

Determinación de la capacidad inmunogénica en el modelo de vacuna M-TT a concentraciones variables de alúmina, en ratones de la cepa BALB/c.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA.



***DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA EN EL MODELO DE
VACUNA M-TT A CONCENTRACIONES VARIABLES DE ALUMINA, EN
RATONES DE LA CEPA BALB/c.***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

JAVIER MARTÍNEZ CORTÉS

Asesor Principal:

DR. BENITO ANTÓN PALMA

Sinodales:

MVZ. CARLOS TENA BETANCOURT

MVZ. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA

MVZ. JOSÉ ANGEL GUTIÉRREZ PABELLO

MVZ. LILIA GUTIÉRREZ OLVERA

MVZ. RAFAEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria:

A mis padres Estela y Enrique por brindarme su apoyo incondicional y alentarme a alcanzar conjuntamente esta meta anhelada. Dios los bendiga y les brinde salud para poder retribuirles un poco de todo lo que me han dado.

Agradecimientos:

Al Dr. Benito Antón Palma por ser el pilar fundamental de esta investigación y por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de las Adicciones en el Instituto Nacional de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente” y por haber compartido todos sus conocimientos y experiencias profesionales.

A los DR. Alberto Salazar, Dr. Carlos Tena Betancourt, QFB Ricardo Hernández, MVZ. Susana Barbosa, MVZ. Sandra Díaz por brindarme su apoyo y orientación en todo momento.

A todos y cada uno de mis amigos, miembros del consejo técnico y a la Universidad Autónoma de México por haber participado de manera directa o indirectamente en la realización de esta tesis.

Índice.

Resumen.....	9
I.- Introducción.....	11
2.1.- Antecedentes históricos de la vacunación.....	11
2.2 Productos Biológicos, inmunógenos y vacunas.....	12
2.3 - Mecanismos y elementos necesarios para la generación de la respuesta inmune de tipo humoral por parte de las vacunas.....	14
• a) Antígenos.....	16
• b) Células presentadoras de antígeno (APC), linfocitos y procesamiento de antígeno.....	19
• c) Complejo principal de histocompatibilidad (MHC).....	21
• d) Interacción MHC-APC.....	22
• e) Procesamiento y presentación de antígenos y generación de respuesta inmune de tipo humoral.....	23
2.4 Adyuvantes.....	23
• a) Clasificación de adyuvantes.....	25
• b) Vía de inoculación de los adyuvantes.....	27
• c) Adyuvantes compuestos por aluminio.....	28
• d) Propiedades físico-químicas del hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y alumbre.....	28
• e) Mecanismos de acción del hidróxido de aluminio.....	29

II.- Antecedentes.....	35
2.1 Antecedentes del desarrollo de vacunas anti-morfina.....	35
2.2 Diseño y funcionalidad de la vacuna M-TT.....	35
2.3 Efectos terapéuticos de la vacuna M-TT.....	36
III.- Planteamiento del problema y justificación.....	39
3.1 Adicción a los opiáceos.....	39
3.2 Problemática actual del uso de los opiáceos.....	40
IV.- Hipótesis.....	44
V.- Objetivo.....	44
VI.- Material y métodos.....	45
6.1- Modelo animal.....	45
• a) Protocolo de inmunización.....	47
• b) Obtención de los sueros.....	48
6.2 Monitoreo y cuantificación de los títulos séricos de anticuerpos Contra morfina.....	48
6.3 Análisis estadístico.....	48
6.4 Protocolo general para ensayo de ELISA de tipo indirecto.....	49

VII.- Resultados.....	54
7.1 Titulación de anticuerpos del primer al séptimo sangrado para los 7 grupos De variación de alúmina.....	54
5.2.- Análisis estadístico de los resultados por medio de Statistics v.3.1®.....	59
VIII.- Discusión de los resultados	65
IX.- Conclusiones.....	68
X.- Bibliografía.....	69

Índice de graficas.

Cuadro 1 Esquema de inmunización y toma de muestras.....	46
Figura 1 promedio aproximado de los títulos de acs 1mg/ml alúmina.....	54
Figura 2 promedio aproximado de los títulos de acs 5mg/ml alúmina.....	55
Figura 3 promedio aproximado de los títulos de acs 10mg/ml alúmina.....	56
Figura 4 promedio aproximado de los títulos de acs 20mg/ml alúmina.....	57
Figura 5 promedio aproximado de los títulos de acs 40mg/ml alúmina.....	58
Figura 6.- Gráfica para la comparacion inter-grupos de los titulos promedio de anticuerpos del primero a el septimo sangrado.....	63

Abreviaturas.

Ac – Anticuerpo.

Ag – Antígeno.

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

APC- Células presentadoras de antígeno.

BSA- Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin).

CTLs CD8+ - Linfocitos T citotóxicos tipo CD8+

Da- Dalton

DA- dopamino mesocorticolímbica.

DCs- Células Dendríticas.

CD- Antígenos de diferenciación (cluster of differentiation)

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

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

g- Gravedades

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

HRP- Enzima Peróxidasa de Rábano.

IL-1 – Interleucina 1.

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

M-TT – Morfina -Toxoide Tetánico.

nm- Nanómetro .

NAC- Núcleo accumbens

OPD - Orto Fenildiamina. (Orto PhenilDiamine).

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

PFCx- Corteza prefrontal

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

TH CD4+ - Células T cooperadores tipo CD4+

TLRs - Receptores Toll (Toll Like Receptors)

VTA- Área ventral tegmental.

I.- Resumen.

Actualmente el uso de drogas de abuso como la cocaína, heroína y morfina así como drogas licitas como el tabaco y el alcohol, representan un problema grave de salud pública, tanto por propiciar conductas socialmente negativas como, por la cantidad de recursos económicos destinados a el tratamiento y rehabilitación de las personas con dichos problemas de adicción.

Es por esto que se ha tenido la necesidad de contar con diversas alternativas para el tratamiento y rehabilitación de este padecimiento, que sean susceptibles de ser aplicadas en un futuro junto con los tratamientos convencionales actualmente utilizados.

Por lo que el contar con un equipo interdisciplinario que desarrolle adecuadamente este tipo de terapias es fundamental, este es el caso de el desarrollo de la vacuna morfina- toxoide tetánico que se ha desarrollado con la finalidad de contribuir en un futuro a la rehabilitación de personas con problemas de adicción a los opiáceos específicamente la morfina y la heroína. Actualmente el desarrollo de este tipo de vacuna se encuentra en fase pre-clínica, y así la participación de diversos profesionales de diferentes áreas de conocimiento se hace necesaria, el Médico Veterinario Zootecnista tiene un papel fundamental en el desarrollo de este tipo de investigaciones, participando activamente desde el uso, mantenimiento, salud y bienestar de los animales de laboratorio apegándose a la normatividad aplicable hasta la participación en la evaluación de los componentes de la vacuna.

De este modo el siguiente trabajo de investigación centra su atención en la evaluación de diferentes concentraciones del hidróxido de aluminio usado como adyuvante en la formulación de la vacuna morfina-toxoide tetánico y así establecer la formulación es la que induce la mejor respuesta inmunogénica en el modelo animal utilizado.

2.- Introducción

2.1.- Antecedentes históricos de la vacunación.

A lo largo de la historia el hombre ha intentado encontrar una forma eficaz de protegerse de las enfermedades infecciosas, este fue el caso del pueblo chino quienes practicaban la variolización alrededor del siglo X, dicha técnica consistía en inocular el virus de la viruela de un enfermo a una persona susceptible, sometiendo además, las pústulas variolosas y el almizcle, a un proceso de ahumado con el propósito de disminuir su virulencia.¹

Sin embargo fue hasta 1796 durante la propagación de una epidemia de viruela en Europa, cuando el médico Inglés, Edward Jenner observó que las recolectoras de leche adquirían ocasionalmente una infección por viruela de vaca, por el contacto continuo con las ubres y las lesiones producidas por la infección; este contacto ayudaba a que posteriormente las recolectoras de leche no enfermaran con la viruela humana. Por lo tanto extrajo pus de una pústula de una ordeñadora que había contraído la viruela de su vaca lechera, y el 14 de mayo de 1796 inculó a un joven llamado James Phipps, el cual no había padecido la afección y a raíz de tal experimento dicho joven quedó inmunizado.²

Hasta 1880 fue cuando Louis Pasteur estableció las bases de la vacunación moderna, así como la vacunación con cepas atenuadas de *Pasteurella multocida*, bacteria causante del cólera aviar. Esta misma técnica es la que posteriormente le permitió desarrollar adecuadamente las vacunas de ántrax y rabia, esta última fue

probada en un niño, Joseph Meister, el cual fue mordido por un perro rabioso. El tratamiento tuvo un éxito absoluto, el niño se recuperó de las heridas y nunca desarrolló la rabia.³

Así a lo largo de los siglos XIX, XX y XXI se han desarrollado tanto vacunas como técnicas de vacunación que han permitido ahorrar el tratamiento de enfermedades infecciosas así como disminuir la incidencia de estas en varios sectores de la población por lo que la vacunación ha sido un gran avance en la salud pública.²

2.2.- Productos biológicos, inmunógenos y vacunas.

De acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration), se define como “Producto Biológico” cualquier virus, suero terapéutico, toxina, antitoxina o producto análogo; aplicable a la prevención o tratamiento de enfermedades humanas y veterinarias.

Y de acuerdo a su finalidad se les puede clasificar como profilácticos y terapéuticos.

Dentro del grupo de los productos biológicos profilácticos se encuentran:

1. Vacunas e inmunógenos
2. Calostro fresco, liofilizado o congelado
3. Sueros hiperinmunes
4. y globulinas

Las vacunas e inmunógenos se utilizan para prevenir enfermedades ya que promueven la inmunidad activa por el contrario el calostro, sueros hiperinmunes y

γ globulinas proveen una inmunidad pasiva por lo que cada inmunógeno promoverá un tipo de respuesta inmunitaria determinada.

Por esta razón es necesario conocer el tipo de respuesta que se generará al administrar un inmunógeno o vacuna, así como las características de cada uno de los inmunógenos o vacunas a utilizar.

Los inmunógenos se pueden clasificar de acuerdo a su origen:

- Vacunas conjugadas
- Vacunas de virus activo
- Vacunas de virus inactivado
- Vacunas de bacterias vivas
- Bacterinas
- Toxoides
- Inmunógenos de subunidades
- Inmunógenos de proteínas recombinantes
- Vacunas de ADN

Por lo que las vacunas son productos biológicos que estimulan el sistema inmunitario del organismo al que se le administre, generando una respuesta y memoria inmunitaria.

