

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN TRES
RAZAS DE CABRAS**

POR

C. ÁNGEL RUVALCABA RODRÍGUEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO

OCTUBRE 2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN TRES
RAZAS DE CABRAS**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

POR

C. ÁNGEL RUVALCABA RODRÍGUEZ

ASESOR PRINCIPAL

MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO

OCTUBRE 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN TRES RAZAS DE
CABRAS

Tesis aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO

MC. Margarita Yolanda Mendoza Ramos

CORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL

MVZ. RODRIGO I. SIMON ALONSO



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO

OCTUBRE 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TESIS

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN TRES RAZAS DE
CABRAS

TESIS APROBADA POR EL H. JURADO EXAMINADOR

MC. Margarita Yolanda Mendoza Ramos
PRESIDENTE

MC. José Luis Corona Medina
VOCAL

MC. Genoveva Hernández Zamudio
VOCAL

MC. Ramón Alfredo Delgado González
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO

OCTUBRE 2013

Dedicatoria

A mis padres

Sr. Ángel Ruvalcaba Rodríguez y la Sra. Norma Leticia Rodríguez Jaramillo.

Agradecerles que desde el inicio de mi educación siempre han estado presentes y gracias a ustedes he logrado concluir mis estudios profesionales y cumplir mi primer gran objetivo que es ser Médico Veterinario Zootecnista.

Agradecerles por inculcarme desde niño el valor de la educación e instruirme en la vida para superar cada etapa que conforme a los años tenía que pasar desde educación preescolar hasta culminar con una carrera profesional.

También agradecerles a mis hermanos Cinthia Leticia Ruvalcaba Rodríguez y Fernando Ruvalcaba Rodríguez que aunque casi siempre con diferencias en nuestras formas de pensar que causan algunos problemas, pero también muchos momentos alegres, agradecerles por estar siempre presentes y por todo su apoyo.

Por todo el apoyo que me han brindado y por hacer de mí lo que soy,
¡¡GRACIAS!!

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a Dios por haberme permitido estar al lado de mi familia y seres queridos en este momento importante que término mis estudios profesionales.

Agradecer a mi familia por todo el apoyo brindado durante mis estudios y principalmente en la vida.

Especialmente a la MC. Margarita Yolanda Mendoza Ramos, a la MC. Genoveva Hernández y al MC. José Luis Corona por la confianza mostrada hacia mi persona para colaborar en este proyecto, pero sobre todo por el apoyo y asesoría durante la realización del mismo.

A mis compañeros y amigos Hayde Varela, Jorge Salazar, Mary Pérez, Ana Jaramillo y Edith Martínez por la ayuda mutua para la realización de este proyecto y la formación de un excelente equipo de trabajo.

Agradecer a dos personas que estuvieron durante los 5 años de la carrera tanto en momentos difíciles, de angustia por exámenes, calificaciones y exposiciones, pero que de igual manera estuvieron en momentos bonitos y de alegría, como olvidar cada aventura que pase junto a ellas durante la carrera. Me refiero a mis dos grandes amigas Edith del Carmen Martínez Ruiz y Ana Beatriz Jaramillo Ruvalcaba, no me queda más que agradecerles por todo el apoyo y consejos durante estos últimos 5 años, sin lugar a dudas el mejor equipo de trabajo y las mejores amigas que he tenido. ¡¡GRACIAS!!

A esas personas que conocí en el transcurso de la carrera y que de ser compañeros se convirtieron en grandes amigos. Félix Bernal Salazar, Jesús Mendoza, Hayde Varela y Monse, agradecerles por todos los momentos que pasamos juntos, les deseo éxito en su vida profesional y personal ya que en la carrea demostraron ser los mejores.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi Alma Terra Mater por darme las facilidades de poder cumplir mi principal objetivo que es terminar mis estudios profesionales, por brindarme los mejores profesores, aulas y laboratorios durante mi preparación y hacer de mí un profesionista de calidad.

Índice de contenido

Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Índice de contenido.....	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de cuadros.....	x
Resumen.....	xi
I.- Introducción.....	1
1.1 Objetivo del presente trabajo.....	2
1.2 Hipótesis.....	2
II.- Marco teórico.....	2
2.1.- Sistema inmunitario.....	2
2.2- Respuesta inmunitaria innata y adaptativa.....	4
2.2.1.- Inmunidad innata.....	4
2.2.2 Inmunidad adaptativa.....	5
2.3 Clasificación de la inmunidad.....	5
2.3.1 Inmunidad humoral y celular.....	6
2.3.2 Inmunidad humoral.....	6
2.3.3 Inmunidad celular.....	6
2.3.4 Respuesta inmune primaria y secundaria.....	6
2.5 Células del sistema inmunitario.....	7
2.5.1 ¿Qué son los anticuerpos?.....	8
2.5.2 Estructura de un anticuerpo.....	8
2.5.3 Anticuerpos policlonales.....	9
2.5.4 Anticuerpo monoclonal.....	9
2.5.5 Función de los anticuerpos.....	9
2.5.6 Afinidad.....	9
2.5.7 Avidéz.....	10
2.6 ¿Para qué se emplean los sueros hiperinmunes?.....	10

2.6.1 ¿Cómo se producen los sueros hiperinmunes?	11
2.6.2 Preparación del antígeno	11
2.6.3 Selección de especie animal	12
2.6.4 Preparación del adyuvante	12
2.6.5 Protocolo de inyección.....	13
2.6.6 Vía de inyección.....	13
2.6.7 Revisión post-inmunización	15
2.6.8 Sangrado	15
2.7 Que son los adyuvantes y para que se emplean.....	17
2.7.1 Uso de un adyuvante	17
2.7.2 Selección de un adyuvante	18
2.7.3 Clasificación de los adyuvantes	18
2.7.4 Función de los adyuvantes	19
2.7.5 Mecanismo de acción de los adyuvantes.....	19
2.7.6 Efecto deposito	19
2.7.7 Presentación.....	20
2.7.8 Cambios en el tráfico celular	20
2.7.9 Focalización del antígeno.....	20
2.7.10 Efectos sobre la expresión de MHC de clase II.....	20
2.7.11 Ventajas de usar un adyuvante.....	20
2.7.12 Efectos adversos.....	20
2.8 Tipos de adyuvantes	21
2.8.1 Adyuvante completo de Freund	21
2.8.2 TitterMax y TitterMax Gold.....	22
2.8.3 Adyuvante RIBI	22
2.8.4 Specol.....	22
2.8.5 Compuestos de aluminio.....	22
2.8.6 Emulsiones	23
2.8.7 Muramildipeptido (MDP).....	23
2.8.8 Liposomas	23
2.8.9 Saponinas.....	24
2.8.10 Carbohidratos como adyuvantes	24
2.8.11 Bacterias como adyuvantes.....	24
2.8.12 Adyuvante Gerbu.....	24

2.8.13 Citoquinas.....	24
2.9 Técnicas empleadas para determinación de anticuerpos en suero	25
2.9.1 Prueba de precipitación	25
2.9.2 Prueba de precipitina	25
2.9.3 Prueba de inmunodifusión	25
2.9.4 Inmunodifusión simple	25
2.9.5 Inmunodifusión doble.....	26
2.9.6 Prueba de inmunolectroforesis	26
2.9.7 Prueba de contrainmunolectroforesis	26
2.9.8 Electroforesis bidimensional	26
2.9.9 Prueba de aglutinación	27
2.9.10 Aglutinación directa.....	27
2.9.11 Aglutinación indirecta.....	27
2.9.12 Prueba de inmunofluorescencia	27
2.9.13 Radioinmunoensayo	27
2.9.14 Enzimoimmunoanálisis (ELISA).....	28
2.9.15 Técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony	28
2.10 ¿Qué animales se emplean para la producción de sueros hiperinmunes?	30
2.10.1 ¿Por qué emplear cabras?	31
III.- Materiales y Métodos	31
3.1 Manejo del hato.....	31
3.2 Área de estudio	31
3.4 Material para inmunización	31
3.5 Material para sangrado	32
3.6 Emulsión antígeno-adyuvante	32
3.7 Inmunización y sangrados.....	32
IV.- Resultados	35
V.- Discusión	35
VI.- Conclusión.....	37
VII.- Literatura citada.....	38

