



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE LA VACUNA M-TT  
A DIFERENTES TIEMPOS DE REINMUNIZACIÓN EN RATONES DE LA CEPA  
BALB/C

Tesis

Que para obtener el título de:

**Médico Veterinario Zootecnista**

Presenta

**Eric Hernández Segura**

Asesores:

Dr. Benito Antón Palma

Mvz Carlos A. Tena Betancourt

México D.F.

2012



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.

## Dedicatoria

La presente tesis está dedicada primero que nada a la persona que más admiro y que es y será un ejemplo a seguir, a mi padre Juan Manuel Hernández Ramírez, que sin su incondicional apoyo no hubiese podido lograr ninguna de mis metas que he conseguido a lo largo de mi vida, a mi madre Teresa Segura Morales por enseñarme el valor de la disciplina y ser un pilar importante en mi educación personal; a mis tíos José Alonso Cano Castillo y Silvia Segura Morales, quienes sin sus consejos y convivencias simplemente no sería la persona que soy.

Al resto de mi familia y amigos los cuales nunca me han dejado solo y siempre han estado en los momentos en los que más los necesité.

A mis mejores amigos: Eric Chávez Vázquez y Luis Ángel Rios con los cuales he compartido los mejores momentos de mi vida.

Por último dedico esta tesis a la mujer que día a día ilumina mi camino, al amor de mi vida Ofelia Hernández Hernández, que me ha demostrado que el amor es tangible y que los obstáculos son más fáciles de superar si te mantienes a mi lado, agradezco infinitamente tu paciencia y tu apoyo.

Agradecimientos:

Agradezco de antemano al Dr. Benito Antón Palma por abrirme las puertas de su laboratorio de Neurobiología molecular y Neuroquímica de adicciones perteneciente al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz y permitirme absorber solo una pequeña parte de su conocimiento científico.

Al Dr. Alberto Tena, al QFB Ricardo Hernández y al Dr. Alberto Salazar por sus enseñanzas académicas que me ayudaron a concluir este trabajo de investigación.

## ÍNDICE:

### ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN.....	9
I.INTRODUCCIÓN.....	11
1. Definición de Adicción.....	11
1.1 Descripción de la molécula de morfina.....	12
1.2 Descripción de la molécula de heroína.....	14
1.3 Abuso y dependencia de los Opiáceos.....	16
1.4 Epidemiología en México.....	16
2. Fisiopatología del consumo de morfina y heroína.....	21
2.1 Características clínicas.....	21
2.2 Efectos físicos adversos.....	22
2.3 Fisiopatología.....	23
3. Introducción al sistema inmunitario.....	23
3.1 Reconocimiento de antígeno.....	29
3.2 Vacunas.....	32
3.2.1 Características generales de las vacunas.....	32
3.2.2 Tipos de vacunas.....	33
3.2.2.1 Vacunas con toxoide.....	34
3.2.2.2 Vacunas conjugadas.....	35
4. Adyuvantes.....	35

5. Tolerancia inmunológica.....	37
II. ANTECEDENTES.....	40
1. Vacuna M-TT, diseño y funcionalidad.....	40
1.1 Inmunogenicidad de la vacuna M-TT.....	42
1.2 Efectos terapéuticos de la vacuna M-TT .....	43
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
IV. HIPÓTESIS.....	46
V. OBJETIVO.....	47
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
A. Justificación y planteamiento de los diferentes tiempos de reinmunización de la vacuna M-TT.....	49
B. Monitoreo de la respuesta inmune humoral contra morfina/heroína: Determinación de títulos de anticuerpos en sueros de ratones de la cepa BALB/c, inmunizados contra morfina/heroína, por ensayos de ELISA por captura de anticuerpo.....	51
C. Protocolo general para realizar el ensayo de ELISA por captura de anticuerpo.....	52
VII. RESULTADOS.....	56
VIII. DISCUSIÓN.....	66

IX. CONCLUSIONES.....	68
X.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

## Índice de figuras y cuadros.

### **Figuras:**

**Figura 1.-** Representación esquemática de la molécula de heroína

**Figura 2.-** Gráfica comparativa del porcentaje del consumo de drogas en los años 2002 al 2008 en México según la ENA en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años.

**Figura 3.-** Gráfica comparativa del porcentaje del consumo de drogas en los años 2002 al 2008 en México según la ENA en la población rural y urbana en hombres y mujeres de entre 12 y 65 años.

**Figura 4.-** Gráfica comparativa del porcentaje del consumo de diversas drogas en los años 2002 al 2008 en México según la ENA en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años.

**Figura 5.-** Ejemplo de gráfica de absorbancias

**Figura 6.-** Gráfica que ilustra el promedio de título de anticuerpos de cada muestra sanguínea en el grupo de 7 días.

**Figura 7.-** Gráfica que ilustra el promedio de título de anticuerpos de cada muestra sanguínea en el grupo de 14 días.



**Figura 8.-** Gráfica que ilustra el promedio de título de anticuerpos de cada muestra sanguínea en el grupo de 7 días.

**Figura 9.-** Gráfica de barras comparativa donde se muestran los títulos de anticuerpos de los diferentes grupos de investigación.

**Cuadros:**

**Cuadro 1.-** Factores que determinan la inmunogenicidad o la tolerancia de los antígenos proteínicos.

**Cuadro 2.-** Esquema de vacunación de los tres grupos experimentales

**Cuadro 3.-** Resultados estadísticos después de realizar la prueba de Tukey al grupo de 7 días.

**Cuadro 4.-** Resultados estadísticos después de realizar la prueba de Tukey al grupo de 14 días.

**Cuadro 5.-** Resultados estadísticos después de realizar la prueba de Tukey al grupo de 30 días.

## Índice de abreviaturas

**SNC.-** sistema nervioso central

**μ.-** mu

**κ.-** kappa

**σ.-** sigma

**δ.-** delta

**ENA.-** Encuesta Nacional de Adicciones

**VIH.-** Virus de la inmunodeficiencia humana

**NK.-** Natural killer

**MHC.-** Complejo mayor de histocompatibilidad

**Da.-** Daltons

**CPA.-** Células presentadoras de antígeno

**IgG.-** Inmunoglobulina g

**IgA.-** Inmunoglobulina A

**IgM.-** Inmunoglobulina M

**IgE.-** Inmunoglobulina E

**M-6-H-BSA.-** Morfina-6-hemisuccinil-BSA

**FDA.-** Food and drug administration

**Vacuna M-TT.-** Morfina toxoide tetánico

**LAA.-** levo- $\alpha$ -acetilmetadiol

**g.-** gramos

**ml.-** mililitros

**μg.-** microgramos

**ELISA.-** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**Abs.-** Anticuerpos

**PBS.-** Buffer fosfato salino

**PBS-GT.-** pbs gelatina tween

**NaOH.-** hidróxido de sodio

**BSA-Mor.-** Fase sólida de morfina.

**OPD.-** ortofenildiamina

**L.-** litros

**Nm.-** nanómetro

**ANOVA.-** Análisis de varianza

**INPRFM.-** Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

## Resumen

Los diferentes reportes experimentales que demostraron la factibilidad de generar respuesta inmunológica humoral contra la morfina y sus congéneres estructurales como la heroína, sirvieron de base para la generación de un estudio, reportado hace casi 30 años, por el grupo de trabajo de Bonese y cols., en el cual se demostró, por primera vez, la eficacia del uso de un inmunocombinado de la morfina en vacunación activa para inducir respuesta inmunológica humoral contra esta droga, en solamente un animal de experimentación, un primate no humano de la especie *Macacus rhesus*.

El objetivo principal de este trabajo de investigación, fue llevar a cabo un protocolo experimental con diferentes tiempos de vacunación de la vacuna M-TT, la cual se sintetiza en el laboratorio de neurobiología Molecular y Neuroquímica de las Adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) y decidir finalmente cual de los diferentes grupos de inmunización ensayados dentro de este proyecto es el más apropiado para generar una respuesta inmunológica capaz de contrarrestar los efectos de la morfina y la heroína.

Los intervalos de tiempo de cada grupo en los cuales se inmunizó con vacuna M-TT durante el desarrollo de este proyecto son los siguientes:

- Grupo uno.- 7 días entre cada reinmunización
- Grupo dos.- 14 días entre cada reinmunización
- Grupo tres.- 30 días entre cada reinmunización

Se aplicaron cinco inmunizaciones y consecutivamente se fueron obteniendo los antisueros correspondientes de cada uno de los grupos, mismos que fueron puestos bajo análisis de ensayo de ELISA indirecta. Los resultados finales de estos ensayos experimentales demostraron que el grupo de 14 días presentó mayor potencia inmunogénica.

## I. Introducción.

### 1. Definición de adicción

Una adicción es una enfermedad física y psicoemocional según la organización mundial de la salud. En un sentido tradicional es una dependencia hacia una sustancia, actividad o relación. Está representada por los deseos que consumen los pensamientos y comportamientos (síndrome de abstinencia) del adicto, y estos actúan en aquellas actividades diseñadas para conseguir la sensación o efecto deseado o para comprometerse en la actividad deseada (comportamientos adictivos)<sup>1,2</sup>.

En la actualidad se acepta como adicción, cualquier actividad que el individuo no sea capaz de controlar, que lo lleve a conductas compulsivas y que perjudiquen su calidad de vida. En el mismo plano de las adicciones se encuentra el alcoholismo, la farmacodependencia y la adicción a sustancias psicoactivas.

El uso y abuso de sustancias adictivas constituye un complejo fenómeno que tiene consecuencias adversas en la salud individual, en la integración familiar y en el desarrollo y la estabilidad social. Aunque en la actualidad toda la sociedad está expuesta a drogas, hay grupos más vulnerables que otros a sufrir consecuencias negativas a su uso, como los niños y los jóvenes, quienes pueden llegar a truncar su posibilidad de desarrollo personal y de realizar proyectos positivos de vida.

En general, existe una percepción dividida sobre la consideración de que la adicción es una enfermedad. Estos hallazgos indican la necesidad de hacer campañas para que la población comprenda las bases neurobiológicas que sustentan que las adicciones son una enfermedad, con el fin de que las personas con dependencia puedan acercarse a un tratamiento. Es ahí donde radica la importancia de la investigación en cuanto al desarrollo de novedades tecnológicas se refiere, para poder implementar un esquema terapéutico completo con la finalidad de brindar un apoyo integral al adicto.

El estudio de los trastornos ocasionados por el uso de sustancias psicoactivas ha permitido hacer grandes progresos e impulsar iniciativas prometedoras para comprender los aspectos biológicos y psicológicos de la dependencia de drogas.

Es difícil desarrollar una nomenclatura que sea consistente con las distintas culturas y las diferentes sustancias y que sea válida para describir el fenómeno clínico.<sup>3</sup>

En la presente tesis solo se estudiarán aquellas drogas clasificadas como opiáceas, específicamente se tratará a la morfina y a la heroína como drogas altamente adictivas.

