	100	3	1:10,240
FRACCIÓN III	100	5	1:10,240
FRACCIÓN IV	50	3	1:20,480
FRACCIÓN IV	50	5	1:20,480
FRACCIÓN IV	100	3	1:2,560
FRACCIÓN IV	100	5	1:2,560
Albúmina sérica bovina	100	3	1:2,560
	100	5	1:5,120
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	100	3	1:320
	100	5	1:640
Membranas de <i>M. capricolum</i>	100	3	1:2,560
Membranas de <i>M. capricolum</i>	100	5	1:1280

Tabla 5. Cuadro que muestra los títulos de anticuerpos anti-albúmina sérica bovina que fueron producidos por la inoculación de esta proteína mezclada con las diferentes fracciones obtenidas y otros componentes bacterianos.

7. DISCUSIÓN

Los adyuvantes juegan un papel muy importante en la eficacia de las vacunas, la mayoría de estas últimas están compuestas por subunidades antigénicas altamente purificadas, que son muy seguras pero tiene más baja inmunogenicidad que otras con más impurezas; ésta puede ser potenciada por los adyuvantes, la utilización de estos compuestos puede tener otras ventajas como la inmunización eficaz de personas con capacidad inmunitaria disminuida como son los neonatos, las personas inmunodeprimidas, los ancianos y la utilización de vacunas con menor cantidad de antígeno. La utilización de adyuvantes permite por lo tanto crear vacunas combinadas con el menor número de dosis de refuerzo⁽⁴⁾.

Las exigencias más importantes para un adyuvante se relacionan con una elevada eficacia, un amplio espectro de aplicación, una fácil manipulación y por supuesto la disponibilidad comercial⁽⁴⁾.

La utilización de los adyuvantes en la producción de antisueros y vacunas reviste una importancia primordial por razones económicas.

El criterio más importante, sin lugar a dudas, para la selección de un adyuvante destinado a vacunas humanas es la bioseguridad y en la práctica los compuestos de aluminio son los únicos adyuvantes licenciados para uso humano. Por lo cual es de gran interés el encontrar más adyuvantes para la utilización en humanos que no representen un riesgo a la salud⁽²⁾.

En el campo de la salud veterinaria, la eficacia del adyuvante es un elemento de gran importancia y se toleran ciertos niveles de efectos colaterales, para ser utilizado en la producción de antisuecos y vacunas⁽²⁾.

Las propiedades adyuvantes han sido demostradas en numerosos polisacáridos naturales y algunos derivados obtenidos por hidrólisis o modificación química. Ejemplo de éstos son los derivados de productos biológicos como los glucanos aislados de la pared celular de levaduras. Ha sido mostrado por diferentes autores que la administración simultánea del glucano y un antígeno estimula la formación de anticuerpos específicos contra este último⁽²⁾.

Se ha reconocido el efecto adyuvante en *Leishmania major*, *Mycobacterium leprae*, *Candida albicans*⁽²⁾.

Desde el punto de vista de la inmunización de especies de interés económico se han alcanzado resultados muy prometedores con el empleo de antígenos enlazados a polisacáridos como el J-carragenano en aves y el Sulfato de Dextrano en el ganado bovino, los cuales confirieron protección a los animales en un encuentro posterior con los antígenos utilizados⁽²⁾.

En este contexto, durante los últimos años se han dado importantes pasos en la utilización de polisacáridos como adyuvantes inmunológicos. A modo de ejemplo podemos mencionar la formulación "Adjuvax TM" cuyo componente con actividad adyuvante es un polisacárido de la clase de los glucanos donde el antígeno se incorpora a la matriz polisacárida con una breve retención y el polímero acetilado de la manosa, registrado comercialmente como "Acemannan" que se emplea en la vacuna contra el virus de enfermedad de Marek en las aves^{(2) (9)}.

El estudio de los productos naturales, incluyendo los polisacáridos de diversas fuentes ofrece amplias perspectivas para la búsqueda de nuevas sustancias con actividad adyuvante y desprovistas de propiedades biológicas adversas, para lo cual en este trabajo se está buscando la posibilidad de utilizar al *Mycoplasma capricolum* o sus fracciones como adyuvante de vacunas para uso veterinario y uso humano, dado a las características que presenta la membrana del mismo⁽¹¹⁾.

Para evaluar la capacidad adyuvante de las fracciones del *Mycoplasma capricolum* se tomó como base los aspectos que propuso Stewart-Tull⁽²⁾ utilizando parámetros definidos por la inmunidad (determinación de los títulos de anticuerpos por ELISA) lo cual nos ayudó a poder decidir que fracción es la que podría ser la más apta para utilizarla como adyuvante.