2.3 - Mecanismos y elementos necesarios para la generación de la respuesta inmune de tipo humoral por parte de las vacunas.

Para entender que es y cómo se genera la respuesta inmune de tipo humoral definiremos primeramente a la inmunidad pasiva y activa. Se entiende por inmunidad pasiva a la transferencia de inmunoglobulinas o anticuerpos de un individuo a otro. Esta puede ocurrir en forma natural, cuando se transfieren anticuerpos a través de la placenta de madre a hijo o por medio del calostro así como artificialmente con anticuerpos de origen diferente al individuo, este tipo de transferencia de inmunoglobulinas se utiliza generalmente cuando no hay tiempo de que el individuo genere una respuesta inmune de tipo humoral en poco tiempo, este tipo de inmunidad no desarrolla memoria pues no activa la proliferación de linfocito B ni linfocitos Th. ⁴

La inmunidad activa es el tipo de inmunidad en donde los linfocitos B y T son sensibilizados por un antígeno, y por lo tanto ayudarán a montar una respuesta inmune futura mucho más rápida, contra el antígeno al que fueron previamente sensibilizados, además de conferir una protección prolongada. Al igual que en la inmunidad pasiva existen dos vías de adquisición de inmunización activa: la inmunidad activa natural, que es cuando el organismo ha sido expuesto a un patógeno natural y desarrollo una respuesta inmune primaria además de la sensibilización de los linfocitos y la inmunización activa adquirida o artificial es

cuando se administra en forma de vacuna o inmunógeno un antígeno o patógeno para sensibilizar a organismo que se le administre. ⁴

Durante la vacunación, al igual que cuando ocurre una infección por algún microorganismo patógeno, se requiere que el organismo monte una respuesta inflamatoria en el sitio de inoculación. Para que posteriormente se desarrolle una respuesta inmune ya sea de tipo humoral o celular dependiendo del la vacuna o inmunógeno usado. ⁵

La inmunidad humoral, tiene la capacidad de reconocer y eliminar de manera selectiva a microorganismos y moléculas extrañas específicas. Teniendo las siguientes características:

- Especificidad antigénica
- Diversidad
- Memoria inmunitaria

La inmunidad adaptativa no es independiente de la inmunidad innata. Las células fagocíticas que son cruciales en la respuesta de inmunidad inespecífica participan de modo estrecho en la activación de la reacción inmunitaria específica. Una vez que se ha desarrollado una reacción inflamatoria, aparecen mediadores solubles que atraen células del sistema inmunitario. A su vez la respuesta inmunitaria sirve para regular la intensidad de la reacción inflamatoria. ⁵

El sistema inmunitario requiere dicha interacción, específicamente de la cooperación entre linfocitos y células presentadoras de antígeno así como algunos elementos necesarios para la generación de la inmunidad tipo humoral, entre los cuales encontramos:

a) Antígenos:

Los antígenos son sustancias de procedencia exógena o endógena que resulta extraña al organismo. Puede ser específicamente unida por un anticuerpo (Ac) o por un receptor de célula T (TCR), pero no necesariamente genera una respuesta inmune, los antígenos deben de contar con algunas características propias para poder establecer una adecuada respuesta inmune tales como la inmunogenicidad y la antigenicidad.

La inmunogenicidad, es la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células. A la sustancia que activa una reacción inmunitaria específica suele llamársele antígeno, pero es más apropiado denominarle inmunógeno. Por otro lado la antigenicidad es la capacidad para combinarse de forma específica con los productos finales ya sean anticuerpos específicos o receptores de superficie celular. Si bien todas las moléculas que tienen inmunogenicidad también poseen antigenicidad, no sucede lo contrario. Algunas moléculas de bajo peso molecular, llamadas haptenos, son antigénicas pero no son lo suficientemente complejas como para inducir por sí mismas, una reacción inmunitaria específica.

Dentro de los inmunógenos las proteínas son los inmunógenos más potentes y los polisacáridos ocupan el segundo lugar, sin embargo los lípidos, los ácidos nucleicos de un agente infeccioso casi nunca son inmunógenos a menos que forme complejos con proteínas ó polisacáridos.

Gran parte de la capacidad inmunogenica de un antígeno está dada por las siguientes 4 propiedades: alteridad, tamaño molecular, composición y complejidad química, además de la capacidad para procesarse y presentarse con una molécula del MHC en la superficie de una célula presentadora de antígeno.⁶

Alteridad: es la capacidad para identificar una molécula como ajena, acompañada de la tolerancia a lo propio es decir la ausencia de respuesta específica a los antígenos propios. Gran parte de la capacidad para tolerar antígenos propios surge durante el desarrollo de los linfocitos, en el transcurso del cual se exponen linfocitos inmaduros a componentes propios. Los antígenos que no fueron expuestos a los linfocitos inmaduros durante este periodo crítico pueden ser reconocidos posteriormente como ajenos por el sistema inmune cuando se introduce un antígeno en un organismo, su grado de inmunogenicidad dependerá de su grado de alteridad, que por lo general está ligada al grado de distancia filogenética entre dos especies.⁶

Tamaño molecular: esta correlacionado al grado de inmunogenicidad que presente, esto es, los inmunógenos mas activos poseen casi siempre una masa

molecular de 100 000 Daltones o más. Por lo general las sustancias de 5 000 a 10 000 Da. Son malos inmunógenos.

Composición y complejidad química: el tamaño y la alteridad por si mismos no son suficientes para que una molécula sea inmunógena, se requiere otras dos propiedades que son, la complejidad y composición del antígeno. Es decir los polímeros compuestos de un aminoácido o un azúcar simple carecen de inmunogenicidad sin importar cual sea su tamaño, sin embargo un polímero compuesto de diferentes aminoácidos y azúcares tiende a ser mucho mas inmunogénicas.

Cuando los antígenos son complejos o de estructura muy grande los linfocitos T y B no los reconocen por completo, en cambio reconocen fragmentos muy pequeños denominados determinantes antigénicos o epítopos. Estos son regiones activas, inmunológicamente, dentro del antígeno. Aunque las células B pueden reconocer un epítipo aislado las células T, únicamente identifican un epítipo cuando se relaciona con una molécula de MHC ya sea una célula presentadora de antígeno o una célula alterada.

La inmunidad humoral producida por linfocitos B reconoce solo epítopos externos por el contrario los linfocitos T reconocen epítopos proteínicos que se muestran junto con las moléculas del MHC en células propias, incluidas las células tumorales e infectadas por virus.⁶

b) Células presentadoras de antígeno, linfocitos y procesamiento de antígeno.

Puesto que todas las células que expresan moléculas de MHC clase I y clase II pueden presentar péptidos a las células T, en sentido estricto todas deberían denominarse células presentadoras de antígeno. Sin embargo, por convención las células que muestran péptidos relacionados con moléculas de MHC clase II a las células T_h CD4 se conocen como células presentadoras de antígeno o APC.

Tres tipos de células se clasifican como células presentadoras de antígeno profesionales: dendríticas, macrófagos y células B.

Estas células se distinguen por dos propiedades:

- Expresan moléculas de MHC II en sus membranas.

- Son capaces de llevar una señal coestimuladora que es necesaria para la activación de un linfocito T_H.⁷

El mecanismo por el cual las células presentadoras de antígeno procesan los antígenos es por fagocitosis después muestran una parte de dicho antígeno en su membrana unido a una molécula de MHC II. La célula T_H reconoce el complejo antígeno. MHC II en la membrana de la célula presentadora de antígeno e interactúa con él. En seguida se emite una señal coestimuladora adicional por la célula presentadora de antígeno, que conduce a la activación de él linfocito T_H.

Células dendríticas: este tipo de células son presentadoras profesionales de antígeno, lo que quiere decir que su función principal es procesar y presentar antígenos, dentro de las células dendríticas existen dos tipos de células las interdigitantes y las foliculares, la diferencia entre estas además de su morfología es que la células dendríticas interdigitantes se localizan principalmente debajo de la dermis y las células dendríticas foliculares solo en la zona folicular de los nódulos linfáticos.

Otro tipo de célula presentadora de antígeno son los linfocitos los cuales circulan en la sangre y sistema linfático, estos se producen en la medula ósea por el proceso de hematopoyesis, y residen en diversos órganos linfoides. Debido a que producen y muestran receptores de superficie celular llamados TCR que unen antígeno, los linfocitos median los atributos inmunológicos definidores de especificidad, diversidad, memoria y auto reconocimiento. Dentro de las células llamadas linfocitos existen varios tipos y subtipos, pero para fines de la tesis se usara la clasificación de linfocitos T y B.⁷

Linfocitos B: una vez que han madurado dentro de la medula ósea, los linfocitos B la abandonan y cada linfocito expresa un receptor de unión de antígeno BCR único en su membrana, que es un anticuerpo unido a la membrana de la célula. Cuando un linfocito B virgen o que nunca ha estado en contacto con un antígeno, halla por primera vez el antígeno que corresponde a su anticuerpo unido a la membrana, la unión del antígeno al anticuerpo da lugar a que la célula se divida y

su progenie se diferencie en linfocitos B de memoria y linfocitos B efectores o células plasmáticas.

Las células B de memoria tienen un periodo de vida más prolongado que las células B vírgenes y expresan el mismo tipo de receptor en membrana que la célula B original. Por el contrario las células B efectoras o plasmáticas casi no tienen unido a su membrana anticuerpo al contrario de esto lo producen en forma que puedan secretarlo, estas moléculas efectoras constituyen la mayor parte de la inmunidad de tipo humoral.

Linfocitos T: al igual que los linfocitos B los linfocitos T también se generan en la médula ósea pero a diferencia de las células B estos migran a la glándula timo para madurar. Durante su maduración en el timo los linfocitos T expresan en su membrana una molécula de unión de antígeno, la cual se llama receptor de la célula T. Al contrario de los anticuerpos unidos a la membrana en las células B, que pueden reconocer antígenos aislados. Los receptores de la célula T únicamente pueden identificar antígenos unidos a proteínas de membrana celular llamadas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad o MHC.⁷

c) Complejo Principal de Histocompatibilidad.

El complejo principal de histocompatibilidad es un conjunto de genes dispuestos dentro de una tira larga de DNA ubicadas en el cromosoma 17 en ratones.

Estos genes codifican para glucoproteínas unidas a la membrana de diferentes tipos de células y funcionan como moléculas presentadoras de antígeno muy especializadas que forman complejos con péptidos antigénicos.