### **1.1 Descripción de la molécula de morfina**

La morfina es un potente alcaloide derivado de la benzoisoquinolina<sup>4</sup> (forma hidratada,  $C_{17}H_{19}NO_3 \cdot H_2O$ ) que actúa directamente en el sistema nervioso central (SNC) para inhibir el dolor. La morfina representa el principal y mayor agente

alcaloide del opio (amapola, *Papaver somniferum*) con un porcentaje de 10-20% del total de la masa drenada del jugo de amapola.<sup>5</sup>

Aunque existen limitaciones legales para conseguir y usar este tipo de fármacos, en ocasiones se llegan a emplear en especial en procedimientos de neuroleptoanalgesia y en el tratamiento de dolores intensos. Parcialmente purificada, la morfina se encontraba contenida en la tintura del opio. Sertuner la aisló y trabajó con ella en 1803. Debido a sus efectos eufóricos y de adicción, ya conocidos por los egipcios desde hace más de 4,000 años y en la China del siglo XIX, la morfina y sus derivados son sustancias controladas estrictamente por las autoridades sanitarias de todos los países desde el segundo decenio del siglo XIX. Los mayores productores de morfina (Afganistán y Turquía) la expanden como sal sulfato estandarizada al 10%. Aunque no todos los fármacos narcóticos se extraen de la morfina, los receptores que ocupa este principio activo son materia de investigación constante, ya que definen la preferencia de análogos sintéticos y semisintéticos por ciertos receptores. Además, estos receptores son ocupados por péptidos endógenos llamados endorfinas, que entre otras funciones poseen la capacidad de bloquear el dolor.

La morfina actúa sobre varios tipos de receptores opioides, entre los que se incluyen los receptores mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ), sigma ( $\sigma$ ) y delta ( $\delta$ ). Al parecer los receptores mu actúan a nivel de las sustancias periacueductuales de la manera en que lo hacen las encefalinas (opioides endógenos)<sup>6,7</sup>. También activa la liberación de serotonina en el SNC, induciendo analgesia y un sentimiento de placer y bienestar.<sup>6,7</sup>



Los receptores kappa están relacionados con analgesia a nivel espinal y con disminución de la actividad motora. La interacción de opiáceos con ellos causa sedación.

## **1.2 Descripción de la molécula de heroína**

La heroína es una droga ilegal altamente adictiva. También llamada morfina 3,6-diacetilester o 3,6-diacetil morfina, no solo es el opiáceo de mayor consumo sino que también es el de acción más rápida debido a que penetra más rápido la barrera hematoencefálica. La heroína se procesa de la morfina la cual se extrae de la bellota de amapola (*Papaver somniferum*). Típicamente se vende en forma de polvo blanco o marrón, o como una sustancia negra pegajosa conocido popularmente como “goma” o “alquitrán negro”. Aunque se está volviendo más común encontrar heroína de mayor pureza, la mayoría de la heroína que se vende en la calle ha sido mezclada o “cortada” con otras drogas o con sustancias como azúcar, almidón, leche en polvo o quinina. La heroína generalmente se inyecta, se inhala o se fuma. Típicamente el adicto se puede inyectar hasta cuatro veces al día. La inyección intravenosa proporciona la mayor intensidad y causa la oleada de euforia más rápida también conocido como “rush” (de 7 a 8 segundos), mientras que la inyección intramuscular produce un inicio relativamente lento de la euforia (de 5 a 8 minutos) <sup>8</sup>. Cuando es inhalada o se fuma, generalmente se sienten sus efectos máximos de 10 a 15 minutos<sup>9,10</sup>. Sin embargo, los principales efectos farmacológicos de la heroína se derivan de las propiedades de la molécula

de la morfina, los cuales comparten un perfil similar puesto que los dos producen analgesia, hipotermia, sedación, inhibición de la motilidad intestinal y depresión del sistema inmunológico. No obstante, la heroína muestra diferentes parámetros físico-químicos que lo distinguen de la morfina. Por ejemplo, la estructura molecular de la heroína es más pequeña, soluble e hidrofóbica, lo que le da la capacidad de atravesar con mayor rapidez la barrera hematoencefálica que la morfina <sup>11,12</sup>. Por otra parte, los hallazgos actuales basados en las propiedades físico químicas de la molécula de heroína llevó a los investigadores a clasificarla como una droga altamente lipofílica precursora de los metabolitos activos de la morfina, los cuales son 6-monoacetilmorfina (6-MAM) y morfina 6-glucoronico (M6G).<sup>13</sup>

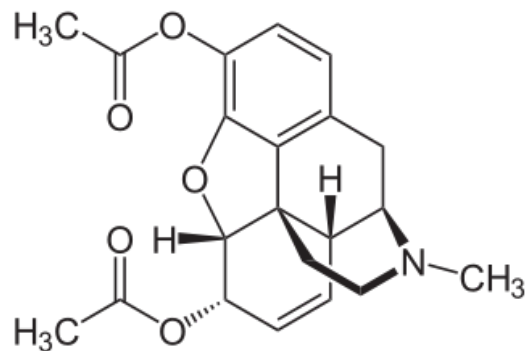


Figura 1: Representación esquemática de la molécula de heroína

### **1.3 Abuso y dependencia de los Opiáceos.**

A principio de los años setenta, el interés por la investigación y el tratamiento del abuso de los opiáceos cedió hacia un periodo de relativa desatención pública. En 1987 a partir de la inquietud pública a cerca de las adicciones a la cocaína, la extensión del SIDA en los adictos, se produjo una renovación significativa de los fondos federales para el estudio del abuso de drogas <sup>8,14</sup>.

El abuso de múltiples sustancias ha aumentado con el uso combinado de la heroína con otras drogas como la cocaína, la metadona. El "*speedball*", mezcla de heroína y cocaína, es un método que con mayor frecuencia se utiliza para eliminar el "*high*" que aparece tras la intoxicación aguda de cocaína. Aunque en general se ha hecho mayor referencia a las muertes por cocaína, las muertes relacionadas con heroína y alcohol consideradas tanto conjuntamente como por separado, son mucho más frecuentes <sup>15</sup>. En la actualidad en algunos países está emergiendo el consumo de formas puras de heroína en polvo. Esta vía de administración alternativa, atractiva para algunos adictos que temen contraer el VIH, ha contribuido a una oleada de popularidad de la heroína. <sup>14,16</sup>

### **1.4 Epidemiología en México.**

En México desde la década de los 70's se iniciaron acciones para atender este problema, mucho antes de que la demanda de droga adquiriera mayores proporciones. Para el sector Salud la reducción de la demanda de drogas incluye las iniciativas que buscan prevenir su consumo, disminuir progresivamente el

número de usuario, mitigar los daños a la salud que puede causar el abuso y proveer de información y tratamiento a los consumidores problemáticos o adictos, con miras a su rehabilitación y reinserción social.

El tema de las drogas tiene especial trascendencia ya que además de los problemas en cuanto a salud se refiere, trae consigo una ola de problemas en las cuales México se ha visto envuelto en los últimos años y que con el paso del tiempo se van agravando más y más. Pocas enfermedades perturban la vida de las comunidades y alteran tanto la dinámica de los núcleos familiares como las adicciones.

Como en otros problemas de salud pública, las medidas de prevención y tratamiento de las adicciones, para ser eficaces, deben estar sustentadas en información científica, confiable y completa sobre la naturaleza, magnitud y características del fenómeno.

En cuanto a información se refiere, destacan los datos de la reciente Encuesta Nacional de Adicciones (ENA) realizada en 2008 en la cual los resultados indican que el consumo de drogas ilegales y médicas en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años de edad aumentó de un 5% observado en 2002 a un 5.7% en 2008. Las drogas ilegales (mariguana, cocaína y sus derivados, heroína, metanfetaminas, alucinógenos, inhalables y otras drogas) aumentaron de 4.6 a 5.2%<sup>17</sup>; el consumo de drogas médicas con potencial adictivo, usadas fuera de prescripción, mantuvieron los niveles observados en 2002. Cabe señalar que dicha encuesta se realiza cada 6 años.

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

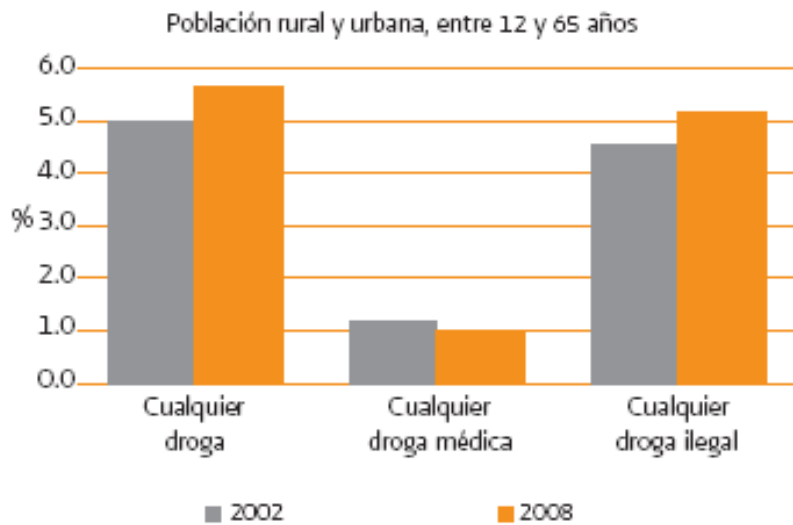


Figura 2: Gráfica comparativa del porcentaje del consumo de drogas en los años 2002 al 2008 en México según la ENA en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años.

Por grupos de población, se observa que, si bien el consumo de drogas ilegales es mayor en los hombres (en una proporción de 4.6 hombres por cada mujer), el índice de crecimiento es mayor en las mujeres, entre las cuales el consumo de drogas ilegales se duplicó aumentando de 1% en 2002 al 1.9% en 2008 mientras que el consumo en hombres solamente se incrementó de 8% en 2002 a 8.8% en 2008.

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

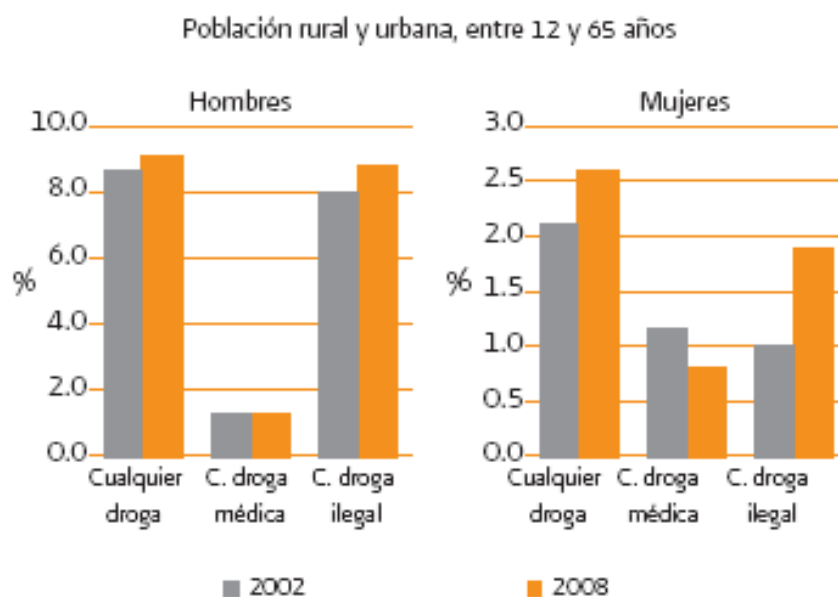


Figura 3: Gráfica comparativa del porcentaje del consumo de drogas en los años 2002 al 2008 en México según la ENA en la población rural y urbana en hombres y mujeres de entre 12 y 65 años.

La marihuana y la cocaína son las sustancias preferidas por la población. El consumo de la primera aumento de 3.5 a 4.2%; el aumento en el consumo de la segunda fue mayor, paso de 1.2% en 2002 a 2.4% 2008, es decir, que se duplicó entre ambas mediciones.