Índice de figuras

<i>Figura 1.- Estructura de un anticuerpo (Tortora et al., 2007)</i>	8
Figura 2.- Reacción de identidad , en las que las líneas de precipitación son semejantes y se unen cuando se cruzan. Esto ocurre cuando los dos antígenos son iguales.	29
Figura 3.- Reacción de no identidad, donde las líneas se cruzan por completo. En este caso los dos antígenos son totalmente distintos.	29
Figura 4.- Reacción de identidad parcial, donde hay reacción del anticuerpo con los dos antígenos, pero las líneas no forman una cruz completo. En este caso el anticuerpo comparte parcialmente los determinantes antigénicos (Arderiu, 1997).	30
Figura 5.- Sitios de inoculación	34
Figura 6.- Sitios de inoculación tratados.....	34

Índice de cuadros

Cuadro 1.- <i>Vías de inyección de adyuvante para los animales de investigación: Detalles, ventajas y desventajas (Leenaars y Hendriksen, 2005).....</i>	16
<i>Cuadro 2.- Títulos de anticuerpos obtenidos en raza Saanen.....</i>	35
Cuadro 3.-Títulos de anticuerpos obtenidos en raza Criolla	35
Cuadro 4.- Títulos de anticuerpos obtenidos en raza Toggenburg	35

Resumen

La inmunización de animales de laboratorio para inducir una respuesta inmune humoral y / o celular, es un procedimiento de rutina realizado en todo el mundo. Muchas de las áreas de la biotecnología tales como las técnicas de inmunodiagnóstico se basan en el uso de anticuerpos específicos que se producen en animales de laboratorio a través de su respuesta inmune a un complejo inmunogénico. Los anticuerpos policlonales muestran un enorme potencial como tratamientos para combatir el ántrax, la viruela y otros agentes de guerra biológica, imitando la inmunización pasiva que se produce naturalmente por lo tanto ofrece protección contra una variedad de patógenos incluyendo la difteria, el tétanos, estreptococos y las paperas. Ciertos procedimientos de inmunización están actualmente en discusión por razones de bienestar animal. En el presente trabajo se emplearon cabras de tres razas como sujetos de inmunización para evaluar su respuesta productora de anticuerpos frente a una inmunoglobulina de conejo. Se obtuvo una buena respuesta en la producción de anticuerpos a partir de los 30 días, siendo igual para las tres razas. El nivel de anticuerpos se mantuvo igual hasta el día 45, por lo cual se plantea que extendiendo el tiempo de la inmunización se pudiera tener un mayor nivel en la producción.

Palabras clave. Inmunización, anticuerpos, respuesta inmune, anticuerpos policlonales, adyuvante.

I.- Introducción

La inmunización de animales de laboratorio para inducir una respuesta inmune humoral y / o celular, es un procedimiento de rutina realizadas en todo el mundo. Ciertos procedimientos de inmunización están actualmente en discusión por razones de bienestar animal. Por ejemplo, los productos adyuvantes usados para aumentar la respuesta inmune se sabe que causan la inflamación local, y algunos protocolos de inmunización se asocian con el dolor y el malestar. (Leenaars *et al.*, 1999) Algunas terapias de anticuerpos policlonales hiperinmunes modernas que se utilizan para el tratamiento de enfermedades agudas y emergencias médicas se derivan típicamente de donantes humanos o animales con niveles séricos elevados de anticuerpos policlonales específicos (Newcombe y Newcombe, 2007).

En la elaboración de un protocolo de inmunización, el objetivo de la inmunización afectará inevitablemente a las decisiones acerca de la ruta de inmunización, el volumen necesario, la dosis del antígeno utilizado, el adyuvante necesario y el número de veces que se inmunizaron los animales.

La inmunización se utiliza a gran escala en la investigación biomédica, biológica y química para los fines de:

- La preparación de sueros inmunes policlonaal específico
- La generación de células B específicas necesarias para desarrollar hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales
- La investigación sobre a) los efectos protectores de las vacunas, b) posibles antígenos protectores y c) control de calidad de las vacunas
- La investigación inmunológica básica
- La inducción de modelos de enfermedad (Health, 2000).

El suero es la parte fluida de la sangre obtenida tras la coagulación, cuando se obtiene de un individuo inmunizado se denomina antisuero porque contiene Ac específicos contra el Ag inmunizante, así como el resto de las proteínas séricas. Los antisueros contienen colecciones heterogéneas de Ac, todos ellos se unen al Ag empleado para la inmunización, pero cada uno posee su propia estructura, su propio epítipo en el antígeno y su propio conjunto de reacciones cruzadas (Tapia *et al.*, 2007).

Muchas de las áreas de la biotecnología tales como técnicas de inmunodiagnóstico se basan en el uso de anticuerpos específicos que se producen en animales de laboratorio a través de su respuesta inmune a un complejo inmunogénico (George *et al.*, 2012) El suero es adecuado para muchas aplicaciones, por ejemplo, la inmunotinción de Western blot, ELISA y fijación del complemento de inmunoprecipitación (Leenaars *et al.*, 1999)

Procedimientos y ensayos mediados por anticuerpos son ampliamente utilizados por la industria de productos biológicos y organismos reguladores para evaluar y probar los productos biológicos (por ejemplo: vacunas y productos relacionados)(Coe Clough y Hauer, 2005).

El médico veterinario debe conocer los procesos empleados para la inmunización de animales experimentalmente, con la finalidad de que los procedimientos se lleven a cabo bajo las normas estrictas de salud animal.

1.1 Objetivo del presente trabajo

Se evaluaron tres diferentes razas de cabras para la producción de sueros hiperinmunes empleando inmunoglobulina de conejo como antígeno.

1.2 Hipótesis

Dado que la raza de cabras Criolla es la mejor adaptada en nuestra región, es probable que se obtengan mejores resultados en cuanto a la producción de anticuerpos con esta raza.

II.- Marco teórico

2.1.- Sistema inmunitario

El inmunitario es un sistema de defensa de múltiples funciones que evolucionó para proteger a los animales de la invasión de microorganismos patógenos y el cáncer. Tiene la capacidad de generar una enorme variedad de células y moléculas que pueden reconocer y eliminar de forma específica una diversidad casi ilimitada de invasores extraños (Goldsby *et al.*, 2004).

Entre la segunda y tercera semana de gestación aparecen las primeras células del sistema hematopoyético, a partir del saco vitelino, llamadas células primordiales. Gracias a estas células se da lugar a todas las células de defensa. Partiendo de las células primordiales se forman los linfocitos, los monocitos, los megacariocitos, los granulocitos y otra célula importantísima, que aunque no es de defensa, es la célula precursora de los eritrocitos. Todo el desarrollo del tejido hematopoyético tiene que ver con el aparato inmunológico, así como también lo es el del tejido linfoide. De esta manera, habrá órganos que tendrán mayor cantidad de tejido linfoide que otros, como son los ganglios, el hígado, el bazo y la médula ósea; todos son tejidos especializados que intervienen en la respuesta inmune (Cabello, 2007).

Se llama competencia inmunológica a la capacidad de los vertebrados de responder a estímulos, de tal forma que cumpla con las funciones del sistema

inmunitario, que son las de conservar la integridad genética del organismo, repeler y destruir a los invasores microbianos y reconocer y destruir las células neoplásicas (Cabello, 2007) La función fisiológica del sistema inmunitario consiste en la defensa contra los microorganismos infecciosos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede despertar una respuesta inmunitaria (Abbas *et al.*, 2008). La inmunidad puede estar mediada por células especializadas en defensa o por moléculas. Como ejemplo de estas últimas tenemos a las opsoninas, los anticuerpos, el complemento, etc (Cabello, 2007). Estas células y las moléculas actúan en conjunto en una red dinámica cuya complejidad es similar a la del sistema nervioso (Goldsby *et al.*, 2004).

La respuesta inmune tiene que cumplir con características que la identifican: debe ser específica, inducible, transferible y tener memoria. Estos cuatro elementos caracterizan totalmente la respuesta inmune.