Existen dos tipos principales de MHC el MHC I y MHC II.⁶

d) Interacción MHC-APC.

Cuando un linfocito T no sensibilizado encuentra un antígeno combinado con una molécula de MHC en una célula, la célula T prolifera y se diferencia en célula T de memoria y varias células T efectoras. Dentro de los linfocitos T existen dos subpoblaciones de linfocitos: los linfocitos T colaboradores (T_h) y los linfocitos T citotóxicos (T_c). Las células T colaboradoras y citotóxicas pueden diferenciarse entre sí por el tipo de receptor glicoproteínico que presenten en su membrana. Las células T_h suelen presentar en su membrana la glicoproteína llamada CD4 mientras que los linfocitos T_c presentan la glicoproteína de tipo CD8. Una vez que la célula T_h reconoce un complejo de antígeno-MHC II e interactúa con él, se activa la célula y se convierte en una célula efectora que secreta varios tipos de factores de comunicación y diferenciación celular llamadas citocinas. Las citocinas secretadas tienen una función importante en la activación de células B, células T_c , macrófagos y varios tipos celulares que intervienen en la reacción inmunitaria.⁶

Bajo la influencia de las citocinas secretadas por los linfocitos T_h los linfocitos T_c , que reconocen un antígeno-MHC I prolifera y se diferencia hacia una célula efectora llamada linfocito T citotóxico CTL.

e) Procesamiento y presentación de antígenos y generación de respuesta inmune de tipo humoral.

Para procesar los antígenos que se mostrarán en el MHC clase I y II se utilizan dos vías de procesamiento, dependiendo de la procedencia del antígeno, para eliminar los antígenos intracelulares se utiliza la vía citosólica y se presenta en las membranas de células con MHC clase I, para los antígenos exógenos se utiliza la vía endocítica y se presenta en la membrana con receptores del tipo MHC II.

Una vez que los antígenos exógenos son fagocitados por macrófagos y células dendríticas, se degradan en péptidos dentro de compartimientos de las vías endocíticas de procesamiento. Este proceso requiere entre 1 a 3 horas en varios compartimientos llamados lisosomas para ser presentado finalmente en la superficie celular en forma de complejo péptido-MHC II.⁶

2.4.- Adyuvantes.

Los adyuvantes son compuestos que pueden aumentar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno y provocar una mayor respuesta inmune de larga duración. Durante los últimos 80 años los adyuvantes se han utilizado en estudios experimentales, pero debido a varias

deficiencias de la mayoría de estos compuestos, los adyuvantes de aluminio son los que se usan en la clínica habitual.⁸

El desarrollo de los adyuvantes, desde su introducción inicial se ha basado tanto en la observación empírica, hasta la aplicación de un diseño experimental basado en el análisis del sistema inmune. Esto ha llevado a la necesidad de la identificación de criterios racionales para la selección de formulaciones basadas en principios sólidos de seguridad inmunológica de las vacunas para uso humano y veterinario. Aunque muchos de los mecanismos de adyuvantes se han dilucidado, comparaciones significativas entre los diferentes adyuvantes a menudo no son predictivos de la seguridad, los efectos de los adyuvantes, o eficacia de la vacuna.⁸

Actualmente se ha creado un compendio que muestra ejemplos de más de 75 adyuvantes disponibles al cual se puede tener acceso vía electrónica.⁹

Entre las ventajas que podemos encontrar en el uso de adyuvantes están las siguientes:

- potenciar la inmunogenicidad de antígenos.
- reducción de la cantidad de antígeno y del número de reinmunizaciones requeridas para proveer una inmunidad protectora.
- permitir el uso de vacunas dirigidas a incrementar la respuesta inmune a nivel de mucosas.

a) Clasificación de adyuvantes

La clasificación de los adyuvantes ha sido obstaculizada debido a la diversidad de adyuvantes, su diferente actividad biológica o por la similitud en su mecanismo de acción, sin embargo se les puede clasificar de acuerdo a su fuente de origen, mecanismos de acción y propiedades físicoquímicas¹⁰

- **Su origen:**

Mineral

Emulsiones oleosas

Bacterianos

Vegetales

Polímeros sintéticos

Citocinas y vitaminas

- **Su mecanismo de acción:**

Inflamatorios

Retardadores

Co-estimuladores.

Los adyuvantes inflamatorios promueven una reacción inflamatoria en el sitio de aplicación del biológico. Esto favorecerá que el inmunógeno sea captado por células dendríticas o macrófagos y así ser presentado a los linfocitos.

Los adyuvantes retardadores, promueven una liberación lenta del inmunógeno para favorecer una respuesta de larga duración. Los adyuvantes retardadores pueden formar un granuloma en el sitio de aplicación.

Los adyuvantes co-estimuladores son los que pueden modificar la actividad de los linfocitos para favorecer un determinado tipo de respuesta inmunitaria. Los adyuvantes co-estimuladores pueden estar combinados con el inmunógeno o ser aplicados paralelamente. Como ejemplo tenemos a las citocinas como el la interleucina 2 (IL-2) o el interferón γ (IFN γ), los cuales promoverán la activación del sistema inmunitario o de la fagocitosis respectivamente. Otro inmunomodulador es la vitamina D3, la cual promueve la síntesis de

Otra clasificación de acuerdo a su mecanismo de acción es la siguiente:

- **Adyuvantes tipo A**

La mayoría de los adyuvantes tipos A desarrollados recientemente tienen un mecanismo de acción específico, por ejemplo, monofosforil lípido A (MPL), el cual actúa por la activación de APC y la activación de la secreción de citocinas como la IL-12.

- **Adyuvantes tipo B**

Este tipo de adyuvantes interactúan con las células presentadoras de antígeno APC de manera inespecífica y su principal efecto es crear un depósito en el sitio de inoculación y amplificar la señal.

Este tipo de adyuvantes son los que tienen un mayor uso en la clínica y preparación de vacunas actualmente, por ejemplo el hidróxido de aluminio.

- **Adyuvantes tipo C**

Por último los adyuvantes tipos C. Su modo de funcionamiento se basa en una mejora de las señales mediante la interacción con las moléculas co-estimuladoras secretadas por las APC. No ha habido esfuerzos para introducir el tipo C adyuvantes en la práctica clínica. Un ejemplo conocido es el TGN1412, un superagonista anti-CD28 con anticuerpos monoclonales que estimula directamente las células T, previsto originalmente para el tratamiento de Leucemia linfocítica crónica y la artritis reumatoide, que se aplicó a 6 pacientes inscritos en fase clínica del estudio. Poco después de la aplicación a todos los pacientes necesitan atención intensiva debido a un choque cardiovascular y el síndrome de dificultad respiratoria aguda causada por la liberación excesiva de citocinas.

b) Vía de inoculación de los adyuvantes.

La aplicación intraperitoneal, intramuscular, intradermal, subcutánea ó en la mucosa oral dependerá de la característica de la vacuna, el antígeno usado y del adyuvante. Mientras que, la aplicación intraperitoneal y la vía subcutánea causa la producción de IgM, IgG y / o anticuerpos IgE. La ruta de la mucosa (por ejemplo,

intranasal u oral) es preferentemente utilizada para obtener anticuerpos IgA. Aunque actualmente la vía intramuscular es la más utilizada, algunos tipos de vacunas responderían mejor a la aplicación intradérmica.

c) Adyuvantes compuestos por aluminio.

Los adyuvantes compuestos por aluminio son los más usados en la industria farmacéutica actual ya sea en forma de hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, fosfato de aluminio $\text{Al}(\text{PO})_4$ y alumbre ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Como adyuvante en la formulación de diversas vacunas está regulado por The US Food and Drug Administration, la cual limita la cantidad de aluminio en productos biológicos, como las vacunas, la cual tiene un rango de 0,85 a 0.125 mg / dosis.

d) Propiedades físico-químicas del hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y alumbre.

El hidróxido de aluminio es una sal cristalina que está cargada positivamente tiene un punto isoeléctrico igual a 11. El fosfato de aluminio es un hidroxifosfato de aluminio amorfo que tiene carga negativa a pH fisiológico. El alumbre es un hidróxido de aluminio que contiene algunos aniones sulfato y aniones que se utilizan en el búfer, a menudo fosfato. Dos métodos han sido utilizados comúnmente para preparar vacunas con adyuvante de aluminio. Un método implica la adición de una solución de alumbre a un antígeno para crear un

precipitado de aluminato de proteínas, estos productos se denominan vacunas alumbre precipitado. El segundo método consiste en la adición de un antígeno al hidróxido de aluminio pre-formado o fosfato de aluminio.¹¹

e) Mecanismos de acción del hidróxido de aluminio.

Debido a que los adyuvantes que contienen aluminio son los únicos aprobados para el uso humano, se ha dedicado una enorme cantidad de estudios para poder determinar y esclarecer su mecanismo de acción, a pesar de esto no se ha determinado el mecanismo exacto por el cual establecen y potencian el efecto inmunogenico de las vacunas. Sin embargo se ha llegado a la conclusión de que los siguientes puntos intervienen en su mecanismo de acción:¹²

- Formación de un depósito con el antígeno en el tejido o sitio de inoculación, para prolongar su presentación.
- Facilita la presentación y estimulación de APCs
- Activación del complemento y estimulación de macrófagos y linfocitos.

- **Efecto de depósito**

La formación de un depósito en el sitio de administración que libera lentamente cantidades de antígeno durante un lapso prolongado de tiempo, ha sido considerada como el principal mecanismo por el que el hidróxido de aluminio estimula la respuesta inmune. Después de su inoculación toma alrededor de tres días después de la administración para que lleguen nuevamente más células

mononucleares. La retención del antígeno por este periodo de tiempo, debería facilitar la captación y presentación del antígeno. Los antígenos pueden ser retenidos en el sitio de inyección inclusive siendo adsorbidos de nuevo por el adyuvante o quedando atrapados en los espacios disponibles de los agregados del adyuvante. Los antígenos que son adsorbidos por cambio de ligando, probablemente continúen estando adsorbidos después de la administración, mientras que los antígenos que se adsorbieron mediante fuerzas electrostáticas son diluidos rápidamente una vez que entraron en contacto con el líquido intersticial. No obstante, algunos antígenos que se liberaron pueden volver a quedar atrapados dentro de los agregados formados por las moléculas del adyuvante y permanecer en el sitio de administración. Se ha especulado que los antígenos que quedaron atrapados en los sitios disponibles de los agregados, retrasan la difusión del antígeno desde el sitio de administración, para permitir la captación de los antígenos por medio de la entrada de las APCs.