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

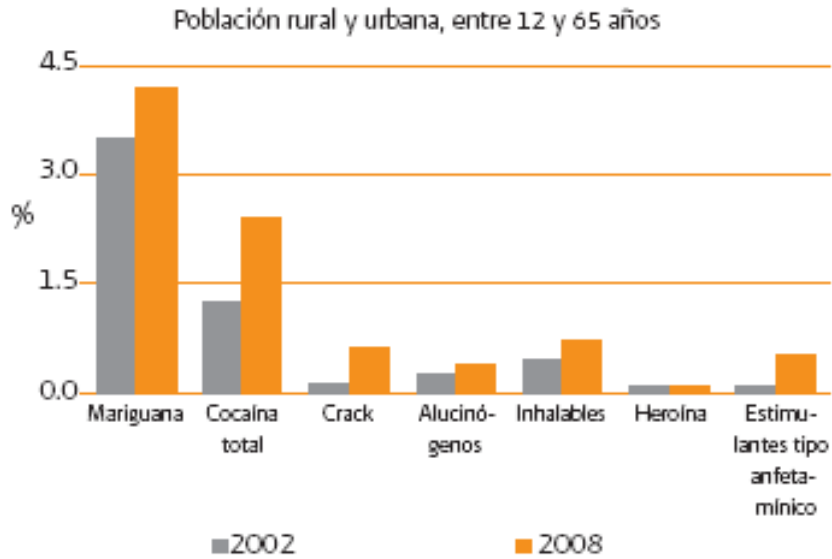


Figura 4: Gráfica comparativa del porcentaje del consumo de diversas drogas en los años 2002 al 2008 en México según la ENA en la población rural y urbana de entre 12 y 65 años.

La marihuana ha ocupado los primeros lugares de preferencia entre la población desde la primera encuesta nacional en 1988. La cocaína ha mostrado variaciones importantes y desplaza a los inhalables en la preferencia de la población desde finales de los años 80 e inicio de los 90 cuando aparece en el mercado nacional. Desde entonces, ha mostrado fluctuaciones importantes: el crecimiento acelerado que mostró en los años 90 se nivela y disminuye ligeramente hacia el final del siglo pasado para volver a repuntar en esta década.

Merced a los adelantos de la ciencia y a un mejor entendimiento de las bases que explican el efecto de las drogas, su búsqueda por parte de los individuos y el

desarrollo de la dependencia, se han podido implementar estrategias más efectivas de prevención y tratamiento. Se puede afirmar que el abuso de sustancias es una conducta prevenible y que **la adicción es una enfermedad que puede tratarse**. Este principio básico ha tardado más tiempo en permear a la población; aun prevalece un proceso de estigmatización de los enfermos, factor que influye en el retraso o en la falta de búsqueda de atención.

Además del estudio del consumo de drogas, la ENA 2008 arrojó datos estadísticos de la percepción de la población de los adictos. Los resultados indicaron que más de la mitad (58.5%) de los encuestados consideró que los adictos son personas enfermas y 60.4% estuvo de acuerdo que necesitan ayuda mientras que una tercera parte los considera personas débiles (30.6%), y 19.1% los percibe como delincuentes.

## **2. Fisiopatología del consumo de morfina y heroína**

### **2.1 Características clínicas**

La intoxicación intravenosa de heroína produce un “*rush*” eufórico subjetivo que puede ser reforzante, es decir que con el paso del tiempo el individuo necesita la droga con mayor frecuencia<sup>8</sup>. La tolerancia a esta situación se desarrolla con el uso repetido en el tiempo. Los signos físicos de la intoxicación comprenden constricción pupilar, disminución de la motilidad gastrointestinal, sedación, habla farfullante y deterioro de la capacidad de atención o de la memoria. El uso diario de los opiáceos durante días o semanas dependiendo de la dosis y de la potencia



de la droga, producirá síntomas de abstinencia cuando se interrumpa su consumo. El síndrome de abstinencia bastante intenso, que por lo general no amenaza la vida comienza aproximadamente 10 horas después del último consumo de opiáceos de corta acción, como son la morfina y la heroína. El inicio del síndrome de abstinencia depende de la vida media del opiáceo y de la cronicidad de su utilización.

La abstinencia leve de opiáceos presenta síntomas parecidos a los de la gripe: ansiedad, disforia, bostezos, sudoración, rinorrea, lagrimeo, midriasis, piloerección, hipertensión leve, taquicardia e interrupciones del sueño. Los síntomas severos consisten en escalofrío, dolor muscular y en articulaciones, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso y fiebre<sup>9,10</sup>.

## **2.2 Efectos físicos adversos**

Además del riesgo que significa para el organismo la dependencia del consumo de opiáceos, existen otros factores que ponen en riesgo la salud del adicto y que van vinculadas con la vía de administración de la droga, en específico la vía intravenosa. Las agujas hipodérmicas contaminadas así como las impurezas de la droga, pueden causar endocarditis, septicemia, embolia pulmonar e hipertensión pulmonar, así como infecciones en la piel, hepatitis y propagación del VIH<sup>8,14</sup>. El 25% de los casos de VIH son usuarios de drogas por vía intravenosa<sup>3</sup>.

### **2.3 Fisiopatología**

Los avances de la investigación básica en la identificación de los distintos subtipos de receptores de opiáceos han proporcionado una mayor comprensión de los mecanismos de neuroregulación y de la fisiología de los opiáceos endógenos. Los mecanismos celulares de neuroadaptación opiácea están siendo explorados en relación a las características de los receptores y los moduladores intracelulares de la acción opiácea. Se ha sugerido que los cambios neuroadaptativos en la zona de los receptores producen tolerancia y dependencia. El principal receptor para la morfina es el receptor mu y posee una afinidad selectiva para heroína, meperidina, hidromorfinona (Dilaudid) y metadona. Es sumamente sensible a la naloxona (antagonista opiáceo) y mediatiza la analgesia, euforia, sedación, miosis, hipotermia, bradicardia. Los receptores delta son más afines a las encefalinas endógenas. Existe la controversia acerca de que el receptor sigma sea un verdadero receptor opiáceo. Este receptor media los efectos conductuales extraños de la fenilciclidina (PCP). El receptor épsilon puede unirse de forma selectiva a un péptido endógeno: la betaendorfina.

### **3. Introducción al sistema inmunitario.**

El término *inmunidad* deriva de la palabra latina *inmunitas*, que designa la protección ofrecida a los senadores romanos como defensa frente a cualquier acción judicial durante el ejercicio de su cargo. En un sentido histórico, inmunidad

significaba protección contra las enfermedades y más en concreto, contra una enfermedad infecciosa. Las células y moléculas responsables de su ejecución constituyen el sistema inmunitario y su reacción conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas se denomina respuesta inmunitaria.

La función fisiológica del sistema inmunitario consiste en la defensa contra microorganismos infecciosos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede despertar una respuesta inmunitaria. Así mismo, aquellos mecanismos que en condiciones normales protegen a las personas de las infecciones y eliminan las sustancias ajenas, en algunas circunstancias también son capaces de provocar una lesión tisular y una enfermedad. Por lo tanto, una definición más global de la respuesta inmunitaria, señala que es una reacción desplegada tanto frente a los componentes de los microorganismos como a macromoléculas, del tipo de las proteínas y los polisacáridos y a pequeños compuestos químicos que sean reconocidos como ajenos, independientemente de las consecuencias fisiológicas o patológicas que pueda acarrear una reacción de esta clase. La **inmunología** es el estudio de las respuestas inmunitarias, así como de los fenómenos celulares y moleculares que suceden después de que el organismo se ve invadido por microorganismos y por otras moléculas ajenas.

La defensa contra microorganismos tiene lugar a través de 2 tipos diferentes de inmunidad: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La **inmunidad innata** aporta la primera línea de defensa frente a los microorganismos. Está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya instaurados incluso antes de contraerse la infección y preparados para responder con rapidez una vez

producida. Estos mecanismos solo reaccionan ante los microorganismos y responden básicamente de la misma manera cada vez que se repite una infección.

Los componentes de la inmunidad innata son los siguientes:

1. Barreras físicas y químicas: como los epitelios y las sustancias antimicrobianas.
2. Células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos citotóxicos naturales (células NK).
3. Proteínas sanguíneas: como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación.
4. Citocinas: proteínas que regulan y coordinan de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata.

A diferencia de la inmunidad innata hay otras respuestas inmunitarias que son estimuladas por la exposición a los microorganismos infecciosos, cuya magnitud y capacidad defensiva crece con cada exposición sucesiva a un microorganismo concreto. Dado que esta forma de inmunidad aparece como respuesta a una infección y se adapta a ella, recibe el nombre de **inmunidad adaptativa**. Sus características definitorias son una exquisita especificidad frente a diversas moléculas y la propiedad de “recordar” las exposiciones repetidas al mismo microorganismo para responder con mayor energía. El sistema inmunitario adaptativo tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas y de reaccionar frente a ellas. Además, posee la característica de distinguir entre los distintos microorganismos y moléculas, incluso las más afines entre sí. Así mismo, a veces se le adjudica el nombre de inmunidad

adquirida para acentuar que las potentes respuestas protectoras se “adquieren” por la experiencia. Las sustancias ajenas que suscitan una respuesta inmune específica o que constituyen el blanco de tales repuestas son los **antígenos** o **inmunógenos**.<sup>18</sup>

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. 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.

Gran parte de la capacidad inmunogénica de un antígeno está dada por las siguientes 4 propiedades:

- Alteridad
- Tamaño molecular
- Composición y complejidad química
- Capacidad para procesarse y presentarse con una molécula del Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de una célula presentadora de antígeno.<sup>19</sup>

**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.

El **tamaño molecular** esta correlacionado al grado de inmunogenicidad que presente, esto es, los inmunógenos más activos poseen casi siempre una masa molecular de 100 000 Daltones (Da) o más. Por lo general las sustancias entre 5000 a 10 000 Da son malos inmunógenos.

El tamaño y la alteridad por si mismos no son suficientes para que una molécula sea inmunógena, se requiere otra propiedad que es 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 más inmunógeno.

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 **epítomos**. Estos son regiones inmunologicamente activas dentro del antígeno.<sup>19</sup>

Existen dos tipos de inmunidad adaptativa, llamadas **inmunidad humoral** e **inmunidad celular**<sup>18</sup>.

La inmunidad humoral cuenta con unas moléculas presentes en la sangre y en las secreciones mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos producidos por los linfocitos B, así mismo, es el principal mecanismo de defensa contra microorganismos extracelulares y sus toxinas.

La inmunidad celular está a cargo de los linfocitos T. Los microorganismos intracelulares como virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del huésped donde los anticuerpos circulantes no lo tienen a su alcance. La defensa contra estas infecciones es fomentar la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos y la eliminación de las células infectadas.

Existe la posibilidad de generar una inmunidad protectora frente a un microorganismo cuando el huésped ofrece la respuesta correspondiente contra él o por la transferencia de anticuerpos. La inmunidad que se despierta por la exposición a un antígeno extraño se denomina **inmunidad activa**.

Una persona también puede adquirir la inmunidad mediante el paso del suero de otra persona dotada de una inmunidad específica. El individuo receptor de esta transferencia se vuelve inmune al antígeno específico. Esta inmunidad recibe el nombre de **inmunidad pasiva**.

