



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL
A DOS INMUNOCONJUGADOS CONTRA SUSTANCIAS
OPIOIDES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

RICARDO JESÚS HERNÁNDEZ MIRAMONTES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

VOCAL: **Profesora: NOHEMI SALINAS JAZMÍN**

SECRETARIO: **Profesora: SILVIA SUSANA MARTIÑÓN GUTIÉRREZ**

1er. SUPLENTE: **Profesora: ROSA CAMACHO SANDOVAL**

2° SUPLENTE: **Profesor: LUIS ÁNGEL FLORES MEJÍA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE
LA FUENTE MUÑIZ**

ASESOR DEL TEMA: DRA. SILVIA SUSANA MARTIÑÓN GUTIÉRREZ _____

SUSTENTANTE: RICARDO JESÚS HERNÁNDEZ MIRAMONTES _____

DEDICATORIA

A MI MAMÁ, PAPÁ Y HERMANA: Gracias por estar ahí, en las buenas, en las malas y en las más malas, sin ustedes esto no hubiera sido posible. Han sido una gran guía en mi camino, un ejemplo de constancia y responsabilidad. Los amo.

A MI FAMILIA HERNÁNDEZ Y MIRAMONTES. Una parte fundamental en mi formación. Gracias por esos momentos de aprendizaje y jocosidad.

AL Dr. BENITO ANTÓN PALMA (†): Fue quien me dio la oportunidad de laborar en su equipo de investigación, me enseñó muchas cosas y fue parte muy importante de mi formación profesional.

A MI TUTORA Dra. SILVIA SUSANA MARTIÑÓN GUTIÉRREZ: Gracias por ser también parte importante en mi formación, por aceptar retomar mi trabajo de Tesis e impulsarme a no abandonarlo, por ser una gran guía en el aspecto laboral, gran jefa y una amiga incondicional.

A MIS HERMANOS DE VIDA: a José de Jesús, Edgar, Carlos, Saúl, Roberto, Aarón. Familia desde la preparatoria, amigos que siempre están ahí para lo que sea que necesitemos, desde un chiste, hasta una consulta, siempre con el cariño y apoyo de una verdadera familia.

AL Dr. ALBERTO SALAZAR JUÁREZ: Gracias por ser un maestro y apoyo en el laboratorio desde que comencé. Por seguir dándome la oportunidad de continuar laborando y aprendiendo.

A TODOS Y CADA UNO DE LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR Y NEUROQUÍMICA DE ADICCIONES: A todos los que han pasado por ahí, gracias por todos esos momentos en los cuales reímos y aprendimos. Mencionar a algunos sería injusto, todos me han dejado cierto porcentaje de experiencia.

A ELISABET RAMOS OCHOA: Gracias por haber sido un gran apoyo, compañera y amiga. El tiempo que laboramos juntos fue invaluable.

A TODOS MIS AMIGOS: Gracias por su amistad, su tiempo y por las buenas experiencias.

"Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas". Albert Einstein

"Nunca sabes lo fuerte que eres, hasta que ser fuerte es la única opción que te queda". Bob Marley

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
	1. Planteamiento del problema.....	2
	2. Hipótesis.....	4
	3. Objetivos	
	Objetivo general.....	5
	Objetivos particulares.....	5
	4. Pregunta de investigación.....	6
II.	ANTECEDENTES	
	1. Adicción.....	7
	1.a. Situación actual en México	8
	2. Vacunas contra morfina/heroína.....	8
	2.a. Estudios preclínicos sobre la generación de vacunas anti- morfina/heroína	9
	3. Descripción de las moléculas de morfina y heroína	11
	4. Farmacodinamia.....	14
	5. Vacunas.....	15
	5.a. Generalidades de las vacunas.....	16
	Elementos de una vacuna.....	17

Adyuvantes e inmunoestimulantes	18
6. Anticuerpos.....	19
6.a. Memoria	20
6.b. Isotipos de anticuerpos.....	21
III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
A. Monitoreo de la respuesta inmunológica humoral contra opioides: Determinación de títulos de anticuerpos en sueros de ratones de la cepa BALB/c, inmunizados contra morfina/heroína, mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) por captura de anticuerpo.....	24
IV. RESULTADOS.....	27
V. DISCUSIÓN.....	33
VI. CONCLUSIÓN.....	37
VII. PERSPECTIVAS.....	38
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	39

IX. APÉNDICE

A. Protocolo general para realizar el ensayo de ELISA por captura de anticuerpo..... 42

B. Gráfica de obtención de títulos de anticuerpos..... 46

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de sustancias adictivas se ha convertido en un problema de salud pública considerablemente peligroso tanto para las personas que las consumen como para la gente que las rodean.

La adicción a sustancias de abuso genera pérdidas en materias de salud, económicas, sociales e incluso de vidas, y es por ello que se buscan tratamientos que ayuden a controlar este síndrome adictivo.

Desde el punto de vista farmacológico, hay alternativas interesantes para el tratamiento de la adicción, aunque hasta ahora han sido insuficientes.

Ante la necesidad de nuevas alternativas eficaces, se han investigado otras formas de combatir este síndrome. La alternativa estudiada en este trabajo se hizo desde el punto de vista farmacológico.

No se pretende sustituir, al menos inmediatamente, las terapias ya existentes, sino ser parte de un tratamiento integral donde intervengan aspectos psicológicos, farmacológicos y con esta propuesta, inmunofarmacológicos.

En este trabajo se compararon dos inmunoconjugados sintetizados con diferentes proteínas acarreadoras acopladas a la molécula de morfina como hapteno. Después de haber completado un esquema de inmunización se evaluó la respuesta inmune humoral (concentración de anticuerpos específicos contra morfina y heroína) respecto al tiempo e inmunizaciones.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los seres humanos están sometidos a muchos y diversos estímulos ambientales propios de la sociedad moderna. Estos estímulos en muchas ocasiones generan en las personas alteraciones emocionales (ansiedad, estrés, depresión, entre otros); se ha sugerido que estas alteraciones pueden ser la causa por la que algunas personas busquen evadir y distorsionar la realidad, lo cual logran consumiendo drogas de abuso. El fenómeno dependencia-adicción genera diversos problemas económicos y sociales, como la desintegración familiar y la pérdida de los valores éticos y morales, la disminución del deseo de desarrollo en el ámbito educativo y laboral, así como una poca expectativa de poder lograrlo. Por lo tanto, la adicción es un problema que afecta tanto al consumidor como a todo su entorno, incluyendo la familia, trabajo, estado financiero y en muchos casos la vida misma de terceras personas que pudieran ser afectadas por la pérdida de conciencia del sujeto, un claro ejemplo sería un accidente automovilístico.

Es necesario el desarrollo de terapias integrales las cuales coadyuven al tratamiento de la adicción, como las terapias psicológicas y el tratamiento con fármacos. La propuesta en este trabajo es la de incluir una terapia inmunológica, a través de la inmunización activa.

La proteína acarreadora juega un papel fundamental para lograr este objetivo. Las moléculas de morfina y heroína tienen un peso molecular muy bajo, lo que les confiere la característica inmunológica de hapteno, para desarrollar una

respuesta inmunológica satisfactoria, es necesario unirlos a una proteína con alto peso molecular, a esta proteína le llamaremos proteína acarreadora.