- **Estimulación de APCs.**

Las vacunas se administran comúnmente por inyección dentro del músculo esquelético o tejido subcutáneo. Aunque la iniciación de la respuesta inmune ocurre en los nódulos linfáticos, los cuales podrían estar separados por una distancia considerable del sitio de administración, es probable que el efecto que tienen los adyuvantes derivados de aluminio en las células y tejidos cercanos al

sitio de inyección sea crítico para la estimulación de la respuesta inmune. La proporción de antígeno adsorbido dentro de los geles de hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, que se difunde por medio de los fluidos intersticial y linfático a los nódulos linfáticos depende en la capacidad de adsorción del adyuvante empleado.

Las células dendríticas también juegan un papel importante durante el transporte del antígeno a los nódulos linfáticos así como en la activación y presentación del antígeno ante las células T no activadas antígenas específicas. Las células dendríticas inmaduras son altamente eficientes en capturar y captar antígenos a sus receptores, mediante fagocitosis. Una vez que las células dendríticas captan al antígeno en presencia de señales estimuladoras, las células dendríticas migran a los nódulos linfáticos a través de los vasos linfáticos aferentes. Durante su migración, las células procesan el antígeno para poder madurar finalmente, y con ello presentar eficientemente los péptidos antigénicos a las células T, activándolas mediante señales coestimuladoras, dirigiendo así la apropiada diferenciación de las células T efectoras. Los adyuvantes derivados de aluminio facilitan la habilidad de las células dendríticas para activar a las células T CD4+, por lo que este tipo de adyuvantes no solo facilitan la captación del antígeno, sino que también ayudan a la eficiencia de la presentación del mismo con el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras. ⁽⁶⁾

Debido a la eficiente activación de las células dendríticas por moléculas microbianas vía Receptores Toll (TLRs), es muy probable que la mayoría de los

productos microbianos actúen como potentes adyuvantes. Probablemente, los adyuvantes derivados de aluminio no actúen vía TLR, debido a que el hidróxido de aluminio fue un adyuvante efectivo en ratones que carecían de MyD-88, una molécula que facilita el señalamiento del mecanismo de activación para TLR¹⁶, también cabe señalar que la naturaleza de sal mineral que presenta el hidróxido de aluminio es otro factor que lo inhabilita para desencadenar una respuesta inmune a través de TLRs. No obstante, se ha demostrado que los monocitos que circulaban por el torrente sanguíneo de los humanos que fueron administrados con toxoide tetánico adsorbido en hidróxido de aluminio, indujeron mucho mejor la proliferación de las células T, que los monocitos activados con toxoide tetánico en solución. ⁽⁷⁾ Lo que correlaciona con un incremento en la captación del toxoide tetánico que fue adsorbido en el hidróxido de aluminio y la inducción de secreción de IL-1. Las partículas del gel de hidróxido de aluminio son <10 µm de diámetro y por ende pueden ser más eficientemente captadas por medio de fagocitosis que los antígenos en solución. El hidróxido de aluminio incrementa la expresión del MHC II y cierta cantidad de moléculas coestimuladoras de monocitos que se encuentran dentro del torrente sanguíneo, acompañado por un incremento en mRNA que expresa para IL-4 y un incremento de IL-1, TNF e IL-6. La mayoría de estos monocitos se diferenciaron en células dendríticas, como lo indicó su morfología y el incremento en la expresión de CD83, un marcador de células dendríticas maduras. La neutralización de IL-4 y la reducción de los linfocitos T CD4+ abolieron el incremento de MHC II en las células monocíticas, lo que sugiere

que el efecto del hidróxido de aluminio en estas células fue indirecto. Los adyuvantes derivados del hidróxido de aluminio también pueden activar a las células presentadoras de antígenos de forma indirecta, debido a que al administrar este adyuvante de forma intramuscular causa daño en el tejido y necrosis de algunas fibras de músculo esquelético, la necrosis celular libera mediadores que ayudan a activar a las células dendríticas.¹²

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

La activación del sistema inmune puede dirigirse hacia dos tipos de respuestas. La respuesta inmune celular que se caracteriza por la expresión de IFN- γ ; la respuesta inmune humoral que es una respuesta mediada principalmente por anticuerpos, caracterizada por la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13. Se sabe que los adyuvantes ejercen una fuerte influencia en el tipo de respuesta inmune que se sigue en un esquema de vacunación, por lo tanto el hidróxido de aluminio estimula selectivamente la respuesta inmune de tipo II.

Ya se ha mencionado que las células dendríticas son las que transportan al antígeno desde el sitio de vacunación al sitio en donde se encuentran los nódulos linfáticos en donde finalmente presentarán su antígeno ante las células T. Las células dendríticas aparecen para facilitar el transporte del antígeno desde el punto de inyección a las células T de los nódulos linfáticos e instruir a las células T

cooperadoras CD4+ para que se diferencien en células efectoras TH1 (que se caracterizan por la secreción de IFN- γ) o TH2 (que secretan IL-4 e IL-5). La IL-12 juega un papel importante en la estimulación de la diferenciación de las células TH1 e induce la expresión de IFN- γ por medio de las células T y las células NK, y es secretada principalmente por células dendríticas y macrófagos. Las células dendríticas que maduraron bajo la presencia de la IL-12 estimularon pobremente la diferenciación de las células T CD4+ hacia células TH1. En ausencia de IL-12, las células dendríticas pueden inducir la diferenciación de las células TH2. La IL-4 promueve la respuesta inmune de tipo 2 e inhibe a la respuesta inmune de tipo 1. La delección funcional del gen que expresa para IL-4 no interfirió con el efecto adyuvante del hidróxido de aluminio y no afectó la diferenciación de las células TH2 al continuar la secreción de IL-5. Sin embargo, en ausencia de IL-4, el hidróxido de aluminio induce anticuerpos IgG2a específicos para antígenos y la secreción de IFN- γ por medio de células T lo que señaló la iniciación de una clásica respuesta inmune de tipo 1. Es por eso que se considera a la IL-4 indispensable para que el efecto del adyuvante induzca el inicio de la respuesta inmune de tipo 2. Lo que concuerda con la observación de que la IL-4 suprime la secreción de la IL-12 por las células dendríticas.¹³

II.- Antecedentes.

2.1- Antecedentes del desarrollo de vacunas anti-morfina.

La idea de poder crear una vacuna que inhibiera selectivamente los efectos de los opiáceos fue propuesta por Bonese y colaboradores en 1989²⁷. En esta publicación se demostró que la respuesta mantenida por este opioide fue selectivamente abolida después de la inmunización activa con la vacuna conjugada morfina-6-hemissucinil-BSA (M-6-H-BSA), mismo que se administro en monos Rhesus entrenados para auto administrarse heroína. Se han realizado numerosas investigaciones en cuanto a vacunas anti morfina, sin embargo en todos estos nuevos modelos se ha utilizado como acarreador BSA o KLH proteínas que no se encuentran aprobadas por la FDA para su uso humano, hasta el año de 2006 se publicó un artículo de investigación en donde se exponían los ensayos y estudios realizados por el equipo de trabajo del Dr. Anton y colaboradores en donde se propone la validación a nivel pre-clínico de un nuevo modelo estructural para la vacuna anti heroína diseñada para uso clínico en seres humanos.²⁸

2.2.- Diseño y funcionalidad. M-TT.

El diseño y síntesis de un nuevo modelo de vacuna anti morfina se desarrolló en el Instituto Nacional de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente” y esta está compuesta por el Toxoide Tetánico como proteína acarreadora, la cual se une de

manera covalente a la morfina dando lugar así a la vacuna denominada M-TT (Morfina-Toxoide Tetánico)

En la vacuna M-TT, la morfina se ha haptenido de forma covalente a los grupos ϵ -amino que quedaron libres del lado de la cadena de residuos de lisina de la proteína acarreadora (toxoides tetánico (TT)), la cual es una proteína altamente inmunogénica, usando un brazo espaciador de una longitud aproximada de 20.15 amstrongs. Se ha demostrado que la longitud del brazo espaciador y la manera en que este es colocado entre la proteína acarreadora y la molécula de morfina, separa lo suficientemente entre sí a estas dos sustancias, y las orienta en el espacio de forma tal que al final, el brazo espaciador es el que ayuda a que el conjugado de la vacuna de M-TT sea altamente inmunogénico.²⁸ Dicho brazo espaciador es del doble del tamaño del que comúnmente se utiliza en otros conjugados de morfina-6-hemisuccinil-BSA que son covalentemente haptinados al grupo hidroxilo de la posición 6, a través de dos uniones amida.

El brazo espaciador está formado por una cadena alifática de átomos de carbono de baja complejidad estructural, lo que reduce su papel como un determinante inmunogénico cuando la morfina haptinada a él es expuesta a las células del sistema inmune.²⁷

2.3.- Efectos terapéuticos de la vacuna M-TT.

Aunque la vacuna M-TT representa un atractivo candidato para ser usado en pruebas clínicas de fase I para evaluar su seguridad e inmunogenicidad como

posible medicamento contra la adicción a la heroína y/o morfina, se deberían de realizar estudios dirigidos a evaluar los posibles efectos tóxicos que dicha vacuna pudiera llegar a tener en animales experimentales. Sin embargo, se debería implementar un programa de ensayos clínicos con el fin de evaluar la eficacia y la seguridad inmunogénica de la vacuna de M-TT en pacientes que voluntariamente desearan ser expuestos a estos tipos de pruebas.

Debido a que los anticuerpos generados después de la inmunización con la vacuna M-TT no pueden cruzar la barrera hematoencefálica, se esperaría que los efectos de la morfina o heroína no se presentaran. Es por eso que el uso de la vacuna M-TT pudiera servir como una alternativa dentro de la gama de tratamientos relacionados con la adicción y el prolongado síndrome abstinencia a opioides.

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

Este tipo terapia alternativa para el tratamiento de la adicción a la heroína representaría un avance, en países donde la prescripción médica y la autorización

Determinación de la capacidad inmunogénica en el modelo de vacuna M-TT a concentraciones variables de alúmina, en ratones de la cepa BALB/c.

de los agentes farmacológicos como la metadona y la buprenorfina/naloxona aún no estuvieran disponibles o estuvieran en regulación estricta.²⁷

III.- Planteamiento del problema y justificación.

3.1.- Adicción a los opiáceos.