- El agente invasor tiene características bien definidas y el aparato inmunológico forma elementos de defensa (anticuerpos) diseñados para reconocer sólo a estos invasores y no a otros. Si tiene alguna otra característica no reacciona con los anticuerpos previos, de ahí su especificidad. Esta especificidad está dada por las características moleculares de la estructura del agente invasor (antígeno). Todo está identificado a tal grado que el elemento de defensa es exactamente diseñado para este antígeno y no para otros, por eso se habla de especificidad molecular.
- La inducción se refiere a que la respuesta inmune no se da por casualidad, sino solo cuando llega una estructura extraña, y no antes. La presencia de lo extraño induce la respuesta inmune en forma específica para ese cuerpo y no para otro.
- La respuesta inmune es transferible, es decir, que hay manera de que las células o los anticuerpos específicos que se forman en un organismo, se puedan transferir a otro, a través de la sangre o de derivados líquidos o celulares.
- La respuesta inmune tiene memoria: la primera vez que llega el extraño no lo reconoce, hasta que lo estudia, y entonces genera la defensa molecularmente adecuada. De aquí en adelante ya sabe quién es, para que cuando llegue nuevamente lo reconozca no solo como extraño, sino como el que llegó en aquella ocasión, y trate de acabarlo (Cabello, 2007).

2.2- Respuesta inmunitaria innata y adaptativa

La defensa del organismo frente a la infección puede dividirse en innata y adaptativa (Halliwell *et al.*, 1992). La respuesta inmunitaria innata y adaptativa son los ingredientes de un sistema integral encargado de defender al hospedador, en el que funcionan numerosas células y moléculas de modo conjunto (Abbas *et al.*, 2008).

2.2.1.- Inmunidad innata

El organismo cuenta primero con barreras físicas constituidas por piel y mucosas. Como ayuda estas barreras disponen de auxiliares químicos, y en el caso de algunas mucosas, de la presencia de flora microbiana normal. La defensa a continuación depende de moléculas y células que entrarán en acción por diversos caminos (Cabello, 2007; Halliwell *et al.*, 1992).

La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural o espontánea) aporta la primera línea de defensa frente a los microbios. Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes:

- 1) Barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies.
- 2) Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK).
- 3) Proteínas sanguíneas, como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación.
- 4) Proteínas denominadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata (Abbas *et al.*, 2008; Goldsby *et al.*, 2004).

El organismo cuenta primero con barreras físicas constituidas por piel y mucosas. Como ayuda estas barreras disponen de auxiliares químicos, y en el caso de algunas mucosas, de la presencia de flora microbiana normal. La defensa a continuación depende de moléculas y células que entrarán en acción por diversos caminos (Cabello, 2007).

Los tres elementos de separación principales entre el medio y el huésped son la piel y las superficies mucosas de los aparatos digestivos y respiratorios. Todos están protegidos por unos epitelios continuos que impiden la entrada de los microbios, y la pérdida de su integridad suele predisponer a una infección. Las células efectoras más abundantes del sistema inmunitario innato son las que proceden de la médula ósea, circulan por la sangre y emigran hacia los tejidos. Entre ellas figuran las pertenecientes a la estirpe mielocítica, como los neutrófilos, los fagocitos mononucleares y las células dendríticas (Abbas *et al.*, 2008).

2.2.2 Inmunidad adaptativa

La respuesta inmune adaptativa se diferencia del sistema innato en que la primera tiene la capacidad de elaborar una respuesta específica frente a un agente patógeno invasor que, en el último término, conducirá a la eliminación del mismo (Goldsby *et al.*, 2004; Halliwell *et al.*, 1992). 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 microbio para responder con mayor energía. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son células llamadas linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos. En cambio, las sustancias ajenas que suscitan una respuesta inmunitaria específica o que constituyen el blanco de tales respuestas son los antígenos (Abbas *et al.*, 2008).

La inmunidad adaptativa posee cuatro atributos característicos: especificidad antigénica, diversidad, memoria inmunitaria y presencia o ausencia de autorreconocimiento (Goldsby *et al.*, 2004).

2.3 Clasificación de la inmunidad

De acuerdo con el mecanismo por el cual se adquiere la inmunidad, la clasificamos en inmunidad adquirida, natural y artificial o en inmunidad activa o pasiva. La inmunidad activa puede ser natural o artificial, al igual que la inmunidad pasiva.

Inmunidad activa natural es en la que la inmunidad fue activada en forma natural (por ejemplo, cuando se da una infección por un determinado agente infectante), tal como está diseñado por la naturaleza. Ante la presencia del agente infeccioso se activa el aparato inmunológico del propio organismo y se producen sus defensas humorales y celulares. Si los invasores, parte de ellos o sus productos son administrados con una preparación previa para que se forme una respuesta inmune primaria, entonces lo que se logra es una inmunidad activa, porque el organismo ha formado sus productos de defensa, pero artificial, porque se ha enfrentado a un inmunógeno con participación de la mano del hombre, para estimular el aparato inmunológico (Cabello, 2007).

El aumento de los títulos séricos de anticuerpos específicos debido a agentes infecciosos o toxinas puede ocurrir como resultado de la infección natural, o después de la inmunización con el antígeno correspondiente. (Newcombe y Newcombe, 2007) La diferencia entre activo y pasivo está en que el organismo pueda o no formar sus anticuerpos específicos y sus células sensibilizadas. Si obtiene de un organismo inmunizado y se ponen en otro organismo no inmunizado, es una inmunidad pasiva (Cabello, 2007).

2.3.1 Inmunidad humoral y celular

Existen dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar microbios de distintos tipos (Abbas *et al.*, 2008).

Se dice que es respuesta celular por que la reacción a los antígenos fue la de los linfocitos T. En cambio, la oposición que da el aparato inmune con la formación de anticuerpos se llama respuesta humoral, y se debe a los linfocitos B (Cabello, 2007).

2.3.2 Inmunidad humoral

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extra celulares y sus toxinas, debido a que los anticuerpos segregados pueden unirse a ellos y contribuir a su destrucción. Los propios anticuerpos están especializados, y cada tipo diferente puede activar unos mecanismos efectores distintos. Por ejemplo, hay alguna clase que favorecen la ingestión de los microorganismos por las células del huésped (fagocitosis), mientras que otras se fijan a ellos y desencadenan la liberación celular de los mediadores de la inflamación (Abbas *et al.*, 2008).

2.3.3 Inmunidad celular

La inmunidad celular queda a cargo de los linfocitos T (también llamados células T). Los microbios intracelulares, como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del huésped, donde los anticuerpos circulantes no los tienen a su alcance. La defensa contra estas infecciones corresponde a la inmunidad celular, que fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la desaparición de las células infectadas para suprimir los reservorios de la infección (Abbas *et al.*, 2008).

2.3.4 Respuesta inmune primaria y secundaria

Se llama respuesta inmune primaria, cuando se forma anticuerpos específicos y células sensibilizadas contra un antígeno determinado al que el aparato inmune se enfrentó por primera vez. Si este antígeno entra nuevamente al organismo, como ya hay anticuerpos específicos y células sensibilizadas, inmediatamente lo reconocen como extraño y lo atacan para tratar de destruirlo. Esto se conoce como respuesta inmune secundaria, la cual es mucho más rápida que la primaria, ya que en esta ocasión hay elementos circulantes con la información específica, además de ser una respuesta mucho más eficiente y protectora. Esto se denomina anamnesis o respuesta de memoria (Cabello, 2007).

2.5 Células del sistema inmunitario

Las células linfoides son las células que participan en la inducción, expresión y regulación de las respuestas inmunitarias adquiridas. Se incluyen aquí a los linfocitos T y B (y sus subpoblaciones), a los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno como las células dendríticas, las células de Langerhans y las células veladas. También se incluyen las células citolíticas naturales (células NK, natural killers) y las células NKT (natural killer T cells). Otras células importantes, no tanto en la inducción pero sí en la manifestación y regulación de la respuesta inmunitaria, son los neutrófilos, las células cebadas, los basófilos y los eosinófilos (Espinosa, 2006).

El sistema monocito-macrofágico está compuesto por unas células que pertenecen a una estirpe común cuya función principal es la fagocitosis, y que ocupan un lugar central en la inmunidad innata y adaptativa. Las células del sistema monocito-macrofágico se originan en la médula ósea, circulan por la sangre y maduran en diversos tejidos para quedar activadas.

Los neutrófilos, también denominados leucocitos polimorfonucleares, forman la población más abundante de leucocitos circulantes e intervienen en las primeras fases de las respuestas inflamatorias.

Las células dendríticas cumplen un cometido importante en las respuestas innatas a las infecciones y en su vinculación con la respuesta de la inmunidad adaptativa. Tienen prolongaciones membranosas largas y propiedades fagocíticas, siguen una amplia distribución por los tejidos linfáticos, el epitelio de las mucosas y el parénquima de los órganos.