En este estudio se emplearon dos proteínas acarreadoras, la propuesta por nuestro grupo es el toxoide tetánico fragmentado (ANB), contra la hemocianina de crustáceo (KLH), ya que es la proteína acarreadora más utilizada por diferentes grupos científicos.

2. HIPÓTESIS

El inmunos conjugado con base en toxoide tetánico (ANB) favorecerá una respuesta inmunológica de mayor duración en términos de título de anticuerpos que la obtenida con el inmunos conjugado basado en KLH.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la respuesta inmunológica humoral inducida por la inmunización con un inmunos conjugado con base en toxoide tetánico contra otro inmunos conjugado con base en hemocianina contra sustancias opioides.

Objetivos particulares

1. Determinar el título de anticuerpos específicos contra morfina/heroína generado a partir de la administración de ambos inmunos conjugados.
2. Evaluar la cinética de decaimiento de la respuesta inmunológica humoral.

4. Pregunta de Investigación

¿El uso de toxoide tetánico como proteína acarreadora favorecerá una respuesta inmune humoral superior en términos de título de anticuerpos en comparación con el uso de la hemocianina como proteína acarreadora?

II. ANTECEDENTES

1. Adicción

Hay un debate entre la comunidad científica por el uso de la palabra adicción, comúnmente se asocia o se reemplaza por la palabra dependencia, incluso por la Organización Mundial de la Salud y el DSM-V.

“El abuso de sustancias se refiere al consumo perjudicial y peligroso de sustancias psicoactivas como el alcohol y otras sustancias ilícitas que puede conducir al síndrome de dependencia. Este síndrome agrupa a un conjunto de fenómenos cognitivos, fisiológicos y del comportamiento que se desarrollan como resultado del uso repetido de estas sustancias y que incluye, de manera típica, un fuerte deseo de consumir la droga, dificultades en controlar su uso, persistencia en su uso a pesar de las consecuencias perjudiciales, una alta prioridad dada al consumo de drogas por sobre otras actividades y obligaciones, incremento en la tolerancia y, en ocasiones, un estado de abandono físico. Todo esto consecuencia de cambios neurobiológicos y neuroquímicos en ciertas áreas del cerebro debido al consumo de dichas sustancias”. (1)(23)(24).

1.a. Situación en México

En la encuesta nacional de adicciones se ha reportado que el consumo de sustancias ilegales ha ido en aumento a lo largo del tiempo. Según la encuesta nacional de adicciones de 2011, el consumo en adolescentes entre 12 y 17 años ha aumentado de un 0.7% de la población en 2002 a 1.5% en resultados de la última encuesta de 2011.

En el rubro de personas de 35 a 65 años ha aumentado de un 0.3% de la población a un 0.8%. Esto se puede explicar porque en las etapas más tempranas del desarrollo hay mayor plasticidad neuronal, por lo tanto, durante el primer consumo de alguna sustancia enervante se puede consolidar la conducta adictiva.
(2).

2. Vacunas contra morfina/heroína

Hace 46 años se hicieron los primeros esfuerzos por tratar este problema desde el punto de vista inmunológico, tratando de generar anticuerpos policlonales contra morfina. Ningún estudio reportó la evaluación del título de anticuerpos generado por las inmunizaciones. Sin embargo, otorgaron información suficiente para el desarrollo de conjugados inmunogénicos cuyo objetivo es disminuir el efecto de diferentes dosis de morfina-heroína, formando un complejo antígeno-anticuerpo en el torrente sanguíneo y así, evitar que permeen la barrera hematoencefálica, puesto que los anticuerpos, son moléculas proteicas muy

grandes y no permean la barrera hematoencefálica, y así evitar que se unan a los receptores μ , κ y δ del SNC para que no suceda la respuesta analgésica y eufórica esperada. (3)

2.a. Estudios preclínicos sobre generación de vacunas anti- morfina/heroína

Desde que se reportaron los primeros resultados para abordar el problema de la adicción a sustancias de abuso desde el punto de vista inmunológico, algunos grupos de investigación se han dado a la tarea de probar diferentes inmunocombinados, formados por diferentes proteínas acarreadoras con distintos haptenos. (Figura 1). (3)(4)(5)

Grupo de investigación	Año	Hapteno	Proteína acarreadora
Spector S y Parker CW.	1970	3-Ocarboxylmetil-morfina-1	BSA
Wainer BH y cols.	1973	Morfina-6-hemisuccinato	BSA
Spector S y cols.	1973	Daizotida-p-aminoacetanilida	BSA
Gross S y cols.	1974	Azomorfina	KLH

Comparación de la respuesta inmune humoral a dos inmunoconjugados contra sustancias opioides

Koida M y cols.	1974	Morfina-3-glucuronido	BSA
Morris B y cols.	1975	N-succinil-normorfina	BSA
Findlay J y cols.	1981	N-carboxipropil-morfina	BSA
Usagawa T y cols.	1993	N-aminobutil-morfina	BSA
Beike J y cols.	1998	N-aminopropil-morfina	BSA
Anton B y cols.	2006	Morfina-6-Hemisucinato	Toxoide Tetánico
Kosten R y cols.	2013	6-succinil morfina	KLH
Janda y cols.	2013	Morfina Heroína	KLH

Figura 1. Recopilación de grupos de investigación que han trabajado con distintos modelos de acoplamiento, tomando como base una proteína acarreadora y un hapteno diferente.

3. Descripción de las moléculas de morfina y heroína

Morfina

La morfina es un alcaloide muy potente del tipo de las bencilisoquinolinas, extraída del opio, la cual se obtiene de la planta de la amapola (*Papaver somniferum*), es el compuesto mayoritario (más del 10%) de este extracto junto con otros compuestos estructuralmente análogos como la codeína, tebaína y papaverina. (6)

Actúa directamente sobre los receptores opioides μ , κ y δ en el sistema nervioso central (SNC). Produce analgesia, euforia, sedación, disminución de la capacidad de concentración, náuseas, sensación de calor en el cuerpo, pesadez en miembros, sequedad de boca, prurito, depresión respiratoria dosis dependiente por medio de un efecto depresor directo sobre el centro de la respiración en el cerebro, disminuye el flujo sanguíneo cerebral y la presión intracraneal con ventilación controlada. (7)

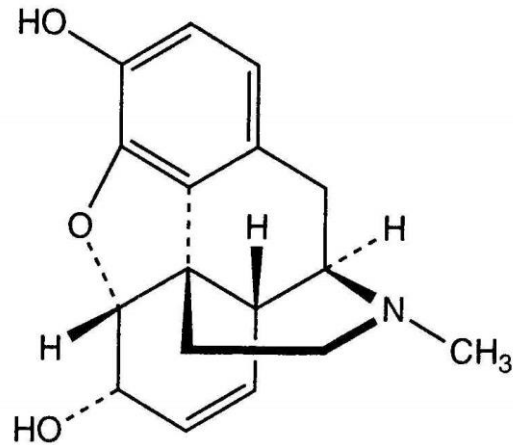


Figura 2. Molécula de Morfina

Heroína

La heroína es una sustancia opiode ilegal con un perfil altamente adictivo.