La adicción es un trastorno neuropsiquiátrico, que se define como el uso compulsivo de drogas a pesar de las consecuencias negativas que puedan generar.¹⁴ Gran parte de las personas con este tipo de trastornos, lo desarrollan por factores tanto genéticos como ambientales.^{15,16} La mayor parte de la información recabada así como la comprensión de la adicción a las drogas y el estudio del comportamiento de recaída crónico, se basa en las investigaciones neurobiológicas tanto de la motivación y elección de recompensas biológicas como la comida y el sexo.¹⁷

Los cambios de neuroplasticidad que se generan en respuesta a la adaptación del comportamiento motivacional y recompensas, han llevado a una comprensión de los mecanismos moleculares y celulares inducidos por la adicción a las drogas. Estos cambios han llevado a los investigadores a postular que:

“La adicción representa una usurpación patológica de los mecanismos neurales de aprendizaje y memoria que en circunstancias normales sirven para dar forma a los comportamientos de supervivencia relacionados con la búsqueda de recompensas y las señales que ellos predicen”¹⁴

Se sabe que el comportamiento de recompensa, depende del sistema dopamino mesocorticolímbica (DA) que comprenden neuronas en el área ventral tegmental

(VTA) y sus proyecciones para el núcleo accumbens (NAC), la amígdala, la corteza prefrontal (PFCx) y el procencefalo.

Las drogas usadas son estructuralmente diferentes así como también producen diferentes efectos en el comportamiento de los usuarios. Sin embargo la mayoría comparten la característica que pueden interactuar, modular o alterar con el tiempo el sistema de recompensa en el cerebro (VTA-NAC-PFCx).¹⁷

Se sabe que el abuso de drogas como la nicotina, el alcohol, la cocaína y la heroína modulan el sistema de recompensa del cerebro ya sea por influencia directa en el sistema (DA) o mediante la alteración de los distintos sistemas neurales que operan dentro y que ejercen alguna influencia sobre el sistema dopaminérgico mesolímbico.^{18,19} El abuso crónico de la morfina y la heroína conduce al desarrollo a largo plazo de cambios a nivel celular y molecular en donde finalmente producen la expresión de neuroadaptaciones a la adicción a opiáceos.²⁰

3.2.- Problemática actual del uso de opiáceos.

Actualmente el uso ilícito de los opiáceos se ha incrementado sobre todo en países de Europa y los Estados Unidos, con consecuencias negativas como incremento de la delincuencia y alta tasa de mortalidad en adictos a estas sustancias.²¹ Este incremento en la mortalidad se debe a que los usuarios de heroína generan rápidamente tolerancia, incrementando la dosis diaria que va de

5 a 20 mg en usuarios de primera vez a 4 veces diarias por lo que se sobrepasa la tolerancia y sobreviene la sobredosis.²²

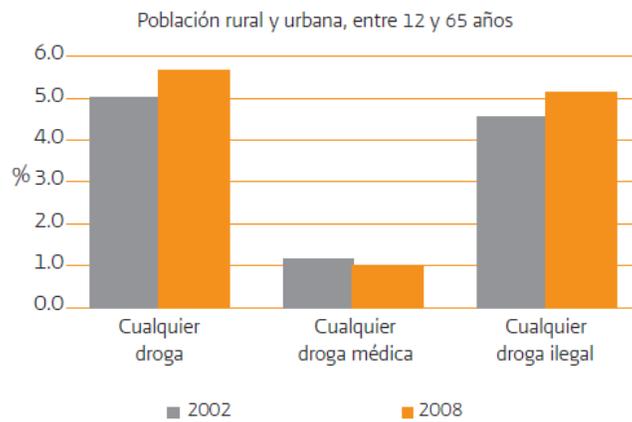
Dentro de los narcóticos el que ha tenido un índice de incremento en su uso es la heroína debido a su amplia disponibilidad en los mercados ilícitos así como su rápido inicio de los efectos. De acuerdo a estadísticas recientes existen entre 2 y 4 millones de consumidores de heroína en Europa y Norteamérica. De 1 a 2 por % de esta población muere prematuramente y contribuye al aumento en la incidencia de enfermedades como hepatitis C y VIH. Además de producir una carga económica y social por su participación delictiva o en terapias para su rehabilitación.^{23,24}

Actualmente el cultivo de amapola con fines médicos se ha incrementado, con la consiguiente producción de amapola para el mercado negro y que a través de la refinación del opio se obtuvieron en el 2006 aproximadamente 6500 toneladas en países asiáticos.²⁵

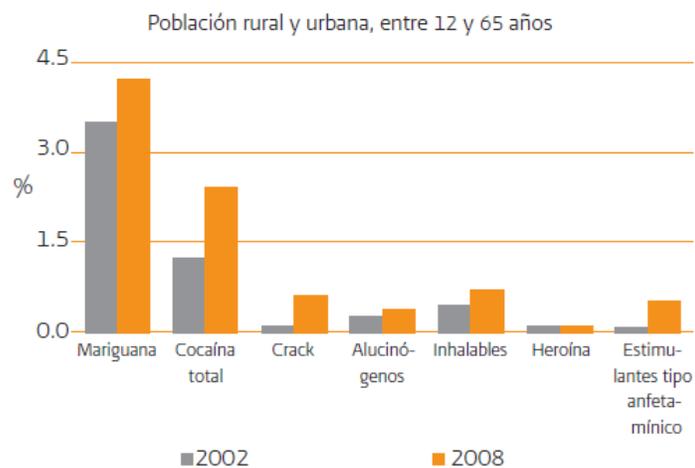
- **Situación actual en México.**

La encuesta nacional de adicciones 2008 indica que el consumo de drogas médicas e ilegales en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años de edad ha aumentado de un 5% a un 5.7% en el periodo 2002-2008. Las drogas ilegales aumentaron de 4.6 a 5.2%, mientras que el consumo de drogas exclusivamente médicas se mantuvo.

Encuestas Nacionales de Adicciones.
Tendencias 2002-2008. México, ENA 2008



En la siguiente gráfica se observa el porcentaje de consumo por droga específica en la población de entre 12 a 65 años. En donde se observa que no hay un incremento significativo del uso de la heroína.



A pesar de esto se ha generado la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la adicción específicamente de los opiáceos, específicamente de la morfina-heroina. Por tal motivo se planteó la posibilidad de establecer una vacuna anti-morfina que en sus propiedades estuvieran el inhibir la permeación de la morfina-heroina a través de la barrera hemato-encefálica con lo cual no se presentarían los efectos en el sistema nervioso central de los usuarios.²⁶

La inmunogenicidad de dicha vacuna se verá incrementada por el uso de algún adyuvante por lo que en dicha investigación se pretende establecer la concentración del hidróxido de aluminio o alúmina que genere la mejor respuesta inmunogénica en el modelo experimental, dicho adyuvante se ha elegido por ser un adyuvante aprobado por la FDA para su uso en vacunas para uso humano y veterinario.

IV.- Hipótesis.

La inoculación del modelo de vacuna M-TT, a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 40 mg/ml de alúmina en ratones macho BALB/c generará una respuesta inmunogénica que permitirá establecer la concentración ideal de hidróxido de aluminio como adyuvante.

V.-Objetivo.

Determinar la concentración óptima del adyuvante hidróxido de aluminio, en el modelo de vacuna M-TT, que genere la mejor respuesta inmunogénica. Dicha respuesta será evaluada por medio de ensayos de ELISA los cuales generaran un resultado medible en DO que serán transformados a títulos de anticuerpos por medio del programa estadístico Origin®.

VI.- Material y métodos.

Los procedimientos experimentales fueron realizados en el laboratorio de adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría “Juan Ramón de la Fuente”, en el cual fue realizada la síntesis de la vacuna M-TT (morfina heroína- toxoide tetánico) dicha vacuna se preparo en forma de liofilizado y se conservo a temperatura de refrigeración entre 4 y 6 °c. Posteriormente se procedió a determinar su potencia inmunogénica mediante una serie de ensayos de ELISA de tipo indirecto, en 5 grupos de ocho ratones BALB/c macho con un peso de 15 a 18 gramos los cuales fueron inmunizados en 5 ocasiones con dosis de 100 mg de M-TT, empleando como adyuvante hidróxido de aluminio, realizándose la colecta de muestras sanguíneas cada catorce días.

A partir de lo anterior se diseño un calendario de vacunación y obtención de muestras sanguíneas para su posterior centrifugación y obtención del suero.

6.1.- Modelo animal.

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/C macho, con un peso al inicio del experimento de 15-18 gr. Los ratones se colocaron en grupos de cuatro sujetos en caja de tipo abiertas con tapa de reja de alambre galvanizado y paredes de acrílico transparente en un cuarto con temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), a 40 a 50% de humedad bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12 (el encendido de la luz fue a las 7:00 AM), definiendo de esta manera que 2 cajas con 4 ratones cada una formaron un grupo y así se formaron 5 grupos: 1,5,10,20,40 mg de alúmina y un

grupo testigo al que se le administro solución salina fisiológica. Los animales tuvieron acceso continuo a alimento el cual cumple con los requerimientos nutrimentales de mantenimiento ⁽¹¹⁾ y agua potable excepto durante las sesiones experimentales, que tuvieron una duración no mayor a 15 minutos. Todos los experimentos fueron realizados durante la fase de luz del ciclo luz-oscuridad (entre las 9:00 AM y las 6:00 PM) en el bioterio de Instituto Nacional de Psiquiatría.

Cuadro 1. Esquema de inmunización y toma de muestras.

Día	Toma de muestra	Inmunización
1	X	
2		X
15	x	
16		X
30	x	
31		x
45	x	
46		x

60	X	
61		x
75	X	
76		x
90	x	
91		x

a) Protocolo de inmunización.

De acuerdo a este protocolo de inmunización, a cada ratón de cada grupo se le administró por vía subcutánea 0.1ml de la vacuna M-TT en su forma reconstituida, alternando los puntos de inoculación subcutánea con los diferentes lotes de vacuna empleada, se usaron lotes de 1, 5, 10, 20 y 40 miligramos de alúmina. La vacuna se encuentra liofilizada, y se mantuvo una temperatura de 0-4 °C, y para su correcta administración se reconstituyó hasta su uso con agua estéril, aplicándola vía subcutánea con una jeringa de insulina. Se realizó este proceso 5 veces cada 15 días a cada sujeto de investigación, alternando los puntos de inoculación y siguiendo el cuadro 1. Para los testigos se utilizó este mismo proceso, cambiando la administración de vacuna por solución salina fisiológica vía subcutánea.

b) Obtención de los sueros.