Las células NK son una estirpe celular relacionada con los linfocitos, que reconoce las células infectadas o agredidas y responde mediante su destrucción directa y la secreción de citocinas inflamatorias. Los linfocitos NK constituyen entre el 5% y el 20% de las células mononucleares presentes en la sangre y en el bazo, y no son frecuentes en los demás órganos linfáticos.

Las células presentadoras de antígenos constituyen una población celular especializada en la captura de los antígenos microbianos o de otro tipo, su exhibición ante los linfocitos y la emisión de señales que estimulen su proliferación y su diferenciación.

Los linfocitos B, las células productoras de anticuerpos, recibieron este nombre porque en los pájaros se observó su maduración en un órgano llamado la bolsa de Fabricio. Los linfocitos T, los mediadores de la inmunidad celular, tomaron esta denominación debido a sus precursores que nacen en la médula ósea,

emigran hacia el timo y maduran allí; linfocitos "T" designa a los linfocitos derivados del timo (Abbas *et al.*, 2008).

2.5.1 ¿Qué son los anticuerpos?

Los anticuerpos (Ac) son un conjunto heterogéneo de proteínas que se producen por la estimulación antigénica del sistema inmunológico y que tienen la propiedad de reaccionar, específicamente, con el antígeno inductor de su producción (Cabello, 2007; Espinosa, 2006) encontrados en el plasma y los fluidos extracelulares que sirven como la primera respuesta y comprenden uno de los efectores principales del sistema inmune adaptativo (Lipman *et al.*, 2005) Los anticuerpos son por lo tanto de enorme utilidad en aplicaciones tales como la biología experimental, la medicina, la investigación biomédica, pruebas de diagnóstico y terapia (Leenaars y Hendriksen, 2005).

2.5.2 Estructura de un anticuerpo

Dado que un anticuerpo divalente tiene la estructura molecular más simple, se le denomina monómero. Un monómero típico tiene cuatro cadenas proteicas: dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (los adjetivos "pesadas" y "livianas" se refieren a sus pesos moleculares relativos). Las cadenas se encuentran unidas por enlaces disulfuro y otros enlaces que constituyen una molécula con forma de Y. La molécula con forma de Y es flexible y puede adoptar una forma de T. Las dos secciones situadas en los extremos de los brazos de la Y se denominan regiones variables (V) y son las que se unen a los epítomos. El tallo del monómero y las zonas inferiores de los brazos de la Y se denominan regiones constantes (C), que son iguales para una misma clase particular de inmunoglobulinas como se puede observar en la figura 1 (Tortora *et al.*, 2007).

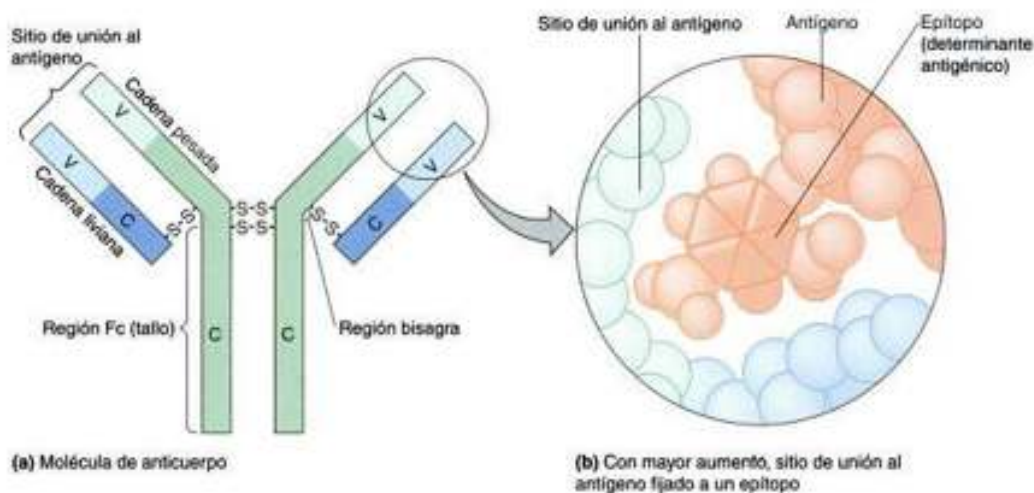


Figura 1.- Estructura de un anticuerpo (Tortora *et al.*, 2007)

2.5.3 Anticuerpos policlonales

Debido a que la mayoría de los antígenos son muy complejos, presentan numerosos epítomos que son reconocidos por un gran número de linfocitos. (Lipman *et al.*, 2005) Los anticuerpos que se recogen del suero de un animal inmunizado con un antígeno dado se denominan policlonales porque resultan de la estimulación simultánea de muchas células (Espinosa, 2006).

2.5.4 Anticuerpo monoclonal

Anticuerpos producidos en la sangre por un número muy variado de linfocitos (células B del sistema inmunitario). Cada célula B da origen a un anticuerpo único, específico. Por ello, los anticuerpos que, en la sangre del animal inmunizado, reconocen un determinado antígeno, son una mezcla de moléculas (anticuerpo policlonal). Los anticuerpos monoclonales proceden de un solo tipo de célula B (clon) que ha sido aislado e inmortalizado (Muñoz, 2001).

2.5.5 Función de los anticuerpos

Los anticuerpos juegan un papel importante en la defensa contra los patógenos invasores. Se reconocen y se unen específicamente a los antígenos extraños, lo que resulta en la activación de un número de funciones efectoras inmunes capaces de eliminar selectivamente micro-organismos extraños, virus y moléculas (Newcombe y Newcombe, 2007).

Los anticuerpos realizan dos funciones esenciales:

1. Los anticuerpos se unen a un epítomo en un antígeno con los brazos de la Y. Cada brazo o fragmento de anticuerpo monovalente (Fab1) de dominio contiene un sitio de unión, haciendo que cada molécula de anticuerpo al menos bivalente.
2. La región Fc de la Y del anticuerpo imparte funciones biológicas efectoras tales como la activación de las células asesinas naturales, la activación de la vía clásica del complemento y la fagocitosis (Lipman *et al.*, 2005).

2.5.6 Afinidad

La afinidad de un anticuerpo se refiere a la energía de enlace potencial contenida en cada uno de los sitios de combinación del anticuerpo y en ella participan todas las posibles interacciones con el antígeno (Espinosa, 2006).

2.5.7 Avidéz

La avidéz se refiere más bien al grado de interacción entre un anticuerpo y su antígeno homólogo (Coe Clough y Hauer, 2005; Espinosa, 2006).

2.6 ¿Para qué se emplean los sueros hiperinmunes?

Muchas de las áreas de la biotecnología tales como técnicas de inmunodiagnóstico se basan en el uso de anticuerpos específicos que se producen en animales de laboratorio a través de su respuesta inmune a un complejo inmunogénico (George *et al.*, 2012). El suero es adecuado para muchas aplicaciones, por ejemplo, la inmunotinción de transferencias Western, ELISA y de inmunoprecipitación de fijación del complemento (Leenaars *et al.*, 1999) procedimientos y ensayos mediados por anticuerpos son ampliamente utilizados por la industria de productos biológicos y organismos reguladores para evaluar y probar los productos biológicos (por ejemplo: vacunas y productos relacionados) (Coe Clough y Hauer, 2005).

La capacidad de los anticuerpos para unirse selectivamente a un epítipo presente en un producto químico específico, hidratos de carbono, proteína o ácido nucleico que ha sido completamente explotado a través de los años, como lo demuestra el amplio espectro de aplicaciones de investigación y clínico en el que se utilizan. Las aplicaciones incluyen cualitativo simple y / o análisis cuantitativos para determinar lo siguiente: (1) si un epítipo está presente dentro de una solución, célula, tejido u organismo, y si es así dónde? (2) métodos para facilitar la purificación de un antígeno, moléculas asociadas al antígeno o células que expresan un antígeno, y (3) técnicas que utilizan anticuerpos para mediar y / o modular los efectos fisiológicos de investigación, de diagnóstico o con fines terapéuticos (Lipman *et al.*, 2005).

Las terapéuticas policlonales pueden ser ventajosas al proporcionar la protección inicial tras la exposición a un agente tóxico en ausencia de una vacuna, o cuando los niveles de una respuesta inmune son bajos. Los anticuerpos policlonales muestran un enorme potencial como tratamientos para combatir el ántrax, la viruela y otros agentes de guerra biológica, imitando la inmunización pasiva que se produce naturalmente por lo tanto ofrece protección contra una variedad de patógenos incluyendo la difteria, el tétanos, estreptococos y las paperas.