Por su estructura química se conoce como morfina 3,6-diacetilester o 3,6-diacetil morfina. Es el opiáceo de mayor consumo a nivel mundial. Se vende comúnmente en forma de polvo blanco o marrón, o como una sustancia negra pegajosa conocida popularmente como "goma". Además de lidiar con la adicción a esta sustancia, los consumidores se enfrentan a que los distribuidores muchas veces utilizan sustancias como azúcar, almidón, talco, leche en polvo y quinina para poder incrementar la cantidad del producto y obtener más ganancias, lo cual también es dañino para la salud.

La vía de administración más común de la heroína es intravenosa puesto que el efecto causado, una oleada de euforia conocida como "rush", es de mayor intensidad y de efecto casi inmediato, a diferencia de la administración intramuscular, el cual tarda de 5 a 8 minutos en producir el efecto deseado. (6).

Cuando es inhalada o se fuma, generalmente se sienten sus efectos máximos de 10 a 15 minutos. (8)

Los principales efectos farmacológicos de la heroína se derivan de las propiedades de la molécula de morfina puesto que tienen una analogía estructural importante, la morfina posee 2 hidroxilos en las posiciones 3 y 6 del anillo fenólico, la heroína tiene 2 grupos acetilo en las mismas posiciones y actúa también sobre los receptores opioides μ , κ y δ . (9)

Las 2 producen analgesia, hipotermia, sedación, inhibición de la motilidad intestinal y depresión del sistema inmunológico. La heroína posee la capacidad de permear más rápidamente la barrera hematoencefálica debido a que su coeficiente de partición es más cercano a 1 en comparación con la morfina que es más hidrofílica, lo que permite a la heroína llegar a sus sitios blancos en el cerebro antes de llegar al hígado y metabolizarse. La heroína al desacetilarse se transforma en morfina, por lo que sus metabolitos son los mismos.

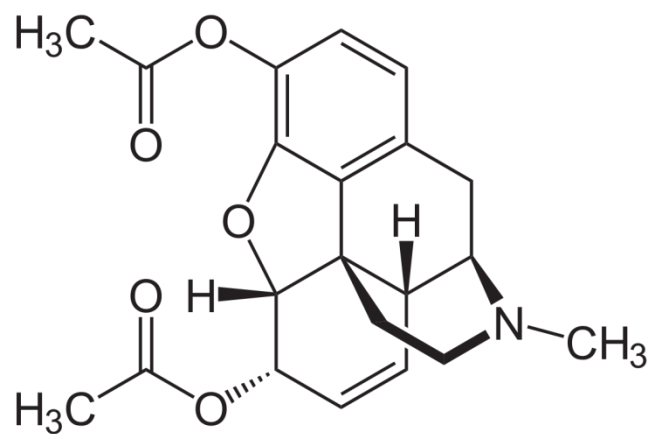


Figura 3. Molécula de heroína

4. Farmacodinamia

La morfina actúa sobre los receptores mu (μ), kappa (κ) y delta (δ), a los que se fijan los péptidos opioides endógenos (endorfinas, encefalinas y dinorfinas). Los efectos analgésicos de la morfina (y la heroína) son consecuencia principal del acoplamiento a los receptores mu (μ). (10)

Algunos estímulos dolorosos como inflamación aguda o crónica, lesiones en los nervios por estímulos nocivos de tipo mecánico, térmico o químico son responsabilidad de los receptores opioides, en donde también participan algunas estructuras neurales. Los cuales intervienen en mecanismos modulatorios diferentes. (11)

La morfina, y por lo tanto la heroína, son agonistas exógenos de los receptores opioides. Son metabolizadas principalmente en el hígado por conjugación enzimática. Los metabolitos resultantes son el 3-glucurónido morfina y el 6-glucurónido morfina. De estos dos metabolitos, solo el 6-glucurónido morfina, el cual representa el 15% del metabolismo de la morfina, posee actividad biológica similar, aunque por su coeficiente de partición no permea la barrera hematoencefálica. El 3-glucurónido morfina, a pesar de ser el principal producto del metabolismo (50%) no posee actividad analgésica. (12).

Como se ha mencionado, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica es uno de los factores farmacocinéticos relevantes para generar una recompensa

placentera y así, desarrollar efectos reforzantes importantes al consumo reiterado de estas sustancias. (13).

5. Vacunas

La primera vacuna la ideó Edward Jenner (1749-1823) en 1796 contra la viruela humana. Jenner observó que las personas que habían sufrido o estado en contacto con la viruela bovina (la cual es una enfermedad más benigna que la humana) no padecían la viruela humana, por lo que utilizando las vesículas de las vacas infectadas con viruela bovina realizó un preparado, con el cual inoculó a las personas sanas, protegiéndolas contra la viruela humana. Al proceso se le llamo vacuna (por haber tomado el inóculo de vacas) y al virus que se empleó “vaccina”. (14)

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

denominadas **convencionales**, y han tenido mucho éxito en el control y erradicación de un gran número de enfermedades. (14)

En 1957, Frank Burnet (1899-1985) describió el mecanismo inmunitario de la vacunación. Enunció la teoría de la selección clonal, y en 1965 el papel de los linfocitos T y B en la respuesta inmune. (14)

La base del éxito de la vacunación consiste en que los antígenos que componen una vacuna induzcan una respuesta primaria con estimulación o expansión clonal de linfocitos T y B, y la formación de células de memoria capaces de inducir una respuesta secundaria eficiente en el individuo cuando entre en contacto con los mismos antígenos. (14)

5.a. Generalidades de Vacunas

Se define como vacuna a la preparación de microorganismos (bacterias, virus, parásitos) completos o degradados, atenuados o muertos que al administrarse en un individuo induce una respuesta inmune específica y de memoria que lo protegerá ante posibles desafíos. (15)

Mientras que vacunación es la inducción de inmunidad activa mediante la administración de agentes patógenos vivos atenuados o muertos, o de sus productos de degradación (15).

La inmunización es la aplicación de antígenos en los individuos susceptibles mediante vacunación (inmunización activa) o mediante la administración de sueros con una gran cantidad de anticuerpos en contra del agente patógeno (inmunización pasiva). (15)

La vacunación puede ser activa o pasiva; la primera refiere la estimulación con un antígeno, para la síntesis de anticuerpos contra una futura exposición. La segunda incluye administrar anticuerpos pre sintetizados de un individuo que estuvo expuesto a un antígeno. (6)

ELEMENTOS DE UNA VACUNA (16)

Una vacuna se encuentra constituida por:

- Un antígeno
- Conservadores, los cuales evitan el crecimiento bacteriano, p.e. timerosal, azida de sodio
- Estabilizadores del antígeno
- Fase líquida, donde está contenido el antígeno

- Puede incluir adyuvantes o inmunoadyuvantes, p.e. hidróxido de aluminio.

ADYUVANTES E INMUNOADYUVANTES

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

Los adyuvantes más utilizados son las sales de aluminio (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio), que cuando se unen al antígeno, producen en el individuo inoculado un ligero granuloma que favorece la lenta eliminación del antígeno (estimulación antigénica más duradera), así como la atracción de las CPA, por lo que aumenta la inmunogenicidad del antígeno. (14)

6. ANTICUERPOS

Los anticuerpos son las proteínas de tipo globular, conocidas como inmunoglobulinas, que unen antígeno, se encuentran en la membrana de los linfocitos B y son secretados por las células plasmáticas. El anticuerpo unido a la membrana confiere especificidad antigénica en los linfocitos B; la proliferación de clonas de células B específicas de antígeno se activa por la interacción del anticuerpo de membrana con algún antígeno. Los anticuerpos secretados circulan en la sangre en donde sirven como efectores de la inmunidad humoral; allí reconocen y neutralizan antígenos o los marcan para su eliminación. Todos los anticuerpos comparten características estructurales, se unen al antígeno y participan en un número limitado de funciones efectoras.