### 3.1 Reconocimiento de Antígeno.

Una vez que el antígeno evade la inmunidad innata, el sistema inmune adaptativo pone en función tres mecanismos para eliminarlo:

1. Los anticuerpos segregados se unen a los microorganismos extracelulares, bloquean su capacidad para infectar las células del huésped y favorecen su ingestión por los fagocitos y su destrucción.
2. Una vez fagocitado el antígeno, los destruyen y los linfocitos T cooperadores fomentan sus capacidades microbicidas.
3. Los linfocitos T citotóxicos destruyen células infectadas que se encuentran fuera del alcance de los anticuerpos.

Existen mecanismos especiales para captar los microorganismos y a su vez concentrarlos en el lugar correcto para exponer sus antígenos a los linfocitos específicos.

Las células encargadas de éste trabajo son las **células presentadoras de antígeno (CPA)**. Las células dendríticas son las CPA que muestran los péptidos a los linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes y ponen en marcha la respuesta inmune adaptativa contra los antígenos proteínicos. Las células que se encuentran en los epitelios y los tejidos conjuntivos fagocitan los microorganismos, digieren sus proteínas en péptidos y los expresan en su superficie unidos a las moléculas del MHC, que están especializadas en la presentación de péptidos. Las células dendríticas transportan el paquete antigénico hasta los ganglios linfáticos y fijan su residencia en las mismas regiones ganglionares por las que constantemente



recirculan los linfocitos T vírgenes. Las células dendríticas también exhiben estos péptidos en otros órganos linfoides como el bazo<sup>18</sup>.

Los microorganismos íntegros o los antígenos que llegan a los ganglios linfáticos y al bazo son reconocidos por linfocitos B específicos.

La activación de los linfocitos T vírgenes exige el reconocimiento de los complejos péptido-MHC presentados por las células dendríticas. El reconocimiento del antígeno suministra especificidad a la respuesta inmune y el requisito de la coestimulación aporta la seguridad de que los linfocitos T respondan a los epítomos presentados y no a una sustancia inocua.

Los linfocitos B utilizan sus receptores del antígeno (BCR) para reconocer múltiples tipos de antígeno diferentes.

Después de que los linfocitos B son activados, estos proliferan y se diferencian en células que segregan diversas clases de anticuerpos. La respuesta de los linfocitos B a los antígenos proteínicos requiere de la llegada de unas señales activadoras procedentes de los linfocitos T CD4. Los linfocitos B fagocitan a los antígenos proteicos, los degradan y exhiben sus péptidos ligados a las moléculas del MHC para su reconocimiento por parte de los linfocitos T cooperadores que posteriormente activan a los propios linfocitos B.

Una parte de la descendencia que procede de los clones expandidos de linfocitos B se diferencia en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. La escasa frecuencia inicial de las células T y de las células B específicas al antígeno, y la necesidad de expansión, explican el tiempo de latencia (clásicamente de 5 y 10

días)<sup>30</sup> requerido para alcanzar concentraciones séricas máximas de anticuerpos. Los antígenos de origen polisacárido y lipídico, estimulan la secreción de anticuerpos de la clase IgM, así mismo los de origen proteico, en virtud de los linfocitos T cooperadores, estimulan la secreción de anticuerpos IgG, IgA, e IgE. Los linfocitos T cooperadores también estimulan la producción de anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno. Este proceso llamado maduración de afinidad, mejora la calidad de la respuesta inmune humoral.

La respuesta inmune humoral combate a los antígenos de múltiples formas: los anticuerpos neutralizan a los microorganismos. Los anticuerpos representan el único mecanismo de la inmunidad adaptativa que impide una infección antes de que aparezca. Los anticuerpos IgG recubren a los microorganismos y los marcan antes de su fagocitosis, ya que los fagocitos expresan receptores para las regiones FC de las IgG. La IgG y la IgM activan el sistema del complemento por la vía clásica y sus productos finales favorecen la fagocitosis y la destrucción de los microorganismos. La IgG, en ciertas especies, pasa por transporte activo a través de la placenta y protege al recién nacido hasta que el sistema inmune está maduro. Los epitelios mucosos segregan IgA, que neutraliza los antígenos en la luz de las vías respiratorias y del tubo digestivo. La mayoría de los anticuerpos tiene una vida media de 3 semanas. Sin embargo, algunas células plasmáticas secretoras de anticuerpos emigran hacia la médula ósea y viven durante años sin dejar de producir anticuerpos en concentraciones bajas. Los anticuerpos segregados por estas células de memoria proporcionan una protección inmediata cada vez que el organismo es infectado por algún antígeno<sup>18</sup>.

Las células de memoria activadas por el microorganismo aportan una protección más eficaz. La activación inicial de los linfocitos genera unas células de memoria longeva, capaces de sobrevivir durante años después de la infección. Estas células son más eficaces que los linfocitos vírgenes en el combate contra los microorganismos porque representan una reserva amplia de linfocitos específicos frente a un antígeno y responden contra él con mayor rapidez y eficacia que las células indiferenciadas.

### **3.2 Vacunas.**

Las vacunas son preparados antigénicos que una vez dentro del organismo, provoca la proliferación de anticuerpos y con ellos desencadena una respuesta ante antígenos patógenos.

Las vacunas son, sin duda, la herramienta más valiosa que la inmunología ha generado. Gracias a ella enfermedades que históricamente aquejaban a la humanidad han sido erradicadas o están en vías de serlo como por ejemplo la viruela, sarampión, la rubéola etc.<sup>20</sup>

#### **3.2.1 Características generales de las vacunas.**

En general, las vacunas funcionan estimulando la respuesta inmunitaria del individuo sin que éste sufra la enfermedad o ponga en riesgo su vida. Una vacuna ideal sería aquella capaz de conferir un grado de inmunidad comparable al

provocado por la infección natural. Como en realidad esto no ocurre, las vacunas deben aplicarse más de una vez, como refuerzos.

Aunque el objetivo primordial de la vacunación es prevenir la infección, existe el caso de la vacuna terapéutica contra el virus del papiloma humano (ONCOVAC®) la cual se administra después de la infección. Dada la probada eficacia de esta vacuna, cada vez hay más interés en el desarrollo de las llamadas vacunas terapéuticas que si bien aun no están orientadas específicamente a tratar infecciones, si se plantean la idea de poder usarlas en tratamientos contra moléculas más pequeñas como en el caso de la vacuna M-TT.

Además, las vacunas no sólo son útiles para evitar las enfermedades infecciosas. En los últimos años se han desarrollado vacunas experimentales contra ciertos tipos de cáncer, vacunas para el control natal y en el caso de la presente tesis las vacunas para el auxilio de adicciones.

### **3.2.2 Tipos de vacunas.**

Las primeras vacunas se desarrollaron con los microorganismos completos (inactivados o atenuados) o con sus productos de secreción (toxinas). Estas vacunas que aún se siguen empleando, se describen como “vacunas de primera generación”. Con el conocimiento de que los agentes patógenos son en realidad entidades constituidas por una gran diversidad de antígenos, la mayoría de los cuales son irrelevantes como inductores de inmunidad al mismo tiempo que pueden comportarse como toxinas en el organismo huésped, muchos

investigadores se han dado a la tarea de buscar aquellos antígenos verdaderamente responsables de la protección. Los antígenos identificados como protectores se aíslan, se purifican, se secuencian y se reproducen por síntesis química para usarse como antígenos sintéticos, o sus genes se identifican y se clonan para obtenerlos como antígenos recombinantes (vacunas de segunda generación) <sup>20</sup>.

Desafortunadamente, la mayoría de los antígenos sintéticos y recombinantes son poco inmunogénicos y esto hace necesario el uso de adyuvantes, lo que dificulta su empleo. Los inconvenientes de toxicidad, baja inmunogenicidad, baja estabilidad y alto costo de estas vacunas, se evitan con las vacunas de ADN. Las vacunas de ADN se preparan con los genes insertados en plásmidos o en vectores vacunales; estas vacunas se describen como “vacunas de tercera generación”.

Para efectos de esta tesis solo se describirán las vacunas con toxoide y las vacunas conjugadas.

### **3.2.2.1 Vacunas con toxoide.**

Para aquellas enfermedades causadas por las toxinas de los microorganismos, los toxoides son el inmunógeno de elección. Los toxoides se preparan tratando las toxinas con formaldehido; de esta manera las toxinas pierden su actividad tóxica pero conservan su actividad inmunizante. Los toxoides tetánico y diftérico son dos ejemplos exitosos de este tipo de vacunas.

### **3.2.2.2 Vacunas conjugadas.**

Se denomina vacuna conjugada a aquella vacuna cuyo antígeno (por ejemplo un polisacárido) está acoplado covalentemente a una proteína acarreadora como toxoide tetánico o difetérico, que aporta péptidos antigénicos para estimular una respuesta de linfocitos T CD4. Tras la vacunación, los linfocitos T que reaccionan a la proteína acarreadora pueden entonces estimular linfocitos B específicos de polisacárido para que produzcan anticuerpos<sup>21</sup>.

### **4. Adyuvantes.**

Como ya se había mencionado anteriormente la mayoría de los antígenos sintéticos y recombinantes son poco inmunogénicos, por lo tanto un prerrequisito para una buena respuesta inmune es un estado de inflamación. Para ser eficaz, la vacunación debe crear un estado de inflamación en el sitio del cuerpo en que se inyectan los antígenos. En general, la inmunización con antígenos proteínicos purificados lleva a una respuesta inmunitaria débil. Aunque estas proteínas son antígenos genuinos en el sentido de que en principio pueden ser reconocidos, no son inmunógenos; es decir, no pueden estimular una respuesta inmunitaria eficaz por si solos. La respuesta a tales antígenos puede fomentarse por medio de sustancias que inducen inflamación por mecanismos dependientes de antígeno. Tales sustancias se denominan adyuvantes.<sup>20</sup>

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.<sup>22</sup>

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 inmunogénico de las vacunas. Sin embargo se ha llegado a la conclusión de que los siguientes puntos intervienen en su mecanismo de acción:<sup>23</sup>

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

Además del hidróxido de aluminio, actualmente se ha creado un compendio que muestra ejemplos de más de 75 adyuvantes disponibles al cual se puede tener acceso vía electrónica<sup>24</sup>.

## 5. Tolerancia inmunológica

La tolerancia inmunológica se define como la falta de respuesta frente a un antígeno inducido por la exposición previa a este antígeno. Cuando los linfocitos específicos entran en contacto con el antígeno, los linfocitos se pueden activar, produciendo respuesta inmunitarias, o se pueden inactivar o eliminar, dando lugar a tolerancia. Diferentes formas del mismo antígeno pueden inducir una respuesta inmunitaria o tolerancia. Los antígenos que inducen tolerancia se denominan tolerógenos, o antígenos tolerógenos, para distinguirlos de los inmunógenos, que generan inmunidad. Un único antígeno puede ser inmunógeno o tolerógeno dependiendo de cómo es reconocido por linfocitos específicos. La tolerancia a antígenos propios, también llamada auto-tolerancia, es una propiedad fundamental del sistema inmunitario normal<sup>18</sup>.

La autotolerancia de las poblaciones de linfocitos T y B tiene varias características, y muchas de ellas también son características de la tolerancia a antígenos extraños.

La tolerancia se debe al reconocimiento de los antígenos por linfocitos específicos, los principales avances que permitieron que los inmunólogos estudiaran la tolerancia fueron la capacidad de inducir este fenómeno en animales mediante su exposición a antígenos definidos en diversas condiciones, y posteriormente de analizar las funciones de los linfocitos que habían entrado en contacto con los antígenos tolerógenos. Los primeros estudios de tolerancia mostraron que se podía inducir por el reconocimiento de los antígenos durante la vida fetal o



neonatal. Estos estudios iniciales también mostraron que el fenómeno de la tolerancia mostraba una de las principales características de los linfocitos, como es la especificidad por los antígenos.