Con base en esto y los resultados obtenidos en este trabajo se puede decir que la Fracción I es la que tiene esta capacidad adyuvante debido a que induce el título más alto de anticuerpos contra albúmina sérica bovina a los 3 y 5 días.

La fracción I de las membranas de *Mycoplasma capricolum* fue obtenida por medio de una extracción de cloroformo/metanol la cual probablemente contiene una alta concentración de lípidos libres contenidos en la membrana⁽²⁵⁾.

Todas las células contienen una mezcla heterogénea de moléculas orgánicas que son relativamente insolubles en agua pero muy solubles en disolventes no polares como el cloroformo, el éter y el benceno. Estas moléculas reciben el nombre de lípidos, muestran una gran variedad en cuanto a estructura y pertenecen a este grupo de moléculas los triglicéridos, los fosfolípidos, los esteroides, los carotenoides y muchos otros tipos⁽¹²⁾.

Entre otras funciones, sirven como componentes de membrana, formas de almacenamiento de carbono y energía, precursores de otros componentes celulares y como barreras protectoras frente a la pérdida de agua⁽¹²⁾.

La mayoría de los lípidos contiene ácidos grasos, que son ácidos monocarboxílicos que suelen tener cadenas rectas, aunque también pueden ser ramificadas. La fosfatidil etanolamina es un importante fosfolípido que con frecuencia se encuentra en las membranas bacterianas, formado por 2 ácidos grasos esterificados con glicerol; el tercer hidroxilo del glicerol se une a un grupo fosfato y la etanolamina se une al fosfato en las membranas celulares. El extremo hidrófobo se

introduce en su interior, en tanto que el extremo con carga polar queda expuesto al agua en la superficie de la membrana⁽¹²⁾.

Estos compuestos probablemente estimulan al sistema inmune a la producción de anticuerpos mejorando la presentación de antígeno induciendo la formación de granulomas, los cuales son infiltrados celulares con una masa densa y rica en macrófagos, con lo que probablemente mejoran el procesamiento y presentación del antígeno actuando como coestimuladores de los macrófagos, aumentando en su superficie el número de moléculas B7, lo que facilita sus interacción con el receptor CD28 del linfocito dándose la llamada señal coestimuladora que potencia la interacción entre el MHC, antígeno procesado y TCR⁽⁴⁾.

Comparando los resultados obtenidos con las membranas completas de *Mycoplasma capricolum* se observa que la fracción I presenta más producción de anticuerpos que la membrana del *Mycoplasma capricolum* esto se puede justificar debido a que la membrana del *Mycoplasma capricolum* está constituida de diversos componentes como: lipoglicano, lipoproteínas, proteínas de membrana integral, proteínas de membrana periperla (lipoglicano) en cambio la fracción I es una preparación más homogénea de lípidos de membrana^{(43) (14)}.

El *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo que por sus características inmunológicas ha sido utilizado como adyuvante en la mayoría de vacunas para uso veterinario, por esta razón se tomó como referencia para nuestro trabajo dándonos como resultado que los niveles de anticuerpos obtenidos fueron bajos, esto puede ser por falta de tiempo para que los niveles de anticuerpos se elevarán ya que *Mycobacterium tuberculosis* induce preferentemente la respuesta celular^{(44) (47)}.

Los linfocitos T se activan cuando reconocen antígenos específicos del *Mycobacterium tuberculosis*, los linfocitos CD₄ activados proliferan y producen factores como el IFN que activa a los macrófagos, que se transforman en células grandes, metabólicamente muy activas capaces de limitar la multiplicación de los *Mycobacterium tuberculosis*^{(26) (49)}.

El presente trabajo es el inicio de una investigación más amplia sobre las propiedades adyuvantes de las membranas de *Mycoplasma capricolum* y/o sus fracciones con la perspectiva de utilizarlos en medicina veterinaria y humana.

- a) Siendo así para poder lograr una mejor evaluación de este adyuvante se tendrá que realizar la evaluación de la afinidad, isotipo y propiedades de los anticuerpos producidos, conjuntamente efectuar la medición y evaluación de las citocinas producidas.
- b) Evaluar lesiones en órganos como bazo, timo y placas de Peyer.
- c) Observar los sitios de inoculación por lo menos tres veces por semana para percatarse de los posibles efectos locales que pueda tener el adyuvante⁽⁴⁵⁾.
- d) Con respecto a la utilización del *Mycobacterium tuberculosis* como control en este trabajo, se pueden mejorar sus propiedades adyuvantes utilizando alguna proteína o componente purificado de este microorganismo además de utilizar el adyuvante completo de Freund como control, así como realizar evaluaciones de la cantidad de anticuerpos inducidos a los 3, 5 y 14 días después de la inoculación.
- e) A este mismo se le podría realizar el procedimiento de extracción que se le llevo a cabo al *Mycoplasma capricolum*.