La obtención de los sueros se realizó cada 15 días empezando por la obtención del suero basal. La muestra de cada ratón se obtuvo por la vía de la vena facial, dicha técnica no requiere procedimiento quirúrgico ni el uso de anestesia y consiste en realizar una punción con lanceta directamente en la vena facial del ratón, de la cual se obtuvo 0,3 ml de sangre la que se refrigeró y se sometió a centrifugación al siguiente día a 4660 (g) para la obtención del suero, la centrifugación se realizó durante 6 minutos, obteniendo de 0.1 a 0.15 ml de suero, el cual se mantuvo a una temperatura de congelación equivalente a -70 C° .

6.2.-Monitoreo y cuantificación de los títulos séricos de anticuerpos contra morfina.

Para el monitoreo y cuantificación de los títulos séricos de anticuerpos se llevaron a cabo ensayos inmunoenzimáticos de tipo indirecto, más adelante se describe de manera detallada el procedimiento para la elaboración, revelado, lectura e interpretación del inmunoensayo. Los resultados de estos ensayos permitieron asegurar la concentración ideal de adyuvante.

6.3.-Análisis estadístico

ANDEVA 1 y 2 vías.

Prueba de Tukey.

6.4.-Protocolo general para ensayo de ELISA de tipo indirecto.

1) Fijación de la fase sólida (BSA-Mor) a los pozos de la placa para ensayo de ELISA. Se agrega la cantidad de 1µg de fase sólida a cada uno de los pozos de la placa de ELISA (100 µg), disuelta en un volumen de 10 mL, de una solución de PBS 0.1 M, pH=8.0 (100 µL de solución fase sólida/PBS por cada uno de los pozo de la micro placa).

2) Cantidades de reactivos a utilizar para preparar un volumen de 2.0 L de solución PBS:

- - Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4): 6.2 g
- - Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4): 21.8 g
- - Cloruro de sodio (NaCl): 18 g

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

4) Agregar 1 µg F. sólida / pozo. Para 100 pozos entonces se necesitan 100 µg de F. sólida.

- Dado que la fase solida proporcionada en el instituto viene alicuotada a diferentes volúmenes y concentraciones es necesario hacer un cálculo para encontrar la el volumen necesario que contenga 100 µg de fase solida, ejemplo:

$$[\text{BSA-Mor}] = 453 \mu\text{g} \text{ ----- } 450 \mu\text{L}$$

$$100 \mu\text{g} \text{ ----- } X = 99.3 \mu\text{L}$$

X= 99.3 μL será la cantidad de fase sólida a utilizar para de la alícuota dada, para obtener una concentración de 1 μg /pozo.

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

- - Esperar a que el tubo que contiene a la solución de fase sólida BSA-Mor. Se descongele y alcance la temperatura ambiente.
- - Una vez que la solución de fase sólida BSA-Mor ha alcanzado la temperatura ambiente, se lleva a un baño maría a 40°C para dejar en agitación moderada a dicha solución por un lapso de 15 a 30 min.
- -Todo esto, con el fin de asegurar que la fase sólida BSA-Mor. Se encuentre perfectamente en solución, y evitar la formación de grumos y agregados dentro del mismo tubo contenedor.

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

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

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

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

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

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

12) Incubación a temperatura ambiente y agitación para el bloqueo con Gelatina de Teleosteo al 1.0% de los sitios no activados, por 60 minutos.

13) Preparación del tren de dilución.

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

- 1er Ab: Para la dilución 1:100.

1-----100

X=5 μ L antisuero-----500 μ L dilución

(5 μ L antisuero + 495 μ L de Buffer de ELISA)

Para la dilución 1:1000.

Tomar 50 μ L de la dilución 1:100 + 450 μ L de Buffer de ELISA.

Para la dilución 1: 10, 000.

Tomar 50 μ L de la dilución 1:1000 + 450 μ L de Buffer de ELISA.

14) Al término del bloqueo de los sitios no activados, se retira exceso de Buffer de ELISA y se aplican 100 μ L de cada dilución de antisueros (tren de dilución) por duplicado.

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

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

17) Preparación del 2° Ab anti-ratón (ANTI-MOUSE IgG [whole molecule] Peroxidase Conjugate, Marca SIGMA).

1 placa 100 pozos, y 100 μ L / pozo, entonces necesitamos 10,000 μ L totales.

Dilución: 1 ----- 5000

X=2 mL Ab anti-ratón ----- 10, 000 mL

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

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

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

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

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

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

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

VII.-Resultados.

Una vez realizados los ensayos de ELISA y obtenidas las absorbancias de los siete sangrados correspondientes se transformaron dichas absorbancias en valores de títulos de anticuerpos por medio del programa Origin® y se realizó su graficación del primer al séptimo sangrado de los grupos 1mg, 5mg, 10 mg, 20mg y 40mg.

7.1.-Titulación de anticuerpos del primer al séptimo sangrado para los 7 grupos de variación de alúmina:

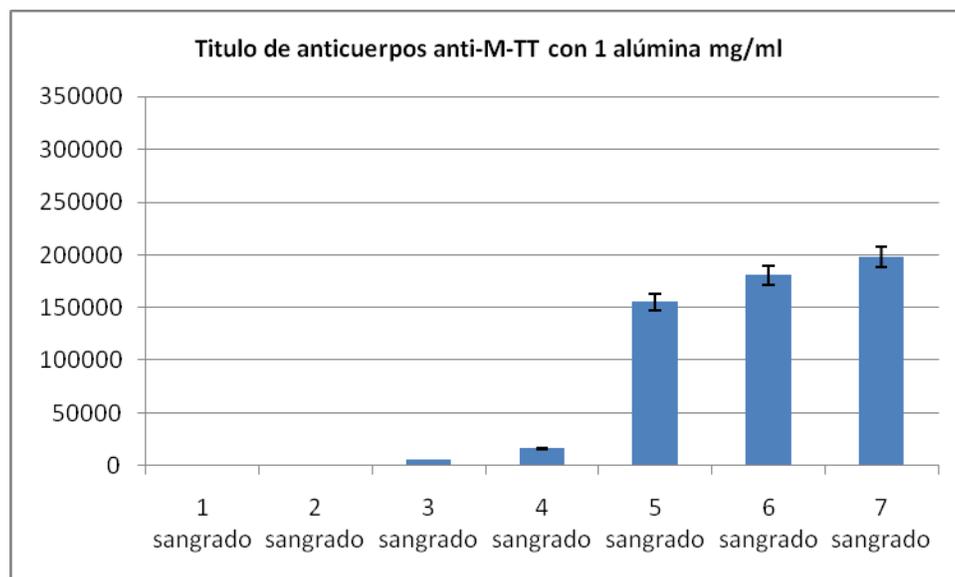


Figura 1. Graficas de los promedios aproximados de los títulos de Acs obtenidos desde el primer sangrado al séptimo sangrado, utilizando 8 ratones BALB/c machos y 1 mg/ml de alúmina como adyuvante en la vacuna M-TT.

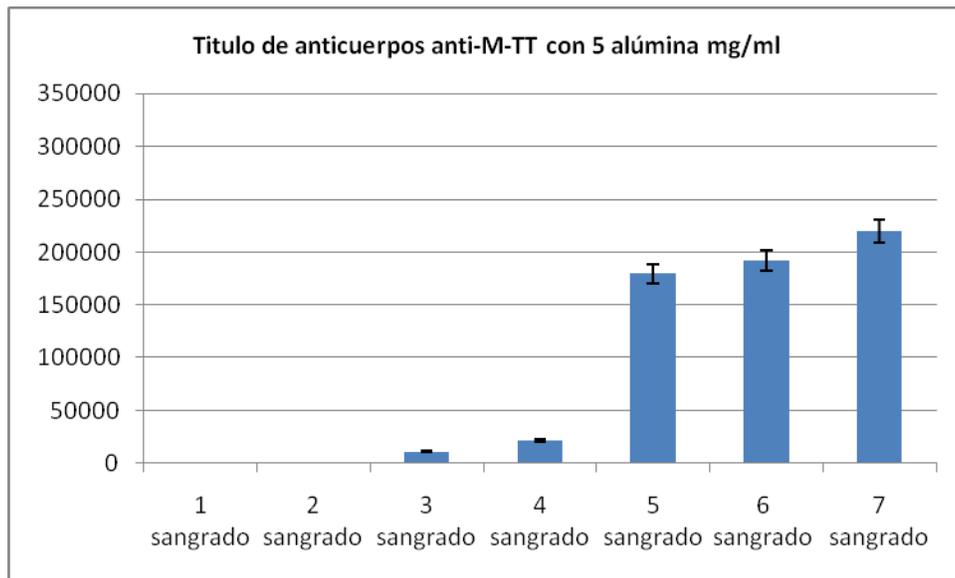


Figura 2. Graficas de los promedios aproximados de los títulos de Acs obtenidos desde el primer sangrado al séptimo sangrado, utilizando 8 ratones BALB/c machos y 5 mg de alúmina como adyuvante en la vacuna M-TT.

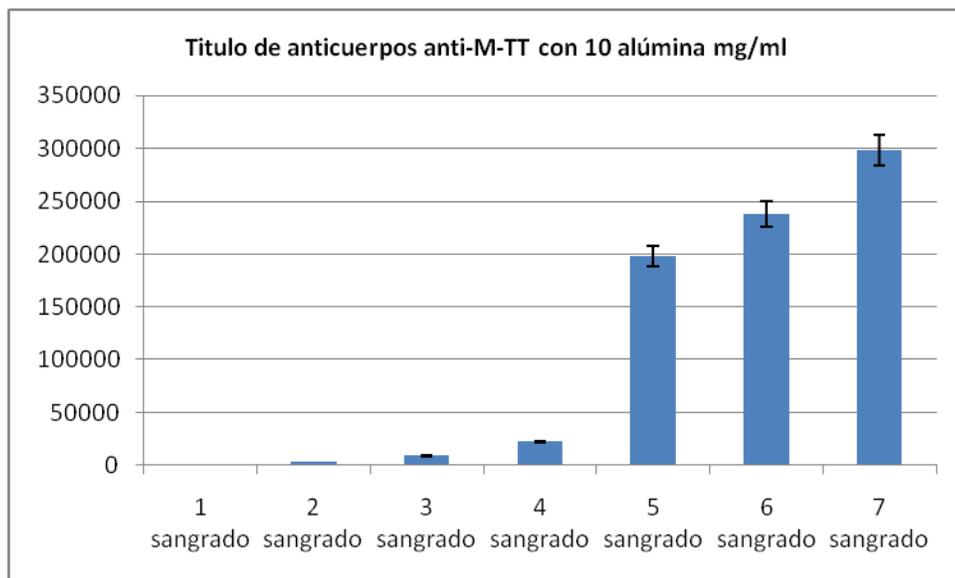


Figura 3. Graficas de los promedios aproximados de los títulos de Acs obtenidos desde el primer sangrado al séptimo sangrado, utilizando 8 ratones BALB/c machos y 10 mg de alúmina como adyuvante en la vacuna M-TT.