Se puede inducir autotolerancia en linfocitos autorreactivos inmaduros en los órganos linfáticos generadores llamada tolerancia central, o en los linfocitos maduros de las localizaciones periféricas llamada tolerancia periférica, esto ocurre tanto en linfocitos T como en linfocitos B<sup>25</sup>.

La tolerancia central se produce porque durante su maduración en los órganos linfáticos generadores, todos los linfocitos pasan por una fase en la que el contacto con el antígeno da lugar a la muerte celular.

La tolerancia periférica se produce cuando los linfocitos maduros que reconocen los antígenos propios se hacen incapaces de responder a esos antígenos, o pierden su viabilidad y se convierten en linfocitos de vida corta, o se les induce para que mueran mediante apoptosis.

Estudios con diversos modelos experimentales han demostrado que muchas características de los antígenos proteínicos determinan si estos antígenos inducirán la activación de los linfocitos T o la tolerancia.

En el siguiente cuadro se mencionan algunos factores que determinan la inmunogenicidad o la tolerancia de los antígenos proteínicos.

<b>Factor</b>	<b>Factores que favorecen la respuesta inmune</b>	<b>Factores que favorecen la tolerancia</b>
<b>Cantidad</b>	Dosis óptimas varían para diferentes antígenos	Dosis elevadas
<b>Persistencia</b>	Duración corta (eliminados por la respuesta inmune)	Prolongada
<b>Vía de entrada; localización</b>	Subcutánea, intradérmica; ausencia en los órganos generadores	Intravenosa, oral; presencia en los órganos generadores
<b>Presencia de adyuvantes</b>	Antígenos con adyuvantes: estimulan a los linfocitos T cooperadores	Antígenos sin adyuvantes: No inmunógenos o tolerógenos
<b>Propiedades de las células presentadoras de antígenos</b>	Concentraciones elevadas de coestimuladores	Concentraciones bajas de coestimuladores y Citocinas

Cuadro 1.- Factores que determinan la inmunogenicidad o la tolerancia de los antígenos proteínicos.

## II. Antecedentes

Hace aproximadamente 30 años un grupo de investigadores encabezados por Bonese y cols.<sup>26</sup>, mostraron la posibilidad de efectuar un proceso de vacunación activa enfocado al tratamiento de la adicción a la heroína. Los resultados mostraron que la acción farmacológica de éste opioide fue selectivamente bloqueada después de haber sido administrado un derivado inmunogénico de este enervante, el conjugado de la morfina-6-hemisuccinil-BSA (M-6-H-BSA) a un grupo de monos Rhesus, los cuales con anterioridad fueron entrenados para la autoadministración de la heroína. Posteriormente en el 2009 el Dr. Anton y cols. publican un artículo de investigación en el cual proponen la validación a nivel pre-clínico de un nuevo modelo estructural para la vacuna anti-heroína diseñada para uso clínico en seres humanos.

### 1. Vacuna M-TT, diseño y funcionalidad

En un inicio el grupo el Dr. Anton y cols, trabajaron en el diseño y síntesis de un nuevo modelo de vacuna anti-morfina compuesta por un conjugado inmunogénico ideal para uso humano. Para explicar el diseño de la vacuna M-TT es necesario mencionar sus componentes principales: molécula de morfina (M), un brazo espaciador, una proteína acarreadora que en este caso es el Toxoide Tetánico (TT) e hidróxido de aluminio como adyuvante. Esta vacuna ha demostrado que es

capaz de generar una respuesta inmunológica lo suficientemente robusta como para sostener títulos de anticuerpos altos por la vía de vacunación activa <sup>5</sup>.

En la vacuna M-TT, con la ayuda de un brazo espaciador de una longitud aproximada de 20.15 amstrongs la molécula de morfina es hapténizada covalentemente a los grupos  $\epsilon$ -amino que quedan libres de la cadena de residuos de lisina del Toxoide Tetánico, que es una proteína acarreadora altamente inmunogénica aprobada por la FDA para uso humano<sup>27</sup>.

El brazo espaciador está formado por una cadena alifática de átomos de carbono de baja complejidad estructural, lo cual reduce su papel como un determinante antigénico cuando la morfina hapténizada a él es expuesta a las células del sistema inmune<sup>5</sup>.

La importancia del brazo espaciador radica en dos características, en primer lugar su longitud, la cual es del doble de tamaño del que comúnmente se utiliza en otros conjugados de morfina-6-hemisuccinil-BSA haciéndola aun más estable y en segundo lugar la manera en que este es colocado entre la proteína acarreadora y la molécula de morfina, ya que separa lo suficientemente entre sí a estas dos estructuras y las orienta de forma tal en el espacio que al final, el brazo espaciador es el que ayuda a que el conjugado de la vacuna de M-TT sea altamente inmunogénica <sup>28,5</sup>.

## **1.1 Inmunogenicidad de la vacuna M-TT**

Se sabe de antemano que la vacuna M-TT es capaz de generar una respuesta inmunológica lo suficientemente robusta como para generar títulos de anticuerpos bastante altos después de una cuarta revacunación en los animales experimentales que han sido expuestos a esquemas de inmunización usando dicho conjugado inmunogénico. No obstante se observó que la vacuna M-TT no sólo es capaz de generar una respuesta inmune robusta, sino que también los títulos de anticuerpos obtenidos fueron mayores que los que habían sido reportados con anterioridad en estudios de inmunogenicidad para otras vacunas antidrogas probadas en ratas, siendo casi de un orden de magnitud mayor que los mejores títulos obtenidos en estudios de vacunas administradas en humanos.

Por su naturaleza fisicoquímica, la morfina es una sustancia pobremente inmunogénica por sí sola, es por eso que se argumenta que los altos títulos de anticuerpos obtenidos al administrar dicha vacuna son obtenidos gracias al alto poder inmunogénico que posee el toxoide tetánico, el cual es la proteína acarreadora usada en la síntesis de la vacuna M-TT, así también la naturaleza química y la longitud del brazo espaciador le confiere a la morfina hapténizada la suficiente libertad espacial dentro del conjugado para volverse una vacuna altamente inmunogénica y antigénica<sup>5</sup>.

## **1.2 Efectos terapéuticos de la vacuna M-TT**

Para poder analizar los efectos terapéuticos de la vacuna M-TT es necesario mencionar las novedosas ventajas que ofrece en comparación con otras vacunas similares, incluida la formulada por Bonese y cols; la M-6-H BSA.<sup>26</sup>

Una ventaja estructural es el uso del toxoide tetánico como proteína acarreadora, que a su vez nos ofrece dos características importantes. La primera característica es, como ya se había mencionado con anterioridad en la presente tesis, es la alta capacidad inmunogénica que presenta esta proteína y, la segunda es que el uso del toxoide tetánico está permitido y regulado por la FDA.

La segunda ventaja estructural de la vacuna M-TT es la presencia de una cadena alifática de residuos de átomos de carbono que funciona como brazo espaciador, el cual es lo suficientemente larga para separar y al mismo tiempo unir en forma covalente la morfina a la proteína acarreadora usando dos puentes de amida que son bastante estables.

Los anticuerpos generados después de la inmunización con la vacuna M-TT no atraviesan la barrera hematoencefálica, en consecuencia se esperaría que los efectos de estos anticuerpos no fueran de naturaleza psicoactiva, es decir que los anticuerpos generados tras la inmunización con esta vacuna necesitan neutralizar la molécula de morfina antes de que atraviese la barrera hematoencefálica. Con base en lo anterior podemos mencionar que el uso de dicha vacuna puede coadyuvar en esquemas terapéuticos establecidos para el tratamiento de adicciones de morfina y heroína en donde se usan fármacos como la metadona, el levo- $\alpha$ -acetilmetadiol (LAA) o la buprenorfina.

Es así como el uso de la vacuna M-TT en combinación con otras terapias integrales que existen hoy en día, resulta una excelente alternativa para ayudar a controlar el problema de adicción a estos dos potentes opiáceos, y a su vez ser útil para reducir la duración del uso de los sustitutos adictivos, donde se ha observado que desarrollan efectos secundarios nocivos cuando se administran en largos periodos de tiempo, lo que influye directamente en el abandono de este tipo de tratamientos y como consecuencia, a la recaída en el consumo de estos dos opiáceos.

Cabe mencionar que, aunque recientes estudios sugieren que 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 adicionales dirigidos a evaluar los posibles efectos tóxicos que dicha vacuna pudiera llegar a tener en otras especies de animales experimentales, como por ejemplo conejos o primates. Sin embargo, se debería implementar un programa de ensayos clínicos con el fin de evaluar la eficacia y la seguridad de la vacuna de M-TT en pacientes que voluntariamente desearan ser expuestos a estos tipos de pruebas.<sup>5</sup>

### **III. Planteamiento del problema y justificación**

Se ha reportado anteriormente (Anton y cols. 2009) que la aplicación de la vacuna denominada M-TT genera altos títulos de anticuerpos en roedores sometidos a programas de vacunación compuestos por cinco-seis reinmunizaciones separadas cada una de ellas por 14 días. Por otro lado se ha sugerido que el sistema de producción de anticuerpos requiere de tiempos prolongados para poder generar cantidades significativas de anticuerpos. De tal forma que sería importante determinar el tiempo adecuado entre cada re-inmunización para generar los títulos de anticuerpos más altos, con el fin de proponer el uso del programa de vacunación activa en protocolos clínicos.



#### **IV. Hipótesis**

La aplicación de 100 mg de la vacuna M-TT por vía subcutánea en los 3 grupos de ratones BALB/c en intervalos de tiempo de 7,15 y 30 días respectivamente, generarán títulos de anticuerpos máximos de entre 1:60,000 y 1:100,000, determinados por la prueba ELISA indirecta.

## V. Objetivo

El objetivo del siguiente trabajo es determinar el periodo entre cada re-inmunización con la vacuna M-TT que genere los títulos de anticuerpo más altos.

## **VI. Materiales y Métodos**

En el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica del Instituto de Psiquiatría Ramón de la Fuente se llevó a cabo, por parte del grupo de químicos orgánicos del laboratorio, la síntesis de un lote de vacuna M-TT liofilizada, y fue conservada a 4°C <sup>29</sup>.

### **Animales**

Para llevar a cabo este proyecto de investigación fue necesario el uso de animales de experimentación. Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c con un peso inicial de entre 15g y 18g. Los ratones se colocaron en 3 grupos de ocho individuos divididos en 2 cajas, cada una con cuatro sujetos experimentales. Las cajas son de acrílico transparente (57 cm X 35 cm X 20 cm) y se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 40 a 50% de humedad bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12. Los animales tuvieron acceso continuo a alimento y agua excepto durante las sesiones experimentales. Todos los experimentos se realizaron durante la fase de luz del ciclo luz-oscuridad (entre las 9:00 AM y las 6:00 PM).

## **A. Justificación y planteamiento de los diferentes tiempos de reinmunización de la vacuna M-TT.**

Con la finalidad cumplir el objetivo de la presente tesis, se procedió a desarrollar 3 diversos esquemas de vacunación usando la vacuna M-TT, cada uno de los cuales tiene diferente tiempo de re-inmunización; 7 días, 15 días y 30 días respectivamente.