Los anticuerpos que se producen como reacción a un antígeno particular son heterogéneos. Casi todos ellos son complejos y contienen muchos determinantes antigénicos diferentes, dependiente del fragmento que sea presentado a los linfocitos B; por lo regular el sistema inmunitario responde al liberar anticuerpos contra varios epítopos en el antígeno. Esta reacción requiere la incorporación de varias clonas de linfocitos B. Cada clona secreta anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales une de forma específica un determinante antigénico aislado. En conjunto estos anticuerpos monoclonales constituyen la respuesta sérica policlonal y heterogénea a un antígeno inmunogénico. (16)

6.a. MEMORIA

La exposición del sistema inmunitario a un antígeno extraño aumenta su capacidad de respuesta ante un nuevo contacto con dicho antígeno. Las respuestas a una y subsiguientes exposiciones al mismo antígeno, denominadas respuestas inmunitarias secundarias, suelen ser más rápidas e intensas y, por lo general, cualitativamente diferentes de la respuesta inmunitaria primaria a dicho antígeno. En cierto modo, la memoria inmunológica se debe a que, a cada exposición a un antígeno, el clon de linfocitos específico para ese antígeno se expande. Además, la estimulación de los linfocitos 'vírgenes' (naïve) por los antígenos genera células de memoria de vida prolongada. Estas células de memoria tienen características especiales que las hacen más eficaces en la eliminación del antígeno en comparación con los linfocitos naïve que no han tenido un contacto previo con el antígeno. Por ejemplo, los linfocitos B de memoria sintetizan anticuerpos que se unen a los antígenos con una afinidad más alta que la de las células B que no han sido previamente estimuladas. (15)

6.b. ISOTIPOS DE ANTICUERPOS

Existen 5 tipos de inmunoglobulinas (Ig) que son: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada uno contiene uno de los 5 tipos de cadenas pesadas que se conocen: alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ). Cada uno representa diferencias estructurales de la cadena pesada. (16)

Isotipos de Anticuerpos	Subtipos	Función
IgA	IgA1 IgA2	- Inmunidad en las mucosas. -Comportamiento como opsoninas. - Neutralizan bacterias, toxinas y virus
IgD		- Receptor de antígeno de linfocitos B vírgenes.
IgE		- Protección contra parásitos helmintos. - Hipersensibilidad I
IgG	IgG1 IgG2a IgG2b IgG3 IgG4	- Neutralización. -Opsonización. -Activación de complemento. -Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. -Inmunidad neonatal. -Inhibición por retroalimentación de linfocitos B. - Hipersensibilidad tipo II y III.
IgM		- Receptor del antígeno de linfocitos B vírgenes. - Activación del complemento por vía clásica. - Hipersensibilidad tipo II y III. -Comportamiento como opsoninas. - Neutralizar toxinas, bacterias y virus.

Figura 4. Clasificación de inmunoglobulinas y sus funciones. (15)

Comparación de la respuesta inmune humoral a dos inmunoconjugados contra sustancias opioides

Se ha observado que una mayor cantidad de IgG1 de ratón es indicativo de la activación de la respuesta TH2 y la mayor cantidad de IgG2a de ratón lo es para la respuesta TH1. (17)

III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A. Monitoreo de la respuesta inmunológica humoral contra opioides:

Determinación de títulos de anticuerpos en sueros de ratones de la cepa BALB/c, inmunizados contra morfina/heroína, mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) por captura de anticuerpo.

Diseño experimental.

Población objetivo: ratones de la cepa Balb/c.

Muestra: Se utilizaron 8 ratones hembras de la cepa Balb/c de 8 a 10 semanas de edad por grupo. El tamaño de la muestra se calculó mediante el método de Tang segunda variante. (25)

Se trabajó con 3 grupos de ratones, distribuidos de acuerdo con la Figura 5:

Grupo	Administración	n	Dosis	Vía de admón.	Aplicaciones	Volumen administrado
1	Inmunógeno ANB	n=8	100µg	Subcutánea	6	100µl
2	Inmunógeno M-KLH	n=8	100µg	Subcutánea	6	100µl
3	Solución salina fisiológica	n=8	100µl	Subcutánea	6	100µl

Figura 5: Matriz de diseño experimental.

Los inmunógenos ANB y M-KLH están formados por una proteína acarreadora, ANB por toxoide tetánico y M-KLH por hemocianina (KLH), un brazo espaciador y el hapteno, morfina; además cada formulación contiene hidróxido de aluminio como adyuvante, en una concentración de 3 mg/ml. Los inmunógenos fueron sintetizados en nuestro laboratorio por un químico orgánico especialista en esta síntesis.

Vacunación Activa

La vacunación se realizó aplicando 100 µg de inmunoadyuvante homogenizado con 3 mg de hidróxido de aluminio [Al(OH)₃]/ml, este adyuvante se eligió por ser de uso autorizado en vacunación de humanos. El grupo testigo recibió 100 µl de solución salina fisiológica por cada aplicación.

El esquema de vacunación y toma de muestra se llevó a cabo de acuerdo a la figura 6:

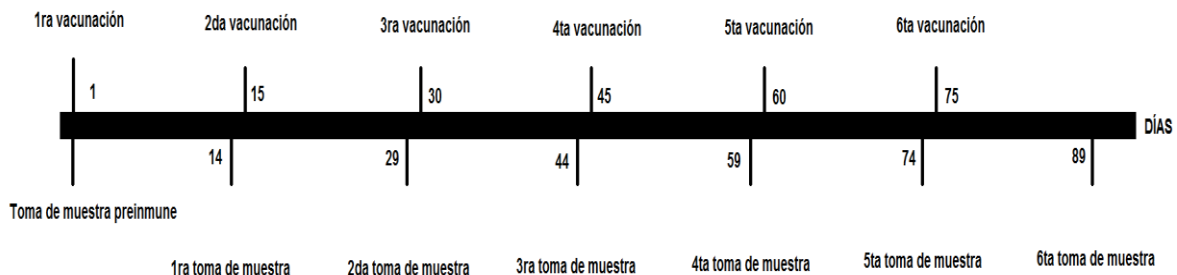


Figura 6: Esquema de vacunación y obtención de muestras para medir la adquisición del título de anticuerpos.

EVALUACIÓN DEL MANTENIMIENTO DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS

Al finalizar la adquisición del título de anticuerpos por efecto de la inmunización con los 2 inmunos conjugados, se procedió a monitorear el mantenimiento del título de anticuerpos. El esquema de toma de muestra fue de acuerdo con la figura 7:

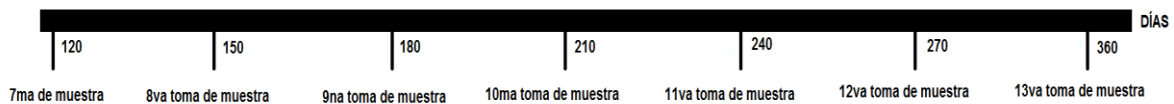


Figura 7: Esquema de obtención de muestras para medir el mantenimiento en el título de anticuerpos sin revacunación.