- f) La ventaja de la utilización de este microorganismo *Mycoplasma capricolum* es que su crecimiento es rápido y se puede obtener mucha biomasa, lo cual ayudaría con respecto al costo en comparación con el *Mycobacterium tuberculosis* que tarda mucho en crecer y tiene menor inducción de respuesta de anticuerpos.
- g) Llevar un análisis por cromatografía en gel de la Fracción I, para tener bien establecido de que se compone esta fracción⁽⁴³⁾.

8. CONCLUSIONES

1. El proceso de extracción de las membranas de *Mycoplasma capricolum* produjo seis fracciones diferentes.
2. La inducción de anticuerpos contra albúmina sérica bovina es un parámetro adecuado para el establecimiento de la capacidad adyuvante.
3. La fracción con más capacidad adyuvante utilizando el método de inducción de anticuerpos específico contra albúmina sérica bovina fue la número I.
4. La capacidad adyuvante de las fracciones más activas (I y IV) no solo dependió de la concentración en que fueron utilizadas sino del tiempo en el que indujeron la respuesta de anticuerpos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Oliver Pérez Lastre Los adyuvantes simples adyuvantes o secretos e imprescindibles agentes vacúnales
<http://caibco.ucv.ve/Vitae/Vitaeocho/Articulos/Inmunologia/ArchivosPDF/Inmunologia.pdf>
2. Morris Q. J. Adyuvantes Inmunológicos Centro de Investigación de Cuba http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol18_2_99/ibi10299.htm
3. Certificado de autor de invención de Formulaciones Inmunopotenciadoras para uso vacunal
<http://www.ocpi.cu/doc/2000/t2797.PDF>
4. <http://www.vacunas.net/capitulo2.htm>
5. <http://www.inia.es/cieex/OCTAVO2.HTM>
6. http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_04.htm
7. García T F. (1997) Fundamentos de Inmunobiología Ed. UNAM Primera Edición pp 174-175
8. Cox J C. (1997) Coulter Adjuvant a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 15(3): 248-256.
9. Vogel FR Powell MF A compendium of vaccine adjuvants and excipients
(<http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf>)
10. http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/genetica/terapia_y_transgenesis.html

11. Romero R. A.(2001) Immunomodulatory properties of *Mycoplasma pulmonis* I Characterization of the immunomodulatory activity *International Immunopharmacology* (1):1679-1688
12. Prescott H.(1999) Microbiología Cuarta edición Ed. Mc Graw Hill pp 833
13. Jawetz E.(1993) Microbiología Médica Ed. El manual Moderno pp 281- 283
14. Chambaud I. (1999) Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system *Trends in Microbiology* 7(12): 493-499
15. Burrow (1984) Tratado de Microbiología 21 Edición Ed. Interamericana pp 909-916
16. Aucouturier J. Dupuis V, Ganne V. (2001) Adjuvants designed for veterinary and human vaccines *Vaccine* 19: 2666-2672
17. Clements C.J. Griffiths E. (2002) The global impact of vaccines containing aluminum adjuvants *Vaccine* 20: S24- S33
18. Hagan D. (2001) Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases *Biomolecular Engineering* 18: 69-85
19. Alving C R. (2002) Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* 3201:1-9
20. Donnelly J.(1997) New developments in adjuvants Mechanims of ageing and Development *Vaccine* 93:171-177
21. Bradford M.(1976) A rapid and sensitive method for the Quantitation Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

22. Hughes H. (1998) Cytokine adjuvants: lessons from the past guidelines for the future? *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63: 131-138
23. Moingeon P. (2001) Towards the rational design of TH1 adjuvants *Vaccine* 19: 4363-4372
24. Hunter R L. (2002) Overview of vaccine adjuvants: present and future *Vaccine* (3)191: 1-6
25. Razin S.(1981) Techniques for the manipulation of Mycoplasma membranes 2-23
26. <http://Mendel.vab.es/biocomputacio/trebans99-00/Andreu/>
27. Stanley L. H.(2002) Elimination of aluminum adjuvants *Vaccine Journal* 3197:1-4
28. Castrillón R.L. (1993) Mecanismo de acción de los adyuvantes *Bioquímica Journal* 5 18:73 19-27
29. Baylor N. W. (2002) Aluminum salts in vaccines US. Perspective *Vaccine* 3193:1-6
30. Kamstrup S. (2000) Preparation and characterisation of Quillaja saponin with less heterogeneity than Quil- A *Vaccine* 18: 2244-2249
31. Sjolander A. (2001) Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models *Vaccine* 19: 2661-2665
32. Alving C. R. (1991) Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *Immunology Methods* 140: 1-13
33. Liu G. (2002) QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity *Vaccine* 20: 2808-2815
34. Windon R. G. (2002) Local immune responses to influenza antigen are synergistically enhanced by the adjuvant ISCOMATRIX® *Vaccine*20: 490-497.