### **Diseño experimental**

Para poder iniciar el estudio la vacuna M-TT liofilizada fue sintetizada por el grupo de químicos orgánicos del laboratorio de neurobiología Molecular y Neuroquímica de las adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” y, posteriormente, fue reconstituida con 1ml de agua inyectable con la finalidad de obtener 10 dosis de 0.1ml de vacuna M-TT.

La vacuna fue inoculada por vía subcutánea en la región inguinal del ratón. La dosis utilizada de la vacuna M-TT es de 100µg por ratón inoculando así 0.1ml de vacuna liofilizada <sup>5</sup>.

Como ya se había mencionado anteriormente se utilizaron 24 ratones macho de la cepa BALB/c. Estos ratones fueron divididos en 3 grupos experimentales (n=8) y cada grupo recibió un esquema de vacunación distinto, teniendo como variante el

tiempo entre cada re-inmunización. De tal forma los grupos experimentales quedan de la siguiente manera:

- Grupo 1: M-TT 7 días
- Grupo 2: M-TT 15 días
- Grupo 3: M-TT 30 días

Cabe señalar que antes de la primera inmunización de cada grupo se obtuvo una muestra sanguínea denominada muestra preinmune. Esta muestra tiene como finalidad funcionar como “control” de las re-inmunizaciones posteriores.

	<b>Gpo 7 Días</b>	<b>Gpo 15 Días</b>	<b>Gpo 30 días</b>
<b>Preinmune</b>	12 de abril	05 de abril	05 de abril
<b>1er muestra</b>	19 de abril	19 de abril	03 de Mayo
<b>2da muestra</b>	26 de abril	03 de Mayo	31 de Mayo
<b>3ra muestra</b>	03 de Mayo	17 de Mayo	28 de Junio
<b>4ta muestra</b>	10 de Mayo	31 de Mayo	26 de Julio
<b>5ta muestra</b>	17 de Mayo	14 de Junio	25 de agosto

Cuadro 2.- Esquema de vacunación de los tres grupos experimentales

La muestra sanguínea es obtenida por la vena caudal del ratón, haciendo una incisión en la punta de la cola, obteniendo aproximadamente 250µl de sangre.

Posterior a cada toma de muestra, la sangre fue centrifugada a 4000 RPM durante 5 minutos, con la finalidad de separar el suero del coagulo sanguíneo. Los sueros fueron identificados y conservados en congelación a -20°C.

**B. Monitoreo de la respuesta inmune humoral contra morfina/heroína:  
Determinación de títulos de anticuerpos en sueros de ratones de la cepa BALB/c, inmunizados contra morfina/heroína, por ensayos de ELISA por captura de anticuerpo.**

Una vez obtenidos los sueros de cada una de las inmunizaciones, se llevó a cabo su análisis mediante ensayos de ELISA indirecta para determinar el potencial inmunogénico de cada re-inmunización.

Por último, una vez que se hubieron realizado los ensayos de ELISA, las placas de 96 pozos en donde se realizaron dichos ensayos, se llevaron al lector de placas de ELISA, donde se leyeron a una longitud de onda de 490 nm con el fin de determinar las densidades ópticas correspondientes a cada una de estas placas, y así obtener los datos que se usaron en la elaboración de los gráficos para determinar el titulo de anticuerpos (Abs) de cada una de las muestras experimentales, por medio de programas computacionales como MICROSOFT Excel® y ORIGIN®.

Con la elaboración de dichos gráficos y la posterior obtención del título de Abs correspondiente a cada muestra obtenida, se monitoreó la capacidad inmunogénica de cada re-inmunización con la vacuna M-TT que se estudiaron durante la realización de este protocolo experimental.

### **C. Protocolo general para realizar el ensayo de ELISA indirecta <sup>30</sup>.**

- 1) Para poder realizar los ensayos ELISA es necesario preparar una solución de fosfatos (PBS) y una solución de fosfatos con gelatina de teleósteo y Tween 20 (PBS-GT)

Las cantidades de reactivos a utilizar para preparar un volumen de 1.0 L de solución PBS son:

- ✓ Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )= 3.1g
- ✓ Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )= 10.9 g
- ✓ Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )= 9.0 g

Para la realización de 1.0L la solución PBS-GT se utilizaron las mismas cantidades de reactivos y solo se le adiciona gelatina de teleósteo y Tween 20 a razón de las siguientes cantidades:

- ✓ Gelatina de teleósteo= 10ml
- ✓ Tween 20= 3ml

3) Se hace el ajuste de pH 8 a la solución PBS con el uso del potenciómetro, agregando NaOH (10M) asegurándose de que el potenciómetro esté debidamente calibrado y limpio antes de su uso.

4) Se agrega 1  $\mu\text{g}$  de fase sólida (BSA-Mor) / pozo. Entonces para 100 pozos se necesitan 100  $\mu\text{g}$  de fase sólida.

5) Tratamiento de la solución de fase sólida 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 y se deja en agitación moderada 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) Se aplica 100  $\mu\text{L}$ / pozo de solución de PBS 0.1 M, pH= 8.0/Fase sólida.

7) Se adiciona el volumen requerido de solución de fase sólida BSA-Mor a 10.0 mL de solución PBS 0.1 M pH= 8.0.

8) Se adiciona a la placa de ELISA 100  $\mu\text{L}$  de solución PBS 0.1 M pH= 8.0 + BSA-Mor por pozo con la ayuda de una pipeta multicanal.



9) Se cubre la placa con parafilm y dejar incubando en refrigeración a 4° C por toda la noche (ON).

10) Al día siguiente a la incubación, se lava la placa de ensayo 5 veces con buffer PBS-GT de ELISA.

11) El 5to lavado se deja en la placa de ELISA, se recubren las placas con parafilm y se dejan incubar a temperatura ambiente y en agitación para facilitar la fase de bloqueo de los sitios no activados con el PBS-GT por 60 min.

12) Preparación del tren de dilución.

- Suero preimmune (Spl). Se hace una dilución décuple seriada iniciando con una dilución 1:100.- y terminando con un 1:10,000 en un volumen final de 500 µL con PBS-GT.

13) Al término del bloqueo de los sitios no activados, se retira el exceso de PBS-GT y se aplican 100 µL de cada dilución de antisueros (tren de dilución) por duplicado en la placa de ELISA.

14) Al término de la adición de las diluciones de antisueros se cubre cada placa con parafilm y se lleva a refrigeración a 4 °C (ON).

15) Al día siguiente se lavan las placas 5 veces con PBS-GT y se reserva el 5to lavado.

16) Se preparan los 2° Ab anti-ratón (ANTI-MOUSE IgG [whole molecule] Peroxidase Conjugate, Marca SIGMA. CAT. No.: A4416, LOT: 067 K6004).

En 10 mL de Buffer de ELISA frío se adicionan 2  $\mu$ L de 2° Ab anti-ratón.

17) Con una pipeta multicanal se aplican 10 mL de dilución 1:5000 del 2° Ab, a temperatura ambiente y se agita por 2 horas continuas.

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

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

20) Se adiciona 1 tableta de OPD al buffer y agitar con vortéx.

21) En condiciones de semioscuridad se aplica con una pipeta multicanal a cada placa 100  $\mu$ L de solución de OPD y se cubre la placa con papel aluminio.

23) Se toman lecturas de las absorbancias a 490 nm por encima de los pozos a los 20 y 60 min de haber aplicado la solución de OPD y posteriormente se realizan las debidas gráficas con los valores de las absorbancias obtenidas, para determinar el valor aproximado del título de Abs, de cada una de las muestras.

## VII. Resultados

Una vez terminado el esquema de vacunación y con la ayuda de las gráficas de absorbancias obtenidas por medio de ensayos ELISA, se determinó el título de anticuerpos de cada grupo por medio del programa ORIGIN ®, mismos que fueron graficados para su fácil análisis.

La siguiente figura es solo un ejemplo de todas las absorbancias obtenidas de cada sangrado de cada grupo. Es importante resaltar que solo ilustra la manera en que las absorbancias son graficadas y para efectos de éstas se tomó como referencia el segundo sangrado del grupo de 7 días.

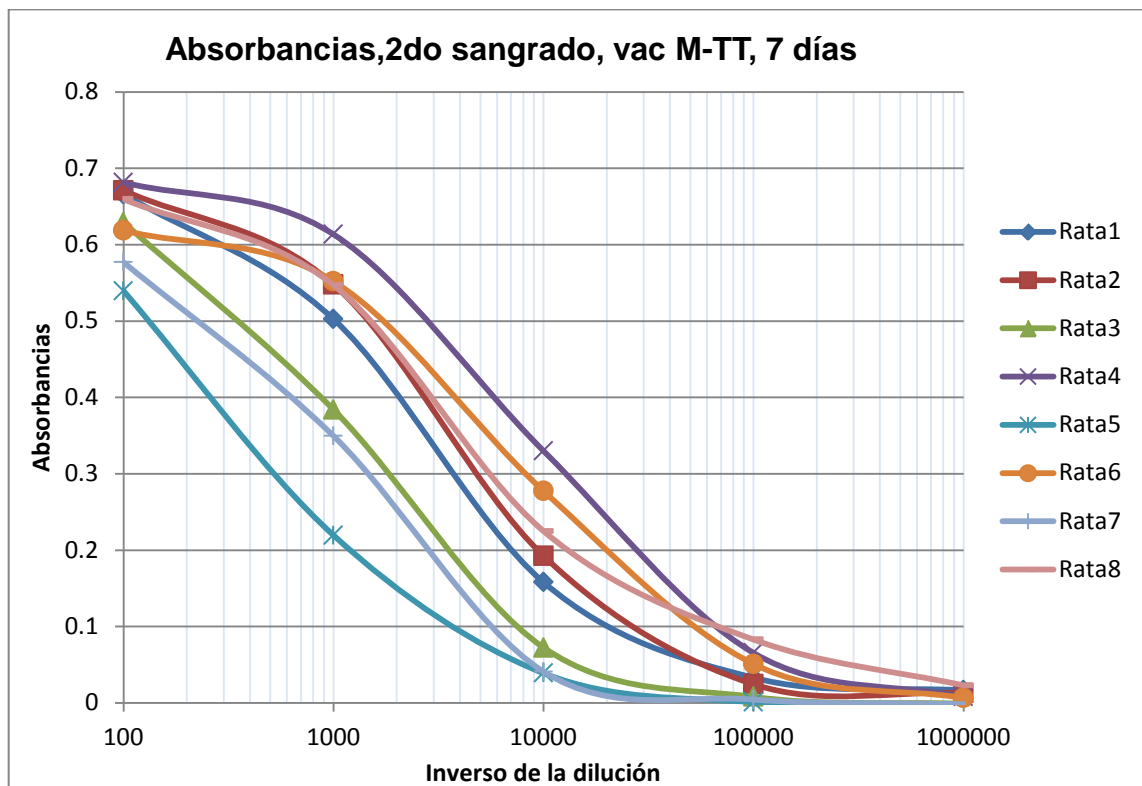


Figura 5.- Ejemplo de gráfica de absorbancias

### Descripción de las gráficas.

A continuación se muestran las gráficas de los títulos de anticuerpos obtenidos para cada grupo de investigación después de su análisis en el programa ORIGIN

®:

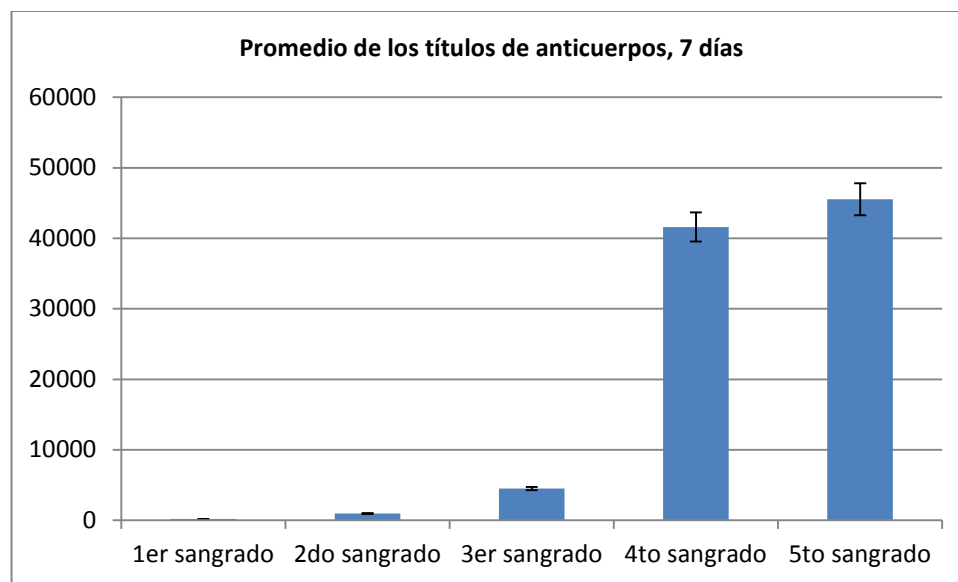


Figura 6.- Gráfica que ilustra el promedio de título de anticuerpos de cada muestra sanguínea en el grupo de 7 días.