Determinación de la capacidad inmunogénica en el modelo de vacuna M-TT a concentraciones variables de alúmina, en ratones de la cepa BALB/c.

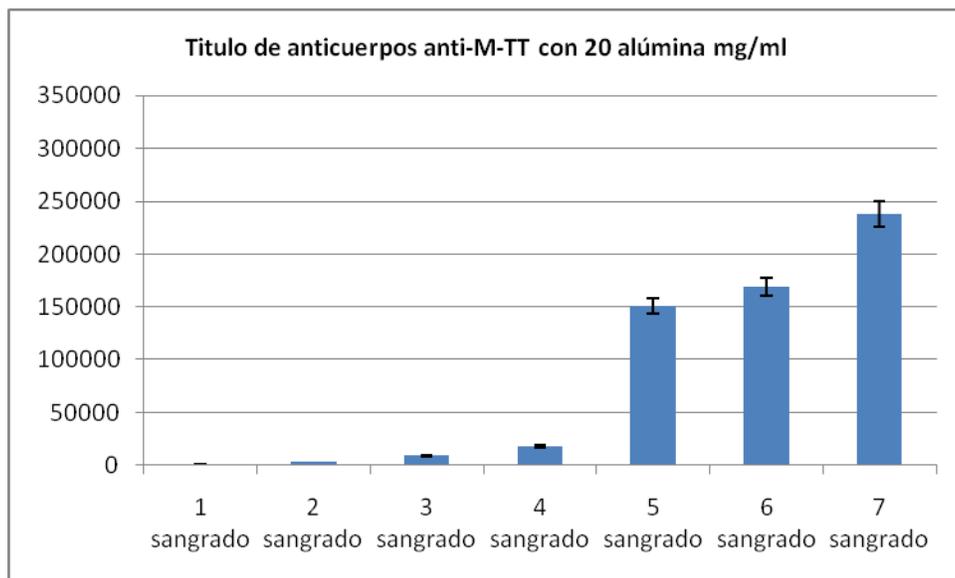


Figura 4. Graficas de los promedios aproximados de los títulos de Acs obtenidos desde el primer sangrado al séptimo sangrado, utilizando 8 ratones BALB/c machos y 20 mg de alúmina como adyuvante en la vacuna M-TT.

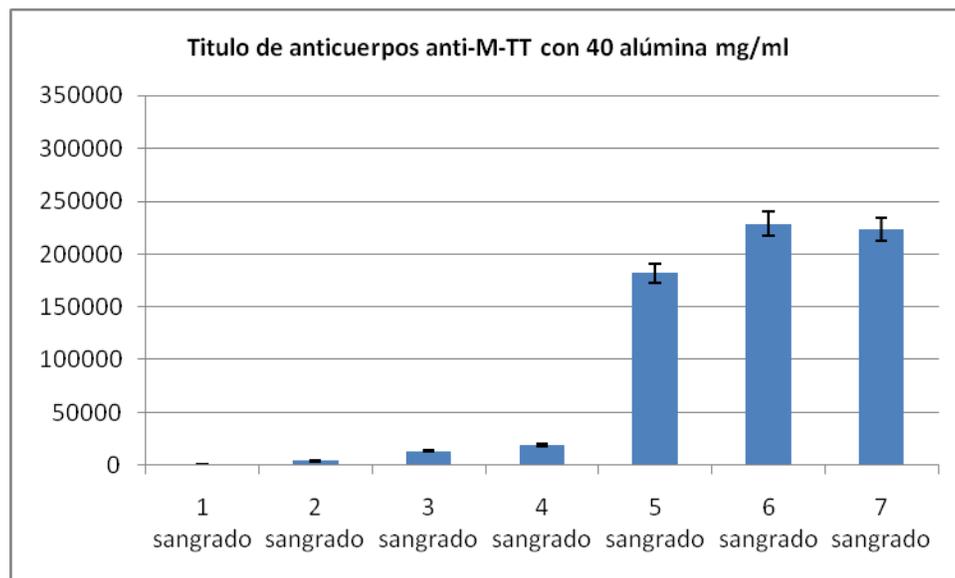


Figura 5. Graficas de los promedios aproximados de los títulos de Acs obtenidos desde el primer sangrado al séptimo sangrado, utilizando 8 ratones BALB/c machos y 40 mg de alúmina como adyuvante en la vacuna M-TT.

A pesar de que los diferentes grupos tuvieron concentraciones variables de alúmina, la tendencia de las graficas fue similar entre ellas, pudiéndose observar que desde el primero hasta el cuarto sangrado el aumento de los títulos de anticuerpos no fue significativo en los 5 grupos, sin embargo a partir del cuarto sangrado la respuesta inmunogénica fue mayor en los 5 grupos además de que se observa una estabilidad en su título. Por esta razón se realizó un ANDEVA de 1 y 2 vías para determinar si en realidad existe variación entre un mismo grupo e intergrupar respectivamente, así también se tendría que realizar una prueba de Tukey para determinar el grado de variación.

7.2.- Análisis estadístico de los resultados por medio de Statistics v.3.1®.

El manejo y evaluación de los datos fueron realizados en el programa Statistics v.3.1® para facilitar el análisis de los datos obtenidos.

En cuanto al tipo de pruebas estadísticas que se realizaron, fueron la ANOVA de 1 VÍA para hacer las comparaciones entre los títulos promedio del primero al séptimo sangrado de cada uno de los grupos experimentales, es decir entre los 7 diferentes sangrados de un mismo grupo. Para poder comparar entre cada uno de los distintos grupos experimentales, se realizó una ANOVA de 2 VÍAS.

Así mismo se realizó una prueba de Tukey, con la que se determinaron los grados de libertad y las diferencias significativas de los resultados obtenidos para las ANOVAS tanto de una como de dos VÍAS.

En base a lo anterior, podemos inferir que el mejor grupo experimental para la vacuna M-TT, será aquel que genere los títulos más altos de Abs en el menor número de inmunizaciones.

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

Grupo 1 mg de alúmina:

El análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre las inmunizaciones $F = (6,44) 59.1816 p < 0.001$.

La prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test $p > 0.001$), 2do (Tukey test $p > 0.001$), y 3er sangrado (Tukey test $p > 0.001$). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to (Tukey test NS $p = 0.9$) y 5to sangrado (Tukey test NS $p = 0.9$). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.

Grupo 5 mg de alúmina:

El análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre las inmunizaciones $F = (6,49) 52.7888 p < 0.001$.

La prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test $p > 0.001$), 2do (Tukey test $p > 0.001$), y 3er sangrado (Tukey test $p > 0.001$). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to (Tukey test NS $p = 0.9$) y 5to sangrado (Tukey test NS $p = 0.9$). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.

Grupo 10 mg de alúmina:

El análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre las inmunizaciones $F = (6,49) 32.0760 p < 0.001$.

La prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test $p > 0.001$), 2do (Tukey test $p > 0.001$), y 3er sangrado (Tukey test $p > 0.001$). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to (Tukey test NS $p = 0.9$) y 5to sangrado (Tukey test NS $p = 0.9$). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.

Grupo 20 mg de alúmina:

El análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre las inmunizaciones $F = (6,49) 121.0743 p < 0.001$.

La prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test $p > 0.001$), 2do (Tukey test $p > 0.001$), y 3er sangrado (Tukey test $p > 0.001$). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to (Tukey test NS $p = 0.9$) y 5to sangrado (Tukey test NS $p = 0.9$). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.

Grupo 40 mg de alúmina:

El análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre las inmunizaciones $F = (6,49) 92.2227$ $p < 0.001$.

La prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test $p > 0.001$), 2do (Tukey test $p > 0.001$), y 3er sangrado (Tukey test $p > 0.001$). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to (Tukey test NS $p = 0.9$) y 5to sangrado (Tukey test NS $p = 0.9$). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.

Resultados estadísticos con ANOVA de dos vías:

Una vez realizada la evaluación de ANOVA de una vía para determinar si estadísticamente las diferencias de los títulos de abs intra-grupos fue significativa o no, y a partir de que sangrado se estabilizó la curva de abs. Se tendrá que determinar por medio de una ANOVA de dos vías, cuál de los cinco grupos tiene el mejor título de abs y hacer la correspondiente comparación entre los 3 grupos con títulos más altos.

El análisis estadístico de varianza ANOVA de dos vías encontró diferencias significativas entre las inmunizaciones grupo 1 $F = (6,44) 165.26$ $p < 0.001$, variación $F = (5,220) 62.96$ $p < 0.001$ y encontró diferencia en la interacción del grupo 1 y variación de alúmina $F = (30,220) 12.15$ $p < 0.001$.

La prueba de Tukey encontró que el 5to, 6to y 7mo sangrado de los 3 grupos con títulos más altos muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test $p > 0.001$), 2do (Tukey test $p > 0.001$), y 3er sangrado (Tukey test $p > 0.001$). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 5to (Tukey test NS $p = 0.9$) y 6to sangrado (Tukey test NS $p = 0.9$) de los 3 grupos con título más alto, estableciendo que en el séptimo sangrado el grupo con 10 mg/ml muestra diferencia significativa con respecto a los grupos de 20 y 40 mg/ml.

Comparación de Títulos de Anticuerpos Inter-grupos.