Obtención de muestras de suero sanguíneo

Consiste en obtener sangre del animal mediante un pequeño corte en una de las venas laterales de la cola. Previamente, la cola se expone al calor emitido por un foco de 60 Watts, para dilatar los vasos sanguíneos, siempre cuidando de no causar quemaduras en la piel. Se obtienen entre 150 y 200 μ l de sangre de cada ratón, se limpia el área de corte y se le administra óxido de zinc (tópico), para facilitar la coagulación de la sangre y evitar hemorragias. El corte se hace con una hoja de bisturí #15 estéril y a una distancia aproximada de 1 cm de la punta de la cola. Una vez obtenida la sangre en tubos eppendorf de 600 μ l y marcados con el número de ratón y grupo correspondiente se ponen las muestras en un

refrigerador a 4°C durante 12 horas para que se forme un coágulo, posteriormente se centrifugan a 8000 r.p.m. durante 5 minutos para que el paquete celular y detritos se vayan al fondo del tubo y así obtener el suero, el cual se almacena en microtubos debidamente etiquetados a -20 °C para su preservación.

Determinación del título de anticuerpos en suero sanguíneo

La titulación de los sueros se hizo por la Técnica de ELISA por captura de anticuerpos descrita en el Anexo 1: Protocolo general para realizar el ensayo de ELISA por captura de anticuerpo.

Isotipificación de anticuerpos

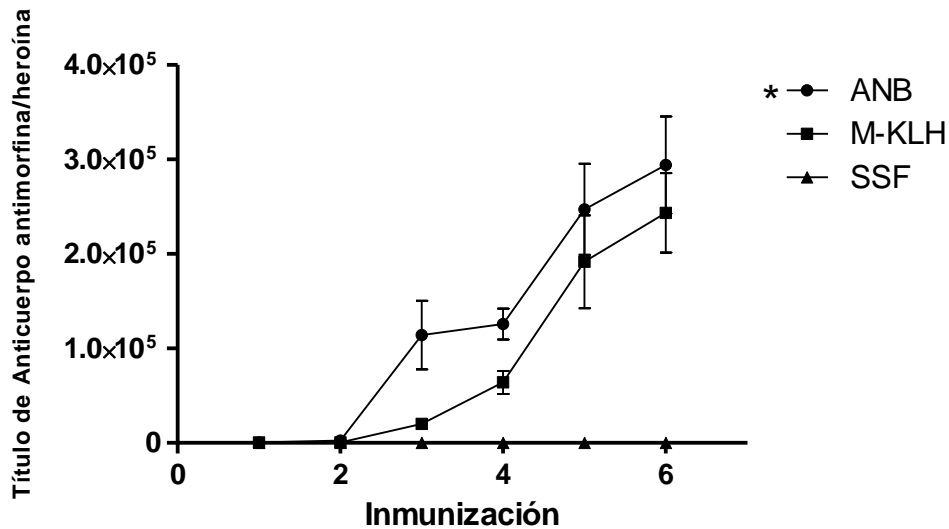
La determinación del isotipo de los anticuerpos fue realizada utilizando el kit de detección (BD Biosciences, Cat. 550487) por medio de la técnica de ELISA. Los resultados se expresan en porcentaje en relación a la cadena kappa.

IV. RESULTADOS

Cinética de adquisición de anticuerpos contra morfina/heroína generados por la administración de los inmunoadyuvantes ANB y M-KLH

En los títulos de anticuerpos se puede apreciar el comportamiento de estos respecto al tiempo y las inmunizaciones con cada uno de los inmunoadyuvantes. El esquema de administración, como anteriormente se mencionó, consistió en aplicar 6 inmunizaciones, una cada 14 días, un día antes de dicha administración se obtuvieron muestras de suero sanguíneo, el cuál fue procesado mediante una prueba de ELISA por captura de anticuerpo.

Durante el proceso de vacunación se puede observar la adquisición del título de anticuerpo. Con las cuatro primeras inmunizaciones se observa una diferencia significativa entre ambos grupos, siendo el grupo inmunizado con el inmunoadyuvante ANB quien presentara mayor título de Ac ($p < 0.001$ ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni), sin embargo, a partir de la quinta inmunización, esta diferencia significativa ya no se observa entre los tratamientos (Figura 8).



* $p < 0.001$ ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni

Figura 8. Cinética de adquisición del título de anticuerpos contra morfina/heroína. Los ratones fueron inmunizados con $100 \mu\text{g}$ de cada inmunoadyuvante según correspondiera, homogenizado con 3 mg de hidróxido de aluminio $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ /ml por vía subcutánea cada 14 días, un día previo a cada inmunización se obtuvieron muestras de suero sanguíneo, en el cual se midió el título de anticuerpo mediante una prueba de ELISA por captura de anticuerpos. Se observa diferencia significativa desde la primera inmunización hasta la cuarta ($p < 0.001$ ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni), siendo el inmunoadyuvante formulado con toxoide tetánico (ANB) quien generó mayores títulos de anticuerpo, sin embargo, en las dos últimas inmunizaciones, ya no se observó diferencia significativa entre grupos.

Posteriormente, se hicieron tomas de muestras de suero sanguíneo cada mes, sin presencia de vacunación, con el objetivo de evaluar el decaimiento del título de Ac.

Se observó que el decaimiento del título fue significativamente más rápido en el grupo tratado con el inmunoadyuvante de KLH ($p < 0.001$ ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni) decayendo en un 79% al segundo mes de seguimiento, al final del estudio los títulos de Ac de este grupo eran de tan solo 4.32% en relación

a los alcanzados con la última inmunización; mientras que el título de anticuerpos del grupo tratado con ANB decayó un 29.11% en los primeros 2 meses, conservándose estable durante tres observaciones más, posteriormente, decayó otro 35.43%. Los títulos de Ac al final del seguimiento para el grupo ANB fueron de 29.64 en relación a la última inmunización. (Figura 9)