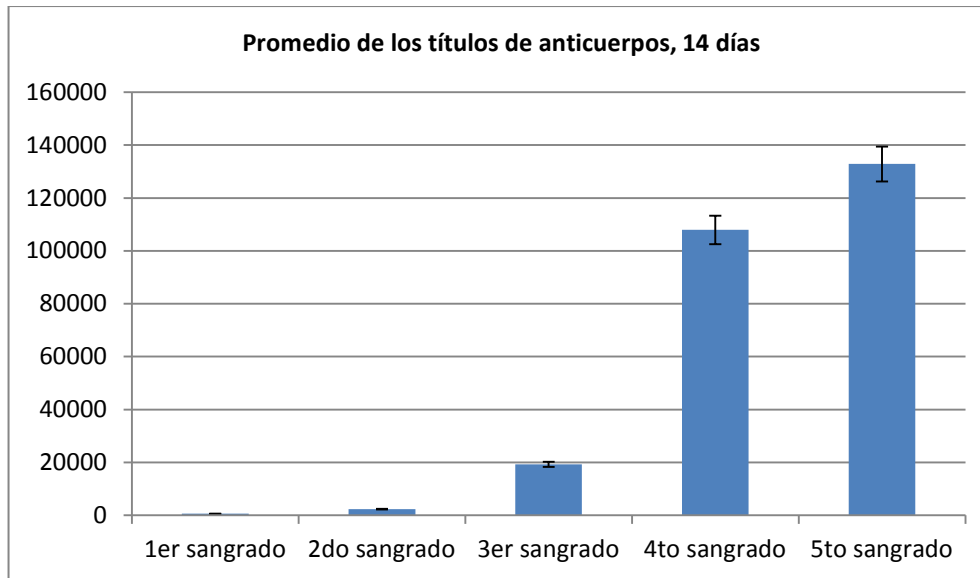


Figura 7.- Gráfica que ilustra el promedio de titulo de anticuerpos de cada muestra sanguínea en el grupo de 14 días.

En las gráficas de barras que se establecen en las figuras 6 y 7 se puede analizar que en el primero, segundo y tercer sangrado el titulo de anticuerpos es muy bajo comparativamente con el sangrado que mayor titulo registró, que en ambos casos es el quinto sangrado, mientras que a partir del cuarto sangrado la respuesta inmunológica parece haber sido activada de manera más eficiente y en consecuencia se ha establecido la respuesta inmune.

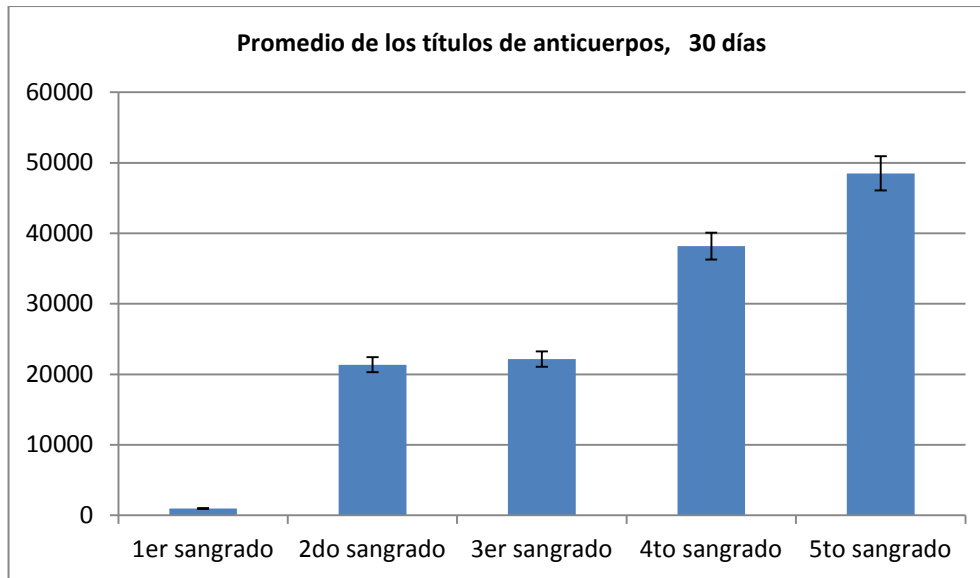


Figura 8.- Gráfica que ilustra el promedio de título de anticuerpos de cada muestra sanguínea en el grupo de 30 días.

En la figura 8 la gráfica de barras a diferencia de las anteriores demuestra que la respuesta inmune se empieza a establecer a partir del segundo sangrado comparativamente con el sangrado que mayor título de anticuerpo obtuvo, que en este caso es el 5to sangrado. Para constatar estas comparaciones se realizaron pruebas estadísticas que más adelante se mencionarán.

**Análisis estadístico de los resultados por medio de programas computacionales.**

Después de revisar los títulos de anticuerpos es necesario realizar el análisis estadístico ANOVA de una vía con ayuda de un programa computacional llamado

STATISTICS® versión 3.1

Con la finalidad de facilitar el procedimiento y manejo de los datos que se ingresaron al programa computacional para realizar las pruebas estadísticas, se decidió tomar en cuenta los siguientes criterios en los cuales se basó todo el análisis estadístico de los resultados.

I. Criterio para determinar el grado de estabilidad inmunogénica de cada uno de los grupos de tiempo respuesta: **“Que no haya diferencias significativas entre dos titulaciones consecutivas.”**

II. Criterio para determinar el valor máximo de título de Abs generado por cada grupo de tiempo respuesta: **“El valor máximo de título de Abs, será aquél valor promedio de título de Abs significativamente más alto, independientemente del número de inmunización al cual se logre”**

Con base en los criterios anteriores, podemos inferir que el mejor grupo experimental para la vacuna M-TT, será aquel que genere los títulos más altos de Abs y que en las dos últimas inmunizaciones el coeficiente de variación no sea mayor al 5%.

En cuanto al tipo de pruebas estadísticas, se realizó una ANOVA de 1 VÍA para hacer las comparaciones entre los títulos promedio del primero al quinto sangrado de cada uno de los grupos experimentales. Para poder comparar entre cada uno

de los distintos grupos experimentales, se realizó una ANOVA de 2 VÍAS. Si la ANOVA resulta significativa se realizó una prueba de Tukey, con la que se determinaron las diferencias significativas entre los grupos.

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

### **Evaluación de los grupos experimentales por ANOVA de una vía.**

Grupo 7 días.-

La ANOVA de 1 vía encontró diferencias significativas entre los grupos ( $F= (6) 47.13$ ,  $p>0.0001$ ). La prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test  $p>0.0001$ ), 2do (Tukey test  $p>0.0001$ ), y 3er sangrado (Tukey test  $p>0.0001$ ). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to y 5to sangrado (Tukey test NS  $p=1$ ). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.



Tukey HSD test; variable D (tiempo.sta)					
Probabilities for Post Hoc Tests					
MAIN EFFECT: A					
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	179	955.75	4509.375	41600.13	47612.13
1 {1}		0.999999	0.988067	0.000141	0.000141
2 {2}	0.999999		0.995893	0.000141	0.000141
3 {3}	0.988067	0.995893		0.000141	0.000141
4 {4}	0.000141	0.000141	0.000141		0.939616
5 {5}	0.000141	0.000141	0.000141	0.939616	

Cuadro 3.- Resultados estadísticos después de realizar la prueba de Tukey al grupo de 7 días

#### Grupo 14 días.-

Para el segundo grupo de investigación, es decir, el grupo de 14 días después de realizar la prueba ANOVA de 1, se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F = (6) 114.95$ ,  $p > 0.0001$ ). Posteriormente la prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test  $p > 0.0001$ ), 2do (Tukey test  $p > 0.0001$ ) y 3er sangrado (Tukey test  $p > 0.0001$ ). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to y 5to sangrado (Tukey test NS  $p = 1$ ). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.

Tukey HSD test; variable F (tiempo.sta)					
Probabilities for Post Hoc Tests					
MAIN EFFECT: A					
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	597.375	2307	19256	107939.8	132862.6
1 {1}		0.999998	0.497393	0.000141	0.000141
2 {2}	0.999998		0.609294	0.000141	0.000141
3 {3}	0.497393	0.609294		0.000141	0.000141
4 {4}	0.000141	0.000141	0.000141		0.173874
5 {5}	0.000141	0.000141	0.000141	0.173874	

Cuadro 4.- Resultados estadísticos después de realizar la prueba de Tukey al grupo de 14 días

Grupo de 30 días.- La ANOVA de 1 vía encontró diferencias significativas entre los grupos ( $F = (6) 30.48$ ,  $p > 0.0001$ ). La prueba de Tukey encontró que el 4to y 5to sangrado muestra diferencias significativas con respecto al 1ro (Tukey test  $p > 0.0001$ ), 2do (Tukey test  $p > 0.0001$ ) y 3er sangrado (Tukey test  $p > 0.0001$ ). Sin embargo no reveló diferencias significativas entre el 4to y 5to sangrado (Tukey test NS  $p = 1$ ). Lo cual sugiere que a partir del cuarto sangrado se establece la respuesta inmunogénica.

Tukey HSD test; variable H (tiempo.sta)					
Probabilities for Post Hoc Tests					
MAIN EFFECT: VAR7					
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	945	21363.63	22154.88	38174.38	48490.25
1 {1}		0.001008	0.000655	0.000126	0.000126
2 {2}	0.001008		0.99982	0.007905	0.000134
3 {3}	0.000655	0.99982		0.012321	0.000141
4 {4}	0.000126	0.007905	0.012321		0.196777
5 {5}	0.000126	0.000134	0.000141	0.196777	

Cuadro 5.- Resultados estadísticos después de realizar la prueba de Tukey al grupo de 30 días

### **Evaluación de los grupos experimentales por ANOVA de 2 vías.**

Una vez realizado el análisis estadístico ANOVA de una vía para determinar si estadísticamente la diferencia de los títulos de anticuerpos intra-grupos fue significativa o no, se continúa con en análisis estadístico inter-grupos para determinar las diferencias estadísticas entre los sangrados de cada grupo que obtuvieron mayor título de anticuerpos.