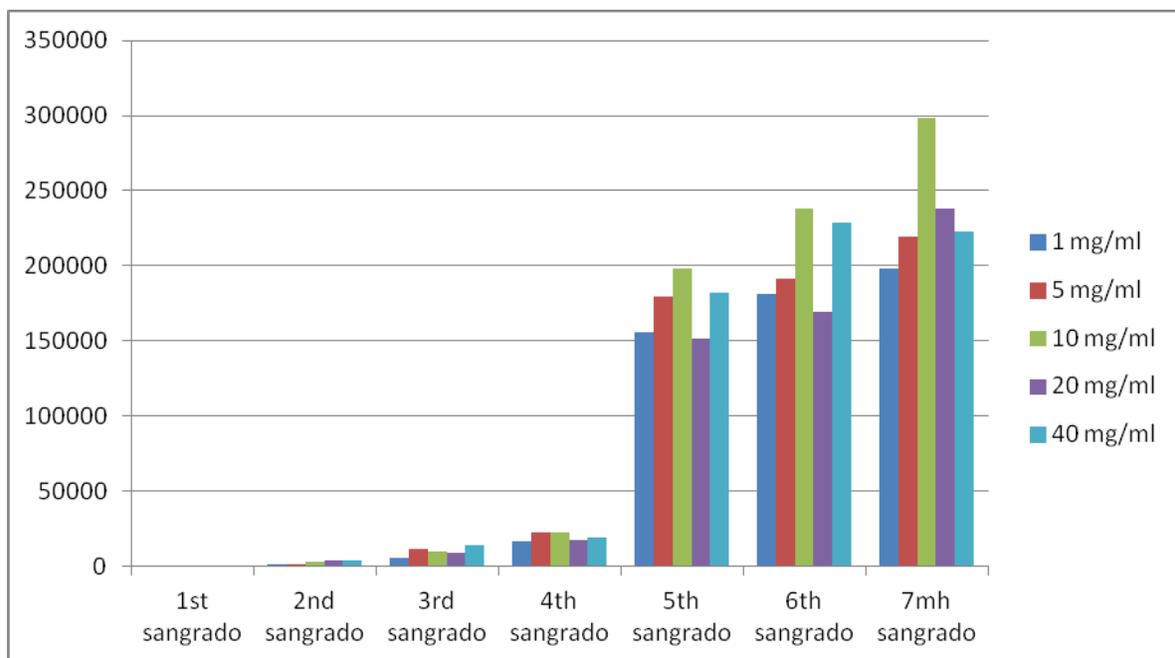


Figura 6.- Gráfica para la comparación inter-grupos de los títulos promedio de anticuerpos del primero a el séptimo sangrado, en donde se puede observar que desde el segundo hasta la cuarta reinmunización la respuesta inmunogénica es

baja y no muestra variación entre ellas, sin embargo a partir de esta cuarta inmunización la respuesta inmunogenica incrementa de un titulo promedio llegando a 1:290000 en el grupo de 10 mg/ml en el sangrado 7, dicho grupo muestra la mejor respuesta inmunogenica.

VIII.- Discusión de los resultados.

Después de la evaluación de las pruebas estadísticas así como de los resultados obtenidos, se dedujo que entre los grupos con títulos de anticuerpos más altos no existe una diferencia estadística significativa hasta el séptimo sangrado, en donde se observa que los niveles de absorbancia y su transformación a títulos de anticuerpos obtenidos por el grupo con 10 mg/ml de adyuvante fue el que mostró el valor de anticuerpos más alto con respecto a los grupos de 1, 5, 20 y 40 mg/ml.

Sin embargo, dada la inexistencia de diferencia estadística en los sangrados anteriores sería bueno revisar algunos otros parámetros para evaluar, como las propiedades físico-químicas del hidróxido de aluminio que pudieron intervenir en la generación de dicha respuesta, debido a que procesos como la liofilización pueden afectar estas propiedades en los adyuvantes derivados del aluminio esto es por la formación de aglomerados que incrementan el tamaño de la partícula y por ende reducen la potencia inmunogénica de la vacuna. Debido a esto, algunos autores proponen la adición de ciertos excipientes como trealosa a una concentración del 15 al 20% p/V, dextran, sacarosa y sorbitol, estos excipientes son capaces de estabilizar a las moléculas de hidróxido de aluminio durante el proceso de liofilización y con ello evitar la formación de aglomerados de moléculas del hidróxido de aluminio mientras es expuesto al proceso de liofilización.²⁹

Por otro lado con respecto a los mecanismos por los cuales los adyuvantes derivados del hidróxido de aluminio ejercen su fuerza como agentes

inmunogénicos es la adsorción del antígeno a las moléculas preformadas de gel de hidróxido de aluminio. R.K Gupta reportó que, la adsorción del antígeno a las moléculas del hidróxido de aluminio depende mayormente de las fuerzas electrostáticas entre el adyuvante y el antígeno. El pH de la solución, la temperatura, el tamaño de la partícula del gel y la interacción iónica son otros factores físicos que afectan la adsorción de los antígenos. En cuanto a la adsorción de acarreadores inmunogénicos como los toxoides tetánico y diftérico a los geles de hidróxido de aluminio, no se ve afectada a las condiciones de pH y exceso de iones fosfato. El hidróxido de aluminio es capaz de adsorber cantidades considerables de toxoide tetánico (aproximadamente 820 μ g / mg de gel) a pH 6, por lo tanto el hidróxido de aluminio tiene una alta capacidad para adsorber antígenos como el toxoide tetánico y diftérico, principalmente por el hecho de que a pH 6 o neutro el hidróxido de aluminio tiene carga positiva, mientras que los toxoides tetánico y diftérico están cargados negativamente.³⁰

Debido a lo anterior, se estima que el tiempo en que se deja interactuar el antígeno con los adyuvantes derivados del gel de hidróxido de aluminio, es vital y de suma importancia para favorecer el proceso de adsorción.

Durante la evaluación de los títulos de anticuerpos se esperaba que los grupos con cantidades mayores de adyuvante como lo son el grupo de 20 y 40 mg/ml establecieran títulos de anticuerpos mayores, sin embargo desde el punto de vista inmunológico, se sabe que el diámetro promedio de los macrófagos es de aproximadamente 10 μ m y que el diámetro promedio de las partículas de hidróxido

de aluminio sin ser liofilizadas es de aproximadamente 3.7-8 μm , y una vez liofilizado las partículas de hidróxido de aluminio pueden incrementar su tamaño notablemente (de 11-125 μm) lo que podría ocasionar dificultades para la presentación y activación de las células presentadoras de antígenos, debido a la incapacidad de fagocitar moléculas de diámetros mayores a las que poseen ellas mismas.³¹

IX.- Conclusiones y propuestas a futuro.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio y por medio de la evaluación de las diferentes graficas de titulación de anticuerpos, así como las diferentes pruebas estadísticas realizadas, se puede concluir que el grupo con la concentración de alúmina en la vacuna M-TT administrada en ratones macho BALB/c que genera el mejor titulo de anticuerpos, fue el grupo con 10 mg/ml de alúmina. Anteriormente se ha realizado la discusión de los factores físico-químicos que pudieron estar ligados a la obtención de los diferentes resultados en los grupos de 1,5, 20 y 40 mg/ml de alúmina. Por lo que se propone a futuro demostrar el grado de variación en la respuesta inmunogénica de la vacuna, evaluando los diferentes excipientes, así como las variables biológicas que pudieran estar interviniendo en la generación de dicha respuesta como lo son el intervalo entre reinmunizaciones y dosis de antígeno unido a él acarreador inmunogénico.

Así mismo la evaluación de la calidad inmunogénica seria de gran utilidad para poder evaluar si dicha vacuna cumple con su finalidad, la cual es evitar el paso de morfina al SNC por medio de la captura de esta molécula en el torrente sanguíneo atreves de los anticuerpos vacúnales generados en el proceso de inmunización. Dicha evaluación se podría realizar utilizando la prueba de tail flick.

X.- Bibliografía.

1. Leunk AK. Variolation and vaccination in late imperial China. Paris: Fantini B.1996.
2. Plotkin SL. A short history of vaccination. Paris: SA Orenstein WA, 1999.
3. Schoot. Crónica de la medicina. Intersistemas, 3a ED, 2003.
4. Roitt. Inmunología Fundamentos. Panamericana. 10 ED, 2008.
5. William E. Paul. Fundamental Immunology. Wolters kluwer health, 6th ED. 2009.
6. Inmunologia. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kuby. 5a Ed. Mc Graw Hill. 2006.
7. KUBY, J.: *Immunology* (Tercera edición). Nueva York: Ed. Freeman & Co. 1997.
8. Vogel FR, Powell MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ, editors. Vaccine design. New York: Plenum Press, 1995.
9. Vogel FR, Powell MF, Alving CR. A compendium of vaccine adjuvants and excipients (<http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf>).
10. Edelman R, Tacket CO. Adjuvants. Intern Rev Immunol 1990.
11. Stanley L. Hem, Harm HogenEsch. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotential. 2007.

12. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. 1985
Modulation of the human immune response by non-toxic and -pyrogenic adjuvant aluminum hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol*.
13. Harm HogenEsch, 2002. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminium adjuvants. *Vaccine*.
14. Hyman SE. Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 2005
15. Kendler KS, Prescott CA, Myers J, Neale MC. The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. *Arch Gen Psychiatry* 2003.
16. Merikangas KR, Stolar M, Stevens DE, Goulet J, Preisig MA, Fenton B, et al. Familial transmission of substance use disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55:973-9.
17. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005
18. Tomkins DM, Sellers EM. Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. *CMAJ* 2001; 164:817-21.
19. Koob GF. The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 877:445-60.
20. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies. *Neuropharmacology* 2004; 47:3-13.

21. Hser Y, Hoffman V, Grella C, Anglin M. A 33-year follow-up of narcotics addicts. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58:503-8.
22. EMCDDA. Annual Report 2006: The State of the Drugs Problem in Europe. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2006.
23. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Results from the 2005. National Survey on Drug Use and Health: National Findings. Rockville, MD: Office of Applied Studies, NSDUH series H-30, DHHS Publication No. SMA 06-4194; 2006.
24. The Office of National Drug Control Policy (ONDCP). Heroin Fact Sheet: June 2003.
25. The Senlis Council. Licensing poppy for the production of essential medicines: an integrated counter-narcotics, development and counter-insurgency model for Afghanistan. June 2007.
26. <http://www.conadic.salud.gob.mx/pie/ena2008.html>
27. Bonese KF, Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM, Schuster CR. 1974. Changes in heroin self administration by a rhesus monkey after morphine immunisation. *Nature*. 252:708-10.
28. Anton, B. & P. Leff. 2006. A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents. *Vaccine* 24: 3232–324
29. Wolff L., Flemminf J., Schimtz R., Gröger K., Goymann M., 2008. Protection of aluminum hydroxide during lyophilisation as an adjuvant for freeze-dried vaccines. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 330: 116-126.

30. Gupta R.K, 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
31. Stanley L. Hem, Harm HogenEsch, 2007. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Review of Vaccines*, 6:5, 685-698.