Aunque la administración de anticuerpos o fragmentos derivados de animales (a menudo ovino o equino) puede tener una desventaja potencial clínica debido al riesgo asociado con la hipersensibilidad, enfermedad del suero y anafilaxia, los anticuerpos policlonales derivados del suero se han utilizado con éxito durante muchos años al tratar las mordeduras de serpientes y la intoxicación con digoxina, digitoxina (y una gama de cardiotoxinas estructuralmente

similares, como las toxinas de la planta adelfa (*Nerium oleander*)(Newcombe y Newcombe, 2007).

La integridad de cualquier prueba de actividad mediada por anticuerpos depende de la especificidad del anticuerpo. Debemos estar seguros de que estamos evaluando clínicamente importantes antígenos (o epítomos), con insignificante reactividad cruzada de antígenos relacionados (Coe Clough y Hauer, 2005).

2.6.1 ¿Cómo se producen los sueros hiperinmunes?

El hecho de que un antisuero policlonal se puede obtener en un corto período de tiempo (4-8 semanas) con una inversión financiera pequeña favorece su uso, mientras que toma alrededor de 3 a 6 meses para producir anticuerpos monoclonales (Leenaars y Hendriksen, 2005).

Los anticuerpos policlonales se pueden generar mucho más rápidamente, con menos gastos, y con menos habilidad técnica que se requiere para producir anticuerpos monoclonales (Lipman *et al.*, 2005).

De importancia primaria para la producción de anticuerpos policlonales son factores tales como el antígeno utilizado, la vía de inmunización, la especie animal, el tipo y la calidad del adyuvante, y el método de recogida de sangre.

De los varios pasos críticos implicados en la producción de anticuerpos policlonales incluyen los siguientes como mencionan Leenaars y Hendriksen (2005):

- (1) preparación del antígeno
- (2) selección de las especies animales
- (3) preparación del adyuvante
- (4) protocolo de inyección
- (5) observación después de la inyección
- (6) de recogida de los anticuerpos.

2.6.2 Preparación del antígeno

Tradicionalmente un antígeno se ha definido como todo aquel material, propio o extraño, soluble o particulado, que es capaz de despertar una respuesta inmunitaria en un individuo inmunológicamente competente (Cabello, 2007; Espinosa, 2006).

La naturaleza del antígeno, así como de la finalidad prevista del antisuero producido, debe reflejarse en la elección del protocolo de inmunización (Leenaars *et al.*, 1999) cuando se producen los anticuerpos, es importante considerar las características del antígeno, que incluyen la calidad y la cantidad del antígeno y la preparación de antígeno, demasiado antígeno o poco puede

inducir la supresión, la sensibilización, la tolerancia, o no deseada inmunomodulación (Leenaars y Hendriksen, 2005).

2.6.3 Selección de especie animal

Aunque varias especies de animales se utilizan para la producción de anticuerpos, conejos y ratones son las especies más frecuentemente utilizadas para la producción de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, respectivamente (Leenaars y Hendriksen, 2005).

Los excelentes resultados obtenidos en ovinos para la producción de anti-venenos se deben a su fácil manejo y mantenimiento, son económicos, presentan buena respuesta inmunológica, son resistentes, ausencia de reacciones locales, permitiendo así la obtención de un anti-veneno efectivo, de bajo costo y que provee buena protección. Desde hace más de un siglo, el caballo ha sido el animal utilizado para la producción de anti-venenos debido a su fácil manejo, gran volumen sanguíneo y plasmaféresis. A pesar de estas ventajas, existen numerosos factores importantes a considerar en la producción de anti-venenos, tales como: costos de adquisición y mantenimiento e inmunorespuesta local exacerbada, lo cual resulta en la formación de grandes abscesos, fístulas y fibrosis en el lugar de la inoculación (Montilla *et al.*, 2007).

El uso de animales libres de enfermedad minimiza la probabilidad de reactividad cruzada con otros antígenos del sistema inmune del animal puede haber encontrado (Leenaars y Hendriksen, 2005).

2.6.4 Preparación del adyuvante

La mezcla de inoculación (antígeno/adyuvante) se deben preparar asépticamente para minimizar el riesgo de una posible contaminación (Leenaars *et al.*, 1999).

Adyuvante/antígeno Recomendaciones de Preparación:

- Preparar las mezclas de forma aséptica.
- Es importante vigilar cuidadosamente la estabilidad y la calidad de la emulsión.
- Seleccionar cuidadosamente la vía de inyección y volumen, especialmente cuando se utilizan adyuvantes oleosos.(Leenaars y Hendriksen, 2005)

los efectos locales y sistémicos son secuelas indeseables que resultan del uso adyuvante para la producción de anticuerpos y puede resultar en dolor y sufrimiento al animal hospedero (Stills, 2005).

2.6.5 Protocolo de inyección

En el caso de los anticuerpos policlonales, los animales reciben inyecciones de mezclas antígeno o antígeno / adyuvante para la inducción de respuestas de anticuerpos eficaces, y por lo general es necesario recoger la sangre para monitorizar la respuesta de anticuerpos durante el experimento y para obtener los anticuerpos (Leenaars y Hendriksen, 2005) el inmunógeno se introduce en el sistema inmunológico del animal con la ayuda de un adyuvante que puede funcionar en uno o más de los tres mecanismos básicos. Se puede proporcionar un efecto de "depósito" para alargar el tiempo que el sistema inmune del anfitrión está expuesta al inmunógeno, sino que puede actuar directa o indirectamente como un mediador de la función de las células inmunes y que puede actuar como un vehículo para transportar el inmunógeno hacia los nódulos linfáticos (George *et al.*, 2012).

Después de la inmunización, los animales deben ser monitoreados diariamente y se examinan los efectos secundarios específicos de por lo menos tres veces por semana. El examen y la palpación de la zona de inyección son esenciales para evaluar los efectos secundarios de la mezcla inyectada.

En general, una dosis de refuerzo se puede considerar después de que el título de anticuerpo ha alcanzado una meseta o comienza a disminuir. Cuando la primera inmunización se lleva a cabo sin un adyuvante de formación de depósito, el pico de anticuerpos por lo general se da 2 a 3 semanas después de la inmunización. Cuando un adyuvante de formación de depósito se utiliza, una inyección de refuerzo probable sigue al menos 4 semanas después de la primera inmunización. El tiempo entre dos pasos de inmunización puede afectar tanto a la inducción de las células B de memoria y el cambio de clase de células B (Leenaars y Hendriksen, 2005).

Inyecciones primarias con cantidades muy bajas de antígeno (picogramos) no se recomiendan, ya que este no estimula la memoria inmunológica suficientemente, y puede inducir tolerancia al antígeno. Sin embargo, cantidades bajas de antígeno para la inmunización de refuerzo pueden ayudar a aumentar la afinidad promedio de los anticuerpos producidos posteriormente. Incluso cuando los títulos de anticuerpos en suero se han reducido a niveles relativamente bajos, una inyección de refuerzo en un animal que ha establecido previamente una respuesta de memoria normalmente se vuelve a establecer un alto título de anticuerpos del suero (Leenaars *et al.*, 1999).

2.6.6 Vía de inyección

La elección de la vía de inyección se forma en cierta medida por la elección de la especie animal y adyuvante, así como por el carácter, la cantidad, y el volumen del antígeno. Las rutas más usadas de inyección para la producción de anticuerpos policlonales son subcutánea (SC), intradérmica (ID),

intramuscular (IM), intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV) (Leenaars y Hendriksen, 2005). En el cuadro 1 se muestran las ventajas y desventajas de cada vía de inyección.

La forma subcutánea o intradérmica se utiliza comúnmente para tomar ventaja de la presencia de células de Langerhans. Las inyecciones intradérmicas tienen la ventaja de ser fácilmente visualizados y controlados, aunque el potencial de ulceración y puede la inyección en la dermis ser dolorosa.