Para determinar el grupo que genera mayor título de anticuerpos se muestra a continuación una gráfica que facilita su análisis.

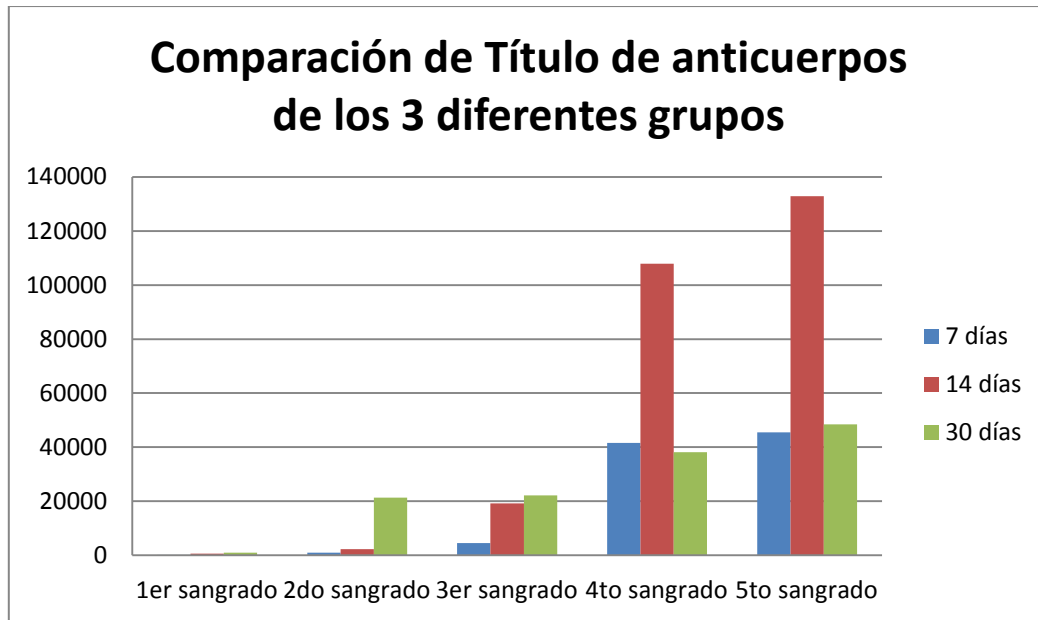


Figura 9.- Gráfica de barras comparativa donde se muestran los títulos de anticuerpos de los diferentes grupos de investigación.

La prueba ANOVA de 2 vías reveló diferencias significativas entre los grupos (Grupo  $F = (6) 184.38$   $p < 0.001$ ), Tiempo (Grupo  $F = (3) 419.25$   $p < 0.001$ ) y encontró diferencias en la interacción de estos grupos ( $F = \text{Grupo} \times \text{Tiempo} (18) 51.43$   $p < 0.001$ ).

Haciendo el análisis estadístico comparando los sangrados que obtuvieron el mayor título de anticuerpos la prueba Tukey test encontró que el 5to sangrado del grupo de 7 días y 30 días muestran diferencias significativas con el 5to sangrado del grupo de 14 días (Tukey test  $p > 0.0001$ ). Sin embargo, no reveló diferencias significativas entre el 5to sangrado del grupo de 7 días y el 5to sangrado del grupo de 30 días (Tukey test NS  $p = 1$ ).

## VIII. Discusión

Las adicciones a psicotrópicos de origen opioide se han ido incrementando gradualmente en los últimos años. Si bien en México el consumo de morfina y heroína no rebasa el consumo de marihuana y cocaína, la necesidad de efectuar y plantear un esquema médico e integral de apoyo a personas adictas es fundamental en el desarrollo actual del país.<sup>18</sup>

El presente estudio demuestra que los tiempos de reinmunización de la vacuna M-TT son esenciales para establecer un programa óptimo y eficaz de vacunación y así obtener títulos de anticuerpos suficientes para contrarrestar los efectos de estos opiáceos.

Cabe señalar que las gráficas registradas de los tres grupos de investigación nos demuestran en primera instancia una curva de forma sigmoidea, es decir que las células encargadas de la respuesta inmune van madurando progresivamente, según se va inmunizando, hasta alcanzar su pico máximo de maduración<sup>5</sup>.

Si bien en los tres grupos de investigación se obtuvo una curva de forma sigmoidea, el segundo grupo, el grupo de 14 días obtuvo el mayor título de anticuerpos y esto se debe presumiblemente a que en el sistema inmunológico el procesamiento del antígeno, la escasa frecuencia inicial de las células T y de las células B específicas al antígeno, y la necesidad de su expansión llevan un tiempo

de latencia de 10 días promedio <sup>18</sup> para poder alcanzar concentraciones séricas máximas de anticuerpos, es decir las células inmunológicas en presencia del antígeno de morfina y heroína maduran en su mayoría en intervalos de vacunación de 14 días, lo cual confirma el tiempo entre cada inmunización que empleó Anton y cols., en su artículo publicado en el 2002 al diseñar la vacuna M-TT que fue de 14 días alcanzando un promedio de títulos de anticuerpos similar a los presentados en el presente trabajo.

Es importante hacer énfasis en el objetivo primordial de la vacuna M-TT, el cual es en primera instancia actuar de manera terapéutica coadyuvando en un esquema integral para la ayuda de personas con adicción. En el entendido que una terapia anti adictiva tiene tiempos muy prolongados y variados de duración dependiendo del grado de adicción y de la voluntad del paciente que van desde los 6 meses hasta 2 años o más, los tiempos entre cada reinmunización toman mayor importancia puesto que es necesario que los anticuerpos se mantengan latentes durante toda una terapia anti adictiva para poder así considerarse una vacuna altamente efectiva contra morfina y heroína.

## **IX. Conclusiones**

Después del análisis de las gráficas de título de anticuerpos y basados en el análisis estadístico descrito anteriormente, se concluye que el grupo de ratones de la cepa BALB/c inmunizado con la vacuna M-TT que generó mejor título de anticuerpos fue el grupo de 14 días.

Prospectiva:

El panorama es promisorio para poder cumplir el objetivo de la vacuna M-TT. Así surgen propuestas para poder continuar avanzando con el estudio clínico de esta vacuna. Una de ellas es que la vacuna sea probada en diferentes especies animales como conejos o inclusive en primates no humano de la especie *Macacus Rhesus* para poder validar aun más sus resultados y extrapolarlos a los humanos.

Otra propuesta necesaria para poder continuar con las investigaciones sobre esta vacuna es la necesidad de confirmar la especificidad de los anticuerpos producidos por esta vacuna, lo cual se puede lograr desafiando a los ratones previamente inmunizados contra morfina y heroína y así asegurar la efectividad de la misma.

Si bien el desarrollo de la vacuna M-TT es un importante avance biotecnológico, existe un largo camino por recorrer y estudiar antes de que sea usado en humanos.



## X. Referencias bibliográficas

1. Hser Y, Hoffman V, Grella C, Anglin M. A 33-year follow-up of narcotics addicts. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 503-8
2. Healey A, Knapp M, Marsden J, Gossop M, Stewart D. Criminal outcomes and costs of treatment services for injecting and non-injecting heroin users: evidence from a national prospective cohort survey. *J Health Serv Res Policy* 2003; 8:134-41
3. Robert EH, Stuart C. *Tratado de Psiquiatría* 2da edición. Editorial Ancora S.A.;
4. Héctor SL, Luis OC. *Farmacología Veterinaria*. 3ra ed. Mc Graw Hill 2007.
5. B. Anton, Vaccine against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors. *Landes Bioscience*, abril 2009 214-229
6. Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258: 1952-5
7. Kieffer BL. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20:19-26
8. O' Brien CP. Drug Abuse, In: Hardman JG, Limbird LE, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York NY. McGraw Hill 2001; 621-42
9. Ghodse AH, Reed JL. Gastric emptying, glucose tolerance and associated hormonal changes in heroin addiction. *Psychol Med* 1984; 14: 521-5.

10. Gutstein, BH Akil H. Opioid Analgesics, In: Hardman JG, Limbird LE, eds. The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York NY. McGraw Hill 2001; 569-619.
11. Inturrisi CE, Max MB, Foley KM, Schultz M, Shin SU, Houde RW. The pharmacokinetics of heroin in patients with chronic pain. N Engl J Med 1984; 310: 1213-7
12. Kamendulis LM, Brzezinski MR, Pindel EV, Bosron WF, Dean RA. Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases. J Pharmacol Exp Ther 1996; 279:713-7
13. National Institute on Drug Abuse. La Heroína, U.S Department of Health and Human Services 2010 enero. Disponible en: URL : <http://www.drugabuse.gov.htm>
14. Rehm J, Fischer B, Haydon E. Reducing the Risks, Harms and Costs of HIV/AIDS and Injection Drug Use: A Synthesis of the Evidence Base for Development of Policies and Programs. Background Paper # 4. 2nd Annual Background Dialogue on HIV/AIDS. Warsaw: Health Canada /UNAIDS/Canadian International Development Agency 2003.
15. Smith JE, Co C, Collier MD, Hemby SE, Martin TJ. Self-administered heroin and cocaine combinations in the rat: additive reinforcing effects-supra-additive effects on nucleus accumbens extracellular dopamine. Neuropsychopharmacology 2006; 31:39-50
16. Wiessing L, Roy K, Sapinho D, et al. Surveillance of Hepatitis C Infection Among Injecting Drug Users in the European Union. In: Jager J, Limburg W,

- Kretzschmar M, Postma M, Wiessing L, eds. EMCDDA Monographs: Hepatitis C and Injection Drug Use: Impact, Costs and Policy Options. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2004
17. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Adicciones 2008. Enero 2008. Disponible en: URL: [http://www.insp.mx/images/stories/Produccion/pdf/100722\\_cp8.pdf](http://www.insp.mx/images/stories/Produccion/pdf/100722_cp8.pdf)
18. Abul KA, Andrew H. Inmunología Celular y Molecular 6ta edición. Elsevier Saunders 2009.
19. Inmunología. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Janis Kuby. 5a Ed. Mc Graw Hill. 2006.
20. Inmunología (de memoria) 2da edición, Oscar Rojas- Espinosa. Edit, editorial médica panamericana 2002.
21. Inmunología Biología y patología del sistema inmune. 3a edición. JR Regueiro. C López. Edit. Editorial médica panamericana.
22. 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*.
23. Vogel FR, Powell MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ, editors. Vaccine design. New York: Plenum Press, 1995.
24. Vogel FR, Powell MF, Alving CR. A compendium of vaccine adjuvants and excipients <http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf>.

25. El sistema inmune. Peter Pattam. 3ª edición Edit. Manual moderno, 2011.
26. Bonese KF, Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM, Schuster CR. 1974. Changes in heroin self administration by a rhesus monkey after morphine immunisation. *Nature* 1974; 252: 708-10
27. Dennehy PH. 2001. Active immunization in the United States: developments over the past decade. *Clin. Microbiol Rev.* 2001; 14:872-908
28. Van Regenmortel MHV. 2001. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals.* 2001; 29:209-13
29. Jiménez Juárez, Victor. (2011). *Ensayos para la determinación de la potencia inmunogénica de tres distintos fórmulados de la vacuna M-TT*. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
30. S. Hockfield, et al., Molecular Probes of the Nervous System vol. 1, USA 1993.