35. Shi Y. (2001) Detoxification of endotoxin by aluminum hydroxide adjuvant *Vaccine* 19:1747-1752
36. Stede Y. V. (2002) CpG – oligodinucleotides as an effective adjuvants in pigs for intramuscular immunizations *Veterinary immunology and Immunopathology* 86: 31-41
37. Giudice G. (2002) What are the limits of adjuvanticity? *Vaccine* 20: S38-S41
38. Iyer A. (2001) Evaluation of three "ready to formulate" oil adjuvants for foot-and- mouth disease vaccine production *Vaccine* 19: 1097-1105
39. http://www.geocities.com/bacteriologia_fmz_uam/38mycoplasma.html
40. Efrati H. (1980) Effects of charged cholesteryl esters on *Mycoplasma* growth *North Holland Biomedical Press V* 1221: 59-63
41. Razin S. (1976) The cell membrane of *Mycoplasma* *Microbiology Journal* 143(1): 115-127
42. Diccionario Enciclopédico Quillet (1990) Promotora Editorial 13 Edición Tomo VIII
43. Lelong I. (1988) Effect of 7 β -hydroxycholesterol on growth and membrane composition of *Mycoplasma capricolum* *Biomedical Elsevier* 232:1 354-358
44. Wedlock D. N. (2002) Effect of different adjuvants on the immune responses of cattle vaccinated with *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86: 79-88

45. <http://www.ccac.ca/guides/spanish/v1-93/anexo/anexo15c.htm>
CCPA, Manual V. (Segunda Edición) 1998
46. Becker P. D. (2001) Adamantylamide dipeptide as effective immunoadjuvant in rabbits and mice *Vaccine* 19: 4603-4609
47. Wigdorovitz A. (1998) Modulation of the antigen presentation activity in foot and mouth disease virus (FMDV) vaccines by two adjuvants: avidine and a water soluble fraction of *Mycobacterium* sp. *Virology Journal*
48. Gutierrez I. (2002) Influence of dose and immunization route on the serum IgG antibody response to BSA loaded PLGA microspheres *Vaccine* 20: 2181-2190
49. Mustafa A. S. (2002) Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis *Molecular Immunology Journal* 39:113-119
50. Miyata M. (1999) Cell reproduction cycle of mycoplasma *Biochimie Journal* 81: 873-878
51. Razin S. (1974) Correlation of cholesterol to phospholipid content in membranes of growing mycoplasmas *Microbiology Journal* 41(1): 81-85

10. APÉNDICE

A) PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PPLO LÍQUIDO:

15 g de PPLO

80g de Sacarosa

Rojo de fenol

Acetato de Talio

Suero de Caballo

Extracto de Levadura

Antibiótico

Agua desionizada

Pesar 15 g de PPLO caldo en polvo disolviéndose en 800 ml de agua destilada, agitando hasta que se disuelva (se pone a hervir con el mechero para que se disuelva bien y quede transparente) se agrega además 80 g de Sacarosa, Rojo de Fenol y Acetato de Talio 0.5 ml ya estando disuelto se mide el pH y se ajusta a 7.4 adicionando HCL o NaOH según se requiera.

Se procede a esterilizarlo a 115 lb por 15min, después se le adiciona el suero de caballo que anteriormente fue inactivado y el extracto de levadura estériles además se le adiciona el antibiótico, ya adicionados al medio se procede a distribuirlo en tubos de ensayo 1 ml en cada tubo y lo que resta en frascos estériles para su conservación.

Inmediatamente después se ponen a prueba de esterilidad 24 horas para verificar la esterilidad del medio preparado, ya verificado esto se procede a conservar el medio restante a 4°C debidamente etiquetado con fecha de elaboración, nombre del medio y quien lo elaboró.

B) PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE LEVADURA:

Se disuelven 225g de levadura en 500 ml de agua destilada. Posteriormente se rompe la levadura por calentamiento, ya que se libere todo, se pone el sobrenadante en membranas de diálisis, la membrana se coloca en un vaso de precipitado (pp) de 500 ml de agua destilada sumergiendo la bolsa con el líquido de la levadura y se pone en refrigeración por 24 horas manteniéndolo en agitación. Ya pasadas las 24 horas se recoge el líquido que quedó a fuera y se pone a congelación a -20°C . Al vaso de pp se le adicionan otros 500 ml de agua destilada y se vuelve a introducir la membrana de diálisis volviendo a dejarla en refrigeración por 24 horas con agitación. Pasadas las 24 horas se recoge el líquido que quedó a fuera y se congela a -20°C .

C) ESTERILIZACIÓN DE LA LEVADURA:

Primero se descongela la levadura que se tenía en congelación. Se procede a poner el matraz Kitasato y el embudo con filtro de $0.022\mu\text{m}$ a esterilizar. Luego en un área estéril se realiza la filtración de la levadura, adicionando lo ya filtrado en frascos estériles que se llevan a congelación para su conservación.

D)PREPARACIÓN DEL MEDIO PPLO SÓLIDO:

Realizar el cálculo para saber que cantidad de medio se va a hacer dependiendo del número de cajas petri que se requieran Ejemplo:

20 cajas

1 caja de petri- 20 ml

20 cajas x x = 400ml de medio sólido.

Basándose en ese cálculo se pesa la cantidad de medio requerido , después se disuelve en agua destilada agregándole además sacarosa y Acetato de Talio ya estando listo se le mide el pH y se ajusta a 7.4 adicionando HCl o NaOH. Se pone a esterilizar a 115 lb por 15 min. Ya estando listo se procede a adicionarle el suero de caballo inactivado, el extracto de levadura estéril y la penicilina, ya adicionado esto se sirve en las cajas petri, las cuales se tienen apiladas y se va adicionando el medio a cada una. Ya estando todas se espera a que solidifiquen. Después se ponen a prueba de esterilidad 24 horas en la incubadora para verificar que estén estériles, ya verificado esto se conservan a 4°C estando debidamente etiquetadas con fecha de elaboración, nombre del medio y quien lo elaboró.

F) PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PBS – Tween 20 0.05%

NaCl.....	8 gr.
KCl	0.20g
Na ₂ HPO ₄	1.15g.
KH ₂ PO ₄	0.20g.
Agua desionizada.....	1 litro
Tween 20.....	0.5 ml

Pesar todos los componentes y disolverlos en agua desionizada posteriormente ajustar el pH de la solución a 7.2 después de esto adicionar el Tween 20 disolviéndolo bien en la solución y conservarla a 4 °C.

G) PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE Carbonato – Bicarbonato 0.1 M pH= 9.5

a) Preparar una solución stock 0.1 M de Carbonato (Na_2CO_3) pH = 11.2 como sigue:

- 1) Disolver 10.6 g de Na_2CO_3
- 2) Ajustar pH
- 3) Aforar a 1 litro de agua desionizada.

b) Preparar una solución stock de Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) pH= 8.1 como sigue:

- 1) Disolver 8.4 g de NaHCO_3
- 2) Ajustar pH
- 3) Aforar en 1 litro de agua desionizada

c) Añadir 9 partes de una solución stock de Na_2CO_3 0.1M a 28 partes de una solución stock de NaHCO_3 0.1 M y diluir 1:10 en agua desionizada y mantenerla a 4°C.

H) PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

a) **PREPARACIÓN DE ABTS:** (2,2"- azino-di (ácido-3 cetil-bencil-trazolina-sulfónico) 40 Mm ABTS solución stock (Sigma)

1. Añadir 274.4 mg de ABTS a un frasco disolver con 12.5 ml de agua desionizada y mantener a 4°C.

b) Preparación de solución stock peróxido de hidrógeno 0.5 M

1. Coloque 1 ml de una solución 8 M de H₂O₂ (solución 30 %)

2. Añadir 15 ml de agua desionizada y mantener a 4 °C.

c) Preparación de solución stock de amortiguador de citratos 0.05 M
pH= 4

1. Pesar 4.8 g de Ácido Cítrico

2. Disolver en 500 ml de agua desionizada

3. Ajustar el pH a 3.7 usando NaOH y mantener a 4 °C.

Preparación del sustrato al momento de usarlo:

Mezclar lo siguiente:

0.05 ml de solución stock de ABTS

0.08 ml de solución stock de H₂O₂

10 ml de solución stock de amortiguador de Citratos.

Mantener a 4°C.