La vía subcutánea es la vía de administración más común y es la mejor opción para la inmunización de rutina. Una inyección subcutánea se debe dar en un pliegue de piel suelta (por ejemplo, el cuello, el costado, en la ingle), pero evitando los puntos al manipular el animal (Health, 2000) Las inyecciones subcutáneas evitan el potencial de dolor de la inyección, y permiten la migración de adyuvante inyectado y los posibles trayectos fistulosos. Las inyecciones intramusculares tienen la ventaja de la facilidad de inyección y la capacidad de administrar inyecciones de gran volumen en un solo sitio. Las desventajas incluyen la incapacidad para controlar el lugar de la inyección con las lesiones inflamatorias conocidas de cerca y el potencial de dolor de la inyección. Las inyecciones Intradérmicas, subcutáneas e intramusculares son vías de administración del adyuvante y son generalmente aceptados por el cuidado animal institucional y comités de uso en los Estados Unidos.

Las inyecciones intradérmicas de adyuvante completo de Freund se asocian con grandes granulomas palpables que a menudo se ulceran. Las inyecciones subcutáneas pueden migrar desde el sitio de inyección y el resultado en los tractos fistulosos que eventualmente se tienen que abrir y drenar, las inyecciones intramusculares se asocian con la formación de granulomas, que se extienden a través de los planos musculares con posible implicación del nervio. Además de las lesiones de la zona de inyección, los granulomas son frecuentemente detectados en los ganglios linfáticos de drenaje, bazo, pulmón, riñón y otros órganos, donde microgotitas de la emulsión se han distribuido por el sistema linfático y circulatorio después de la inyección (Stills, 2005).

Las inyecciones intraperitoneales de adyuvantes se utilizan con frecuencia en ratones y otros roedores pequeños pero se sabe que inducen una reacción inflamatoria local y aguda, cambios de comportamiento, y peritonitis. Inyecciones intraperitoneales generalmente no se recomiendan para la producción de anticuerpos policlonales.(Leenaars *et al.*, 1999) Para asegurar que los animales experimentan molestias mínimas en el sitio de la inyección del antígeno, el volumen de inyección debe ser tan pequeña como sea posible (Leenaars *et al.*, 1999).

En ratones y ratas, una solución de antígeno se debe administrar por vía oral por medio de una cánula abombada. La cánula se empuja hacia abajo en el estómago a través del Palatum de la boca (Health, 2000).

2.6.7 Revisión post-inmunización

Especial atención debe prestarse a aspectos como la apariencia general del animal, la higiene física, la temperatura corporal, la alimentación y la ingesta de agua, el peso, el sitio de inyección, etc. Se debe considerar la eutanasia en el caso de problemas graves (Health, 2000).

2.6.8 Sangrado

El desangrado debe realizarse bajo anestesia general y se realiza mejor mediante punción cardíaca. El volumen que se elimina por sangrado, no debe superar el 15% del volumen total de la sangre, en la práctica, una cantidad de hasta 1% del peso total del cuerpo puede ser retirado.

Las muestras de sangre deben tomarse con un mínimo de estrés para el animal. Los animales vacunados deben estar condicionados y tener confianza con el personal de cuidado de los animales (Leenaars *et al.*, 1999).

Cuadro 1.- Vías de inyección de adyuvante para los animales de investigación: Detalles, ventajas y desventajas (Leenaars y Hendriksen, 2005)

Vía	Detalles	Ventajas	Desventajas
S.C.	Ruta más utilizada Ruta preferida No se inyecte el material en una parte restringida del animal utilizado Limitar ubicación a menos de 4 sitios	Volúmenes relativamente grandes se pueden administrar Procesos inflamatorios pueden controlarse fácilmente	Lenta absorción
I.M.	Los músculos esqueléticos están bien vascularizado No se recomienda para la inyección de adyuvante de aceite en roedores	Rápida absorción, en particular con la actividad muscular en animales grandes, se puede administrar volúmenes relativamente altos	Inyección dentro el espacio cerrado, es dolorosa. Antígeno y el adyuvante pueden expandirse por planos interfaciales y paquetes nerviosos y pueden dañar el nervio ciático y tiene otros efectos secundarios graves. Reacciones locales pueden ser fácilmente pasadas por alto.
I.P.	No recomendado para la inyección de adyuvante oleoso. Ruta eficiente para administración de antígenos	Relativamente grandes volúmenes de inóculo pueden ser acomodados	Alto porcentaje relativo de fracaso de inyección Adyuvante de aceite provoca peritonitis Riesgo de shock anafiláctico en inyección de refuerzo
I.V.	No recomendado para antígenos insolubles No recomendado para la inyección de adyuvante oleoso Antígeno se entrega principalmente para el bazo y los ganglios linfáticos secundaria	Distribución rápida del antígeno	Sin aceite o adyuvante gel viscoso se puede utilizar Alto riesgo de shock anafiláctico en inyección de refuerzo
I.D.		El procesamiento eficaz de antígeno debido a la alta densidad de las células dendríticas de Langerhans. Pequeñas cantidades de antígeno ya eficaces	Inyección dentro el espacio cerca de la dermis, que es dolorosa Utilizado de adyuvante oleoso conduce a procesos ulcerativas

2.7 Que son los adyuvantes y para que se emplean

Cuando el antígeno al cual los anticuerpos deben ser evocados es poco inmunogénico, el sistema inmune requiere un estímulo para inducir una respuesta inmune efectiva. Los adyuvantes se pueden utilizar para este propósito, y puede dirigir una respuesta inmune contra una respuesta humoral o celular (Leenaars y Hendriksen, 2005).

Los adyuvantes son sustancias o procedimientos que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados. La palabra adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa ayudar, asistir (Rubido y Angulo, 2000; Sivakumar *et al.*, 2011; Stills, 2005) con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos. (Quevedo *et al.*, 1999) La solución que se inyecta o emulsión deben ser preferiblemente estériles. La preparación debe realizarse asépticamente. Las agujas o cánulas que se utilizan deben ser estériles. El inóculo debe ser preferiblemente isotónico y al menos a temperatura ambiente (Health, 2000).

El adyuvante ideal podría ser caracterizado como una sustancia que estimula altos y sostenibles títulos de anticuerpos (incluso con pequeñas cantidades de antígeno), es eficaz en una variedad de especies, aplicables a una amplia gama de antígenos, es fácilmente reproducible y preparado en una mezcla de inyección, es fácilmente inyectable, es eficaz en un pequeño número de inyecciones, tiene baja toxicidad para el sujeto inmunizado, y no es dañino para el investigador (Leenaars *et al.*, 1999; Rubido y Angulo, 2000).

Los adyuvantes no son necesarios cuando se utilizan bacterias completas, células enteras u otros antígenos particulados (por ejemplo, fracciones celulares y paredes celulares de las bacterias), pero a menudo son necesarios en el caso de antígenos solubles (proteínas, péptidos, polisacáridos) (Leenaars *et al.*, 1999).

2.7.1 Uso de un adyuvante

Los adyuvantes se pueden utilizar para diversos fines:

1. Para aumentar la respuesta inmune de los antígenos mediante la entrega en forma nativa.
2. Para reducir el protocolo de inmunización múltiple para la inmunidad protectora. En particular, el desarrollo de la cobertura de vacunación único paso que puede reducir los costos de la vacunación.

3. Para mejorar la respuesta inmune de los adultos inmunodeprimidos y el sistema inmunológico debilitado de los niños, para provocar la respuesta de linfocitos T citotóxicos y generar una respuesta inmune local (Sivakumar *et al.*, 2011).

Los adyuvantes que se utilizan para fines experimentales se utilizan para producir anticuerpos para uso en otros procedimientos experimentales o de diagnóstico. El objetivo principal de la producción experimental de anticuerpos policlonales es obtener volúmenes suficientemente altos de anticuerpos de alta afinidad en un título económicamente alto. Los adyuvantes usados para este propósito se utilizan principalmente para mejorar la reacción al antígeno y para aumentar la respuesta de anticuerpos en intensidad y duración (Stills, 2005).

2.7.2 Selección de un adyuvante

Con fines investigativos, las exigencias más importantes se relacionan con una elevada eficacia, un amplio espectro de aplicación, una fácil manipulación y, por supuesto, la disponibilidad comercial (Quevedo *et al.*, 1999), la razón principal para el uso de un adyuvante en la inmunización de un animal experimental es producir un alto título, alta afinidad y alta avidéz de los anticuerpos para su uso en otros experimentos (Stills, 2005).

Entre los factores involucrados en la selección de un adyuvante se encuentran: el tipo de respuesta deseada o que se quiere evitar, la especie vacunada, la ruta de administración y los efectos colaterales inducidos por el adyuvante (Rubido y Angulo, 2000), El criterio más importante, sin lugar a dudas, para la selección de un adyuvante destinado a vacunas humanas es la bioseguridad y, en la práctica, los compuestos de aluminio son los únicos adyuvantes licenciados para uso humano (Quevedo *et al.*, 1999).