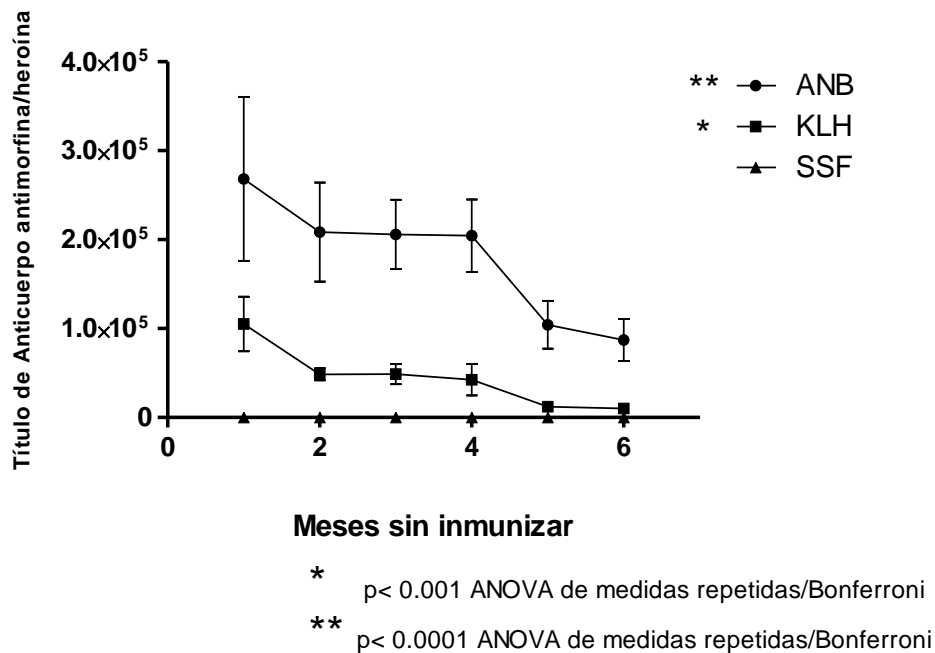


Figura 9. Cinética de mantenimiento del título de anticuerpos. Con los ratones inmunizados con los diferentes inmunoadyuvantes se realizó un seguimiento del título de Ac en suero sanguíneo, a través del tiempo, sin reinmunizar. Una vez al mes a partir de la última inmunización, se obtuvieron muestras de suero sanguíneo y se evaluaron mediante una prueba de ELISA por captura de Ac, observándose un decaimiento abrupto de los títulos de Ab en los ratones tratados con el inmunoadyuvante KLH, significativamente diferente al mantenimiento del grupo tratado con el inmunoadyuvante ANB ($p < 0.001$ ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni).

ISOTIPIFICACIÓN

A continuación, se presentan las gráficas obtenidas de la isotipificación de los sueros generados a través de la administración de los inmunos conjugados ANB y KLH.

Se puede observar que la inmunoglobulina predominante en los antisueros obtenidos con las dos formulaciones es la IgG1.

Comparación de la respuesta inmune humoral a dos inmunoadyuvantes contra sustancias opioides

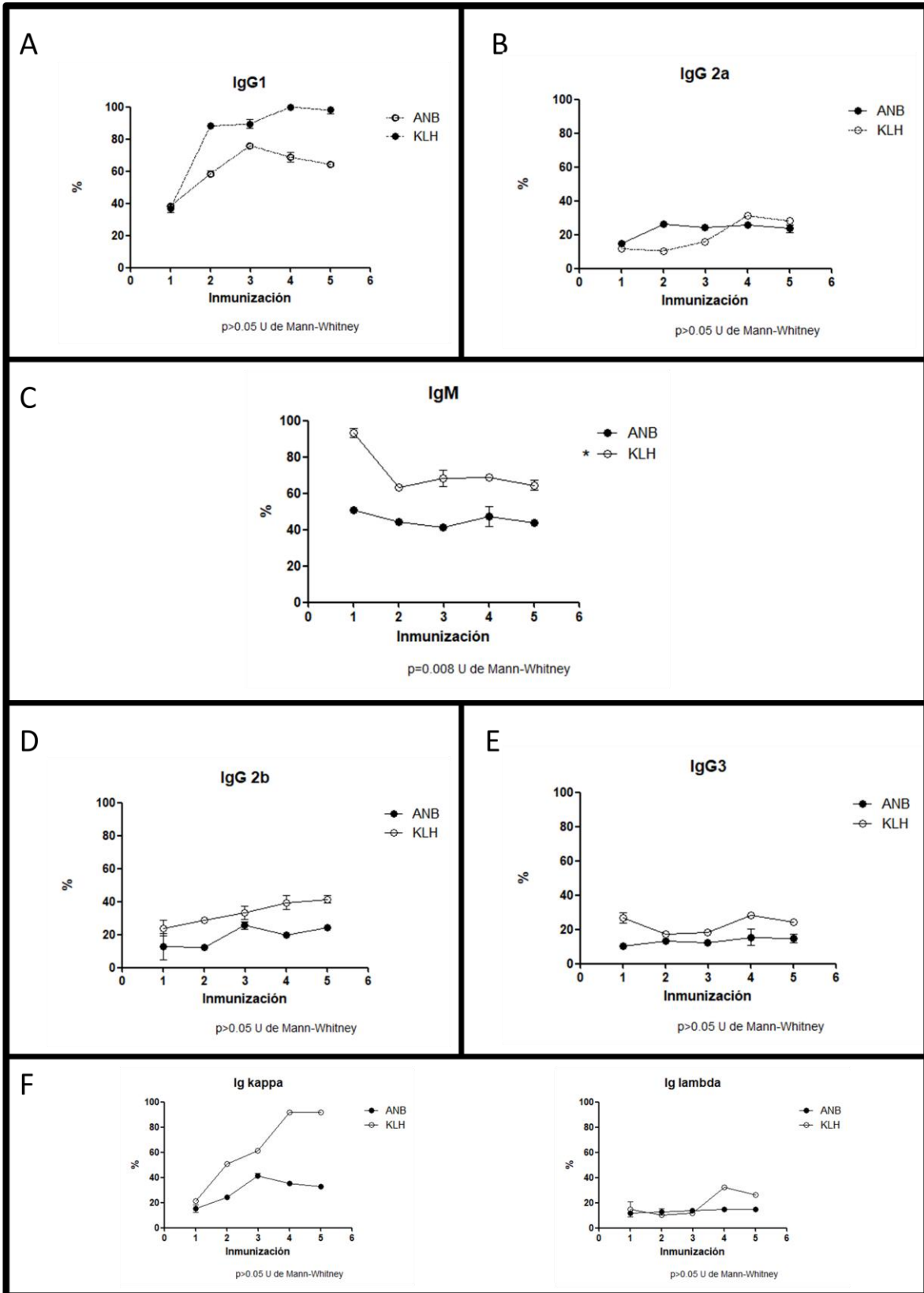


Figura 10. Isotipo de anticuerpos generados por la vacunación con los inmunoadyuvantes ANB y KLH. El suero sanguíneo obtenido después de cada inmunización a través de las venas laterales y central de la cola, se analizó en forma de pool, con un kit comercial de isotipificación por ELISA (BD Pharmingen; Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA kit), observándose: A) IgG1 es la inmunoglobulina predominante al final del estudio, mostrándose un porcentaje superior de ésta inmunoglobulina en los animales inmunizados con la vacuna KLH, sin embargo, estadísticamente no se observa diferencia con el grupo ANB, mientras que la expresión de IgM fue la única que mostró diferencia significativa entre grupos ($p=0.008$ U de Mann-Whitney).

V. DISCUSIÓN

La adicción a los opiáceos va cada vez en aumento en el mundo y México no es la excepción. (2)

La investigación de opciones para el tratamiento de esta adicción desde el punto de vista inmunológico va en ascenso, por eso es importante encontrar la opción más viable y eficiente entre sí.

Como se aprecia en la Figura 1, aparte de utilizar como proteína acarreadora la BSA, últimamente se ha utilizado la KLH, La cual ha presentado buenos resultados en cuanto a la generación aguda de anticuerpos séricos específicos, es decir, en la adquisición de título de anticuerpos durante el esquema de inmunización.

El inmunoadyuvante ANB resulta ser más eficiente desde el punto de vista de conservación de anticuerpos específicos circulantes en función del tiempo. Aunque la adquisición de estos tiene una cinética similar, es decir, no hay diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos al final del esquema de inmunización establecido. En la segunda parte de este estudio, la disminución del título de anticuerpos es significativamente mayor en los sueros sanguíneos de ratones inmunizados con el inmunoadyuvante KLH que en el suero sanguíneo de ratones inmunizados con el inmunoadyuvante ANB.

En algunos trabajos como los del grupo de investigación del Dr. Kosten (22), en donde utilizan como proteína acarreadora la KLH, afirman que la cinética de adquisición del título de anticuerpos específicos séricos contra morfina es más

eficiente que el adquirido con el inmunoadyuvante del grupo de investigación del Dr. Antón (18), además de que necesita solo 4 administraciones para alcanzar el título máximo de anticuerpos (los cuales no presenta) y tienen casi el mismo efecto protector en una prueba conductual. Las diferencias en los métodos son significativamente importantes: la vacuna del grupo del Dr. Kosten es administrada con adyuvante de Freund, el cual solo es de uso experimental, esto quiere decir que si bien, pudiera haber títulos similares, o incluso superiores a los de la vacuna ANB, no podría ser utilizada en un programa de vacunación en fase clínica con seres humanos, por la formulación en la que fue experimentada.

Hay otro grupo importante de investigación que ha experimentado con sus propios inmunoadyuvantes, el Dr. Kim Janda (4) trabajó, como en esta tesis, con hidróxido de aluminio, aunque el esquema es también diferente. Solo administraron 3 veces cada 28 días y los títulos máximos que reportan son de 1:30,000 los cuales representan casi el 10% de los títulos máximos de anticuerpos séricos específicos de la vacuna ANB, además de que utilizaron 2 adyuvantes diferentes, uno acoplado la morfina a la proteína acarreadora KLH y otro utilizando heroína como hapteno.

Las dosis de los tres trabajos fueron de 100µg de cada uno de los adyuvantes, pero ninguno de los 2 trabajos antes mencionados reporta cinética de mantenimiento de títulos de anticuerpos posterior al esquema de inmunización, y ya sin más reinmunizaciones, como lo hace este trabajo.

El esquema de inmunización con el inmunoadyuvante ANB requiere 6 administraciones, las cuales representan 15 días más que el esquema del

conjugado del grupo de Kosten y 15 días menos que el de los conjugados del grupo de Janda. El adyuvante con el que trabajó el Dr. Kosten no puede ser utilizado en humanos, lo que no nos asegura que los resultados sean los mismos utilizando hidróxido de aluminio, o algún otro adyuvante de uso humano autorizado. El título de anticuerpos secretados por los 2 conjugados reportados por el grupo de investigación del Dr. Janda es 10 veces menor que la vacuna ANB, lo cual puede ser importante en la protección del paciente ante el consumo de la morfina/heroína.

Ninguno de los 2 artículos reporta cinética de mantenimiento de títulos de anticuerpos posterior al esquema de inmunización. En esta tesis se trabajó con un inmunos conjugado similar al reportado por los grupos de investigación antes mencionados y la cinética de disminución del título de anticuerpos post vacunación es significativamente diferente siendo la vacuna ANB más eficiente porque 6 meses después de no recibir una inmunización el título de anticuerpos de la vacuna ANB es 7 veces mayor que el de la vacuna KLH. Lo que representa una secreción constitutiva de anticuerpos específicos circulantes, ya que el tiempo de vida media de la mayoría de las IgG es menor a 25 días.

El isotipo predominante en ambos tratamientos fue la IgG1, lo que nos indica que ambas moléculas acarreadoras tienen las características inmunológicas para ser presentadas mediante MHC-II. La única inmunoglobulina que presentó diferencias significativas fue IgM, viéndose disminuida la secreción de ésta inmunoglobulina en el grupo tratado con ANB, indicando que este inmunos conjugado tiene una capacidad superior para estimular la respuesta

Comparación de la respuesta inmune humoral a dos inmunos conjugados
contra sustancias opioides

inmunológica específica, facilitando el “switch” de la IgM a la IgG. Lo cual se refleja en los títulos de anticuerpo y la duración de la producción de estos a largo plazo.

VI. CONCLUSIÓN

La cinética de disminución de título de anticuerpos en ausencia de inmunización es significativamente mayor por parte de la vacuna KLH, lo que representaría una menor protección durante el consumo de morfina y/o heroína, lo cual hace en este sentido más eficiente a la vacuna ANB, apoyado por el isotipo predominante IgG1.

VII. PERSPECTIVAS

Un experimento pertinente que considero hacer es un ensayo de competencia/especificidad, aunque sabemos por medio de un anticuerpo monoclonal que la fase sólida atrapa anticuerpos anti-morfina, la heroína no es la única sustancia adictiva derivada de la morfina que se usa frecuentemente, así que se puede competir in vitro diferentes derivados para ver si son reconocidos por los anticuerpos sintetizados por uso del inmunocombinado ANB.

En cuanto a probar la efectividad de la vacuna en un modelo biológico (en este caso ratón), propongo una prueba de tail flick (26), que consiste en tener dos grupos de ratones, uno será el grupo control que no estará vacunado y el otro grupo habrá sido sometido a un esquema de vacunación. A los 2 grupos de ratones se les administra una dosis establecida de morfina y luego se hace pasar calor en la cola de los ratones. Si los animales del grupo inmunizado retiran la cola antes que los del grupo control, quiere decir que la morfina no se acopló a los receptores μ y por lo tanto no tienen el efecto analgésico y sienten el calor. Este reto probará que los anticuerpos específicos circulantes reconocen a la morfina y son atrapados en el torrente sanguíneo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Tokatlian JG. 2010. *Drogas y prohibición: una vieja guerra, un nuevo debate*. Buenos Aires, Libros del zorzal.
2. Instituto Nacional de Psiquiatría/Secretaría de Salud. 2012: *Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Drogas Ilícitas*. 1º Edición. México.
3. Salazar-Juárez A, et al. 2013: *Nuevas vacunas contra la morfina/heroína*. Salud Mental: 36, 219-227.
4. Schlosburg JE, et al. 2013: *Dynamic vaccine blocks relapse to compulsive intake of heroin*. PNAS (110) 9036-9041.
5. Orson FM, et al. 2008: *Substance Abuse Vaccines*. NIH (1141) 257-269.
6. Hardman J, Limbird L. 2001: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10a. Edición, New York, McGraw Hill International Editorial.
7. Mendoza N. 2008: *Farmacología médica*. México, Ed. Panamericana.
8. Koob GF, Le Moal M. 2006: *Neurobiology of addiction*. London UK, Elsevier Editions.
9. Selley DE, et al. 2001: *mu Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine*. Biochem Pharmacol (62) 447-455.
10. Aristil PM. 2013: *Manual de Farmacología Básica y Clínica*. 6ª Edición. México, McGraw Hill.
11. Eisenstein TK. 2011: *Opioids and the immune system: what is their mechanism of action?* British Journal of Pharmacology (164) 1826-1828.