2.7.3 Clasificación de los adyuvantes

Los adyuvantes inmunológicos pueden ser clasificados atendiendo a su fuente de origen, mecanismos de acción y propiedades fisicoquímicas. Los adyuvantes pueden ser separados en tres clases amplias: (i) inmunoestimulantes activos, que son agentes que aumentan la respuesta inmune específica contra el antígeno; (ii) portadores, que son proteínas inmunogénicas que proporcionan ayuda de células T; y (iii) adyuvantes tipo vehículo, como las emulsiones oleosas y los liposomas, que sirven como matriz para el antígeno y para la inmunoestimulación. Esta clasificación tiende a confundir por la propia forma en que se dividen (Rubido y Angulo, 2000), los adyuvantes pueden dividirse en tres grupos principales, adyuvantes tensioactivos, adyuvantes de vesículas y adyuvantes solubles en agua sobre la base de sus características físicas (Alexander y Brewer, 1995).

2.7.4 Función de los adyuvantes

Se les atribuyen 2 funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y, por otra parte, la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y de la respuesta de los animales de laboratorio durante la inmunización experimental con vistas a la producción de antisueros (Fodey *et al.*, 2008; Quevedo *et al.*, 1999).

La función de los adyuvantes inmunológicos en el diseño racional de vacunas, es dirigir y optimizar respuestas inmunes apropiadas hacia epítopos vacunales protectores (Rubido y Angulo, 2000). Algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos; pero, en general, éstas funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladoras al tejido linfóide. Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos; éstos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos (Quevedo *et al.*, 1999).

2.7.5 Mecanismo de acción de los adyuvantes

los adyuvantes pueden tener un máximo de cinco de los siguientes mecanismos de acción: efecto "deposito", un efecto de presentación de antígeno, distribución de antígeno o el efecto objetivo, un efecto inmunológico de activación/modulación, y un efecto inducción de linfocitos cito-tóxicos (Stills, 2005).

2.7.6 Efecto deposito

Un mecanismo clásico de acción del adyuvante es el efecto "deposito", en el que el adyuvante protege el antígeno de la degradación, dilución y rápida eliminación por el anfitrión. Mediante la localización y liberando lentamente el antígeno intacto, el adyuvante permite una exposición lenta y prolongada de las células del sistema inmunológico a un bajo nivel de antígeno. Esto da como resultado una prolongada exposición y la estimulación continua de los anticuerpos producidos, resultando en la producción de altos niveles de anticuerpos por el anfitrión (Alexander y Brewer, 1995; Cox y Coulter, 1997; Stills, 2005).

2.7.7 Presentación

Esto se refiere a la capacidad de un adyuvante para preservar la integridad conformacional de un antígeno y de presentar este a las células efectoras inmunes apropiadas (Cox y Coulter, 1997).

2.7.8 Cambios en el tráfico celular

Los principales tipos de células que participan en esta reacción son aquellos del linaje de macrófagos / monocitos. La mayoría de los adyuvantes también inducen aumento y prolongación de la circulación de los linfocitos a través de los ganglios linfáticos locales, un efecto conocido como captura de linfocitos (Alexander y Brewer, 1995).

2.7.9 Focalización del antígeno

Asociación de antígeno con grandes estructuras particulares (por ejemplo, adyuvantes vesiculares tales como liposomas) se sabe que aumenta la entrega de antígeno a las células presentadoras de antígeno (Alexander y Brewer, 1995).

2.7.10 Efectos sobre la expresión de MHC de clase II

Ciertos adyuvantes pueden funcionar mediante la regulación positiva de la expresión de MHC de clase II aumentando así la presentación de antígenos a las células (Alexander y Brewer, 1995).

2.7.11 Ventajas de usar un adyuvante

Entre las ventajas del uso de adyuvantes se hallan: (i) su capacidad de potenciar la inmunogenicidad de antígenos con un grado de pureza elevado o recombinantes; (ii) la reducción de la cantidad de antígeno y del número de reinmunizaciones requeridas para proveer una inmunidad protectora; (iii) el aumento de la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos y las personas inmunocomprometidas, y (iv) permitir el envío mucosal de vacunas dirigidas a incrementar la respuesta inmune a nivel de mucosas (Rubido y Angulo, 2000).

2.7.12 Efectos adversos

Las reacciones adversas asociadas a los adyuvantes se clasifican en locales y sistémicas. Las reacciones adversas locales incluyen dolor, inflamación local, necrosis en el sitio de la inyección o en zonas adyacentes, linfadenopatías regionales y, en raras ocasiones, la inducción de granulomas y la formación de abscesos estériles. Las reacciones sistémicas observadas incluyen náuseas, fiebre, artritis por adyuvante y uveítis, anafilaxis, toxicidad específica de órgano

e inmunotoxicidad, como por ejemplo, liberación de citocinas, inmunosupresión y enfermedades autoinmunes (Rubido y Angulo, 2000).

2.8 Tipos de adyuvantes

Los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas veterinarias son las emulsiones de aceite mineral (del tipo aceite en agua o agua en aceite) y los adsorbentes (hidróxido y fosfato de aluminio). En algunos casos, se emplean liposomas, saponinas, vitamina E, complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), así como diferentes emulsiones de aceites de origen vegetal o animal. Las emulsiones de aceite mineral, especialmente las del tipo agua en aceite, si bien inducen una fuerte respuesta inmune, pueden provocar riesgos y efectos no deseados, a causa posiblemente de su limitada biodegradabilidad y biocompatibilidad (Quevedo *et al.*, 1999).

Los adyuvantes usados para la producción de anticuerpos policlonales incluyen el adyuvante completo de Freund (FCA1), el adyuvante incompleto de Freund (FIA1), sales de aluminio (por ejemplo, $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4), Quil A, Iscoms, Montanide, TiterMax [™], y RIBI [™] (Leenaars y Hendriksen, 2005).

2.8.1 Adyuvante completo de Freund

Adyuvantes completo e incompleto de Freund son adyuvantes a base de aceite mineral que se han utilizado comúnmente con animales de laboratorio, pero la formación de lesiones locales y sistémicas, ha llevado a los investigadores a considerar alternativas. (George *et al.*, 2012) Adyuvante completo de Freund, preparada a partir de un aceite de parafina no metabolizable que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerta por calor, se ha utilizado comúnmente en el laboratorio para las inmunizaciones primarias. Las inmunizaciones de refuerzo se administran con la versión incompleta que no contiene la bacteria muerta (Fodey *et al.*, 2008; Stills, 2005).

El adyuvante completo de Freund se utiliza con frecuencia para la producción de anticuerpos policlonales debido a altos títulos de anticuerpos que son inducidos a casi todos los tipos de antígenos (Leenaars y Hendriksen, 2005) ha sido el adyuvante más ampliamente utilizado y efectivo para la producción de anticuerpos experimentalmente (Stills, 2005).

El aceite mineral usado en adyuvantes de Freund ha tenido tradicionalmente los siguientes tres mecanismos de acción específicos: (1) establecer un depósito de antígeno con la liberación lenta del antígeno, (2) proporcionar un vehículo para el transporte de antígeno a través del sistema linfático a las células efectoras inmunes, y (3) la interacción con las células presentadoras de antígeno, incluyendo fagocitos, macrófagos y células dendríticas (Stills, 2005).

2.8.2 TitterMax y TitterMax Gold

TitterMax y TitterMax Gold (CytRx, Norcross, GA) consisten de escualeno (un aceite metabolizable), un emulsionante (monooleato de sorbitán 80), un copolímero de bloque patentado (CRL8941 o CRL8300, respectivamente), y la sílice en micro partículas (Stills, 2005).

2.8.3 Adyuvante RIBI

El sistema adyuvante RIBI ® (RAS ®) (Corixa Corporation, Seattle, WA) es un sistema adyuvante comercial que ha estado disponible para el uso experimental desde 1985. El sistema RAS ® utiliza una pequeña cantidad de aceite de escualeno metabolizable y un agente tensioactivo Tween 80 en el que se incorpora el antígeno antes de la emulsión en agua (Stills, 2005).

2.8.4 Specol

Specol (ID-DLO, Lelystad, países bajos) es un adyuvante compuesto de un aceite mineral purificado y define la luz (Markol 52) con los emulsionantes Span 85 y tween 85 (Stills, 2005).

2.8.5 Compuestos de aluminio

Los compuestos basados en aluminio, a pesar de ser considerados seguros, son adyuvantes débiles y muy poco consistentes en su capacidad de estimular respuestas inmunes mediadas por células, especialmente respuestas de células T citotóxicas. En vacunas veterinarias, estos adyuvantes han sido utilizados ampliamente contra agentes virales y bacterianos, así como en vacunas antiparasitarias (Rubido y Angulo, 2000).

Compuestos de aluminio, especialmente fosfato de aluminio e hidroxido de aluminio, se utilizan habitualmente como adyuvantes de la vacuna en forma de preparados humanos. A diferencia de las emulsiones, los adyuvantes de aluminio se unen a antígenos por medio de fuerzas electroestáticas entre el adyuvante y el antígeno con otras interacciones, incluyendo interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der waals y enlaces de hidrógeno (Fodey *et al.*, 2008; Stills, 2005).

Con el adyuvante de aluminio los antígenos se eliminan rápidamente después de la inyección, lo que conduce al pico títulos de anticuerpos 3 a 4 semanas después de la inyección con un rápido descenso, aunque las inyecciones repetidas pueden conducir a respuestas de anticuerpos prolongados (Stills, 2005).

2.8.6 Emulsiones

Se encuentran en esta categoría las emulsiones de aceite como el AIF, Montanide, Adyuvante 65 y Lipovant. El mecanismo de acción del AIF se atribuye a la formación de un depósito en el sitio de inyección que posibilita la liberación lenta del antígeno, con lo que se estimulan las células productoras de anticuerpos (Rubido y Angulo, 2000), las emulsiones son los agentes de depósito más comúnmente utilizados en la producción experimental de anticuerpos policlonales. Las emulsiones pueden ser de agua-en-aceite, emulsiones de aceite-en-agua, o tipos más complejos, tales como las emulsiones de agua-aceite-agua. Los aceites que se utilizan actualmente en adyuvantes en emulsión altamente purificados incluyen aceites minerales ligeros y aceites biodegradables, como escualeno y escualano (Stills, 2005).

La Formulación de Adyuvante Syntex (SAF, 1 SAF-1, SAFm) ® (Chiron Corporation, Emeryville, CA) es un adyuvante de emulsión microfluidificada aceite-en-agua compuesta de treonilo muramil dipéptido (t-MDP1) en un vehículo de emulsión que consiste en 5% escualano, 2,5% Pluronic ® L121, 2,0 % polisorbato 80 (Tween 80), y tampón fosfato salino.

A diferencia de las emulsiones de agua-en-aceite, que forman depósitos en el sitio de inyección, aceite-en-agua tiende a ser transportadas rápidamente a los tejidos linfáticos de drenaje y no tienden a formar depósitos en los sitios de inyección. Esta tendencia a no formar depósitos locales alivia el potencial de la inflamación crónica, la destrucción de tejido, y las secuelas en el sitio de inyección, por lo que las emulsiones de agua-en-aceite son más probables candidatos para vacunas terapéuticas (Stills, 2005).

2.8.7 Muramildipeptido (MDP)

Se ha demostrado que el muramildipéptido (MDP) activa varios tipos celulares (macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos, entre otros) e induce la secreción de una variedad de citocinas, incluidos la interleuquina 1 (IL-1), el factor de crecimiento de células B y el factor de activación de fibroblastos. El MDP provoca, además, un incremento en la producción de superóxidos, prostaglandinas y colagenasa (Rubido y Angulo, 2000).

2.8.8 Liposomas

Los liposomas son glóbulos sintéticos formados por capas de lípidos que encapsulan las sustancias terapéuticas, y constituyen uno de los vehículos más utilizados para las investigaciones en vacunas (Rubido y Angulo, 2000).

2.8.9 Saponinas

Las saponinas son glicósidos tensoactivos que contienen un núcleo hidrofóbico de estructura triterpenoide, y cadenas de carbohidratos enlazadas al triterpeno que conforman regiones hidrofílicas [46]. Entre las propiedades asociadas a las saponinas de *Q. saponaria* Molina, se incluyen: un excelente efecto adyuvante para antígenos tanto T-dependientes como T-independientes, y la estimulación de isotipos asociados a respuestas de células T auxiliaadoras de tipo 1 (Th1)(Rubido y Angulo, 2000).

2.8.10 Carbohidratos como adyuvantes

Muchos carbohidratos complejos de origen natural estimulan las células de los sistemas inmune y reticuloendotelial. Entre ellos se encuentran los polímeros de plantas y hongos como los glucanos, las dextranas y los lentinanos —todos ellos polímeros de glucosa—, y los mananos, entre los que se encuentran los glucomananos y los galactomananos (Rubido y Angulo, 2000).

2.8.11 Bacterias como adyuvantes

Entre las bacterias usadas como adyuvantes se incluyen: *Mycobacterium spp.*, *Corynebacterium parvum* o *C. granulosum*, y *Bordetella pertussis* (Rubido y Angulo, 2000).

2.8.12 Adyuvante Gerbu

Adyuvantes Gerbu emplean nanopartículas catiónicos en una suspensión coloidal para reemplazar la emulsión de agua-en-aceite clásico. Se unen al antígeno y de inmediato lo llevan a los linfocitos de la fagocitosis (Fodey *et al.*, 2008).

2.8.13 Citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas producidas por las células blancas de la sangre que actúan como mensajeros químicos entre las células y el crecimiento de la influencia y la diferenciación de las células B y T y las APC. Ellos incluyen las interleucinas, linfocinas y moléculas de señal celular, tales como el factor de necrosis tumoral y los interferones, que desencadenan la inflamación y responden a las infecciones. Estas propiedades han llevado a su uso como adyuvantes, ya que pueden ser administrados a sí mismos o producidos localmente como un efecto secundario de la inmunización con otro adyuvante, por ejemplo, un producto bacteriano (Fodey *et al.*, 2008).

2.9 Técnicas empleadas para determinación de anticuerpos en suero

Existen seis tipos fundamentales de pruebas serológicas: la reacción de precipitación, de aglutinación, de fijación del complemento, de inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Ingraham y Ingraham, 1998).

2.9.1 Prueba de precipitación

A veces, las moléculas libres de antígenos y anticuerpos se unen para formar una especie de malla, o grandes agregados macromoleculares. La formación de estos agregados es el fundamento de un tipo de prueba conocida como la prueba de precipitación.(Ingraham y Ingraham, 1998) En las pruebas de precipitación el producto final de la precipitación forma grumos macroscópicos o microscópicos (Forbes, 2009).

2.9.2 Prueba de precipitina

La prueba de precipitina es un tipo de precipitación que habitualmente se realiza en medio líquido. Cuando un líquido que contiene un anticuerpo se mezcla en un tubo de ensayo con un líquido que contiene antígeno, se forma un precipitado blanquecino en la zona en la que el antígeno y el anticuerpo se encuentran en proporciones óptimas. Aunque la unión inicial antígeno-anticuerpo se efectúa al cabo de unos minutos, pueden transcurrir varias horas antes de que se forme un grumo suficientemente grande como para que se precipite (Ingraham y Ingraham, 1998).

2.9.3 Prueba de inmunodifusión

La prueba de inmunodifusión es un tipo de precipitación que se realiza en un gel-por ejemplo, sobre una placa de Petri con agar. En unos pocillos excavados en el agar se colocan las respectivas preparaciones de antígenos y anticuerpos; las moléculas difunden a través del gel hasta que se ponen en contacto y dan lugar a precipitados. Las zonas donde se produce el precipitado se observan fácilmente como líneas blanquecinas que destacan sobre el fondo de agar (Ingraham y Ingraham, 1998; Tizard, 2009).

2.9.4 Inmunodifusión simple

En la prueba de inmunodifusión simple, el gel de prueba contiene un solo tipo de anticuerpos y las muestras clínicas sospechosas de contener un antígeno específico se enfrentan a dicho anticuerpo. Se forman líneas curvas o arcos radiales (no un círculo completo) de precipitado, alrededor de los pocillos que contienen los antígenos complementarios.

2.9.5 Inmunodifusión doble

En esta prueba se colocan distintas combinaciones de antígenos y anticuerpos en pocillos separados, formándose las líneas de precipitación en aquellas zonas en las que se encuentran el antígeno y el anticuerpo. Según sea el patrón característico de estos precipitados, se