12. Gretton SK. 2013: *Plasma morphine and metabolite concentrations are associated with clinical effects of morphine in cancer patients*. J Pain Symptom Manage (45) 670-680.
13. Sevarino KA, et al. 2000: *Neurobiological adaptations to psychostimulants and opiates as a basis of treatment development*. Ann N Y Acad Sci. (909) 51-87.
14. Gómez L, Del Mar B, Domenech A. 2006: *Manual de inmunología veterinaria*. 1ª Edición. Madrid. Pearson Prentice Hall.
15. Abbas AK., Lichtman A. 2015: *Inmunología celular y molecular*. 8ª Edición. USA. Elsevier-Saunders.
16. Golsby RA., Kindt TJ., Osborne BA., Kuby J. 2004. *Inmunología*. 5ª Edición, México, Mc Graw Hill.
17. Molae N., et al. 2017: *Evolution of the immune response against recombinants proteins (TcpA, TcpB, and FlaA) as a candidate subunit Cholera Vaccine*. Journal of immunology Research. (2017) 1-8.
18. Anton B., Leff P. 2006: *A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents*. Vaccine (24) 3232-3244.
19. Hockfield S., Carlson S., Evans C., et al. 1993. *Selected methods for antibody and nucleic acid probes*. Vol 1. New York. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
20. Vidarsson G, et al. 2014: *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. Frontiers in Immunology: (5) 1-17.
21. Owen J, et al. 2014: *Inmunología de Kuby*. 7a Edición. México, McGraw Hill.

22. Qian-Qian Li, et al. 2015: *A conjugate vaccine attenuates morphine and heroin induced behaviors in rats*. International Journal of Neuropsychopharmacology (00) 1-11.
23. Organización Mundial de la Salud. 2004: *La dependencia de sustancias es tratable, sostiene un informe de expertos en neurociencias*. Recuperado de: <http://who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr18/es/>
24. American Psychiatric Association. 2014: *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales: DSM-5*. 5ª Edición. México, Editorial Médica Panamericana.
25. Kochran G. William. 2000: *Técnicas de muestreo*. 15ª Edición. México, Compañía Editorial Continental, S.A.
26. Le Bars D, et al. 2001: *Animal models of nociception*. Pharmacological Reviews. 53 (4): 597-652.

IX. APÉNDICE

A. Protocolo general para realizar el ensayo de ELISA por captura de anticuerpo

ENSAYO DE ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)

Objetivo: Caracterización del perfil temporal de expresión de anticuerpos IgG específicos anti-sustancia presentes en muestras biológicas (suero de animal).

Tipo: ELISA por captura de anticuerpo.

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

Material: Placas de ELISA de 96 pozos.

Pipetas de 20, 100, 200 ml

Protocolo: (19)

1er. DÍA

- Preparar una solución de bicarbonato de sodio NaHCO_3 0.1 M pH = 8-8.5
- La fase sólida (M-BSA) debe ir a una concentración de $1\mu\text{g}$ por pozo y debe ir disuelta en $100\mu\text{l}$ de NaHCO_3 0.1 M. Para una placa de 96 pozos se debe tomar la equivalencia de $96\mu\text{g}$ de M-BSA y disolverla en $9600\mu\text{l}$ con la solución de NaHCO_3 0,1 M. Se administra por pozo-- $1\mu\text{g}$ de M-BSA / $100\mu\text{l}$ / pozo. Se incuba la fase sólida por 12 horas a 4°C o 2 horas a 30°C .
- En el lapso en que se está incubando la fase sólida se prepara un buffer PBS de ELISA pH = 7.4. **BUFFER (para muestra):** Para un litro de buffer: 3.1 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado. 10.9 g de fosfato dibásico de sodio anhidro. 9 g de cloruro de sodio y en este momento ajustar el pH. **BUFFER (para lavado):** al buffer para muestra se

le agrega 1ml de TWEEN 20 (1ml de tween por cada litro de buffer).

BUFFER (para bloquear): Al BUFFER (para lavar) se le agrega 1ml de gelatina de teleósteo (1ml de gelatina por cada litro de buffer). Estos buffers deben estar fríos a la hora de usarse.

2do Día

- Al finalizar el tiempo de incubación se realizan 5 lavados de la placa con el buffer de lavado. Después del último lavado se dejan todos los pozos llenos de buffer con gelatina con el fin de realizar el bloqueo de los pozos. Este procedimiento tiene una duración de 1 hora a temperatura ambiente.
- Durante esta hora se preparan diferentes diluciones del suero de ratón, las cuales se diluirán en Buffer para muestras. Las diluciones usadas (1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000, 1:1,000,000) se preparan a razón de hacer triplicados de 100 µl por cada pozo. Como controles se utiliza un tren preinmune que consiste en diluir el suero del sangrado previo a la primera inmunización, a una concentración de 1:100, el objetivo de este control negativo es determinar si hay una señal debido al reconocimiento de anticuerpos inespecíficos que reconozcan tanto a la proteína, el brazo espaciador o el antígeno en si y los resultados que obtengamos de los sueros obtenidos después de cada vacunación sean falsos positivos. También se requiere otro control negativo que consiste en solo agregar buffer (blanco).

- Una vez transcurrida la hora de bloqueo se descarta la solución y se ponen las diluciones de acuerdo a un esquema que previamente se estableció. La placa estará compuesta entonces de las diluciones de los sueros de ratón, un preinmune y un blanco. Siempre 100 µl de solución por pozo. Se deja incubar 12 horas a 4 °C ó 2 horas a 30°C.

3er Día

- Transcurrido el tiempo se hacen 5 lavados con buffer de lavado PBS 7.4.
- Se descarta el buffer y se agrega el anticuerpo secundario especie específico acoplado a peroxidasa (Jackson immunoresearch, Goat anti-mouse IgG (H+L)), en una dilución 1:5,000 en PBS. Se coloca 100 µl por pozo. Se deja incubar 2 horas a temperatura ambiente.
- Transcurrido el tiempo se hacen 5 lavados con PBS.
- Y durante este tiempo se prepara la solución del sustrato, que en este caso es o-fenildiamino (OPD), el cual debe ir a una concentración de 0.4 mg/ml. Este reactivo es fotosensible, por lo cual debe hacerse en condiciones de luz tenue para que directamente no incida la luz sobre él, hay que tomar las precauciones necesarias para la aplicación a la placa y asegurar que todos los pozos que utilizamos tengan este reactivo, una vez agregada la solución se envuelven las placas en papel que no deje pasar la

luz (papel aluminio), y se deja incubar 1 hora, al transcurrir este tiempo, se hace la lectura.

Los valores de absorbancia, que es lo que se mide en cada pozo, se toman de un lector de placas EPOCHBiotek®, la de medición se realiza a 492 nm, la duración de la medición es de 30 segundos. La placa se desecha en los contenedores adecuados.

- Finalmente se grafican y analizan los resultados.

B. Gráfica de obtención de títulos de anticuerpos

La gráfica resultante del promedio y resta del preinmune por dilución, es de una forma sigmoide inversa y semilogarítmica, puesto que las diluciones van de 1:100 a 1:1'000,000; es decir, el primer valor comenzará en 100 en el eje de las abscisas y la absorbancia resultante de la medición y promedio del triplicado correspondiente en el de las ordenadas, esta disminuirá con el paso de la dilución hasta construir la gráfica. El título corresponde a obtener el 50% de la absorbancia máxima de la muestra (dilución 1:100), se desplaza a la derecha hasta encontrar la curva y se desciende hasta el eje X, ese será el título de anticuerpos correspondiente a la muestra analizada (18). En el ejemplo se observa un título de anticuerpos entre 1: 100,000 y 1: 150,000 el cual se determina con exactitud con el programa "Microcal Origin"®.

Comparación de la respuesta inmune humoral a dos inmunocombinados contra sustancias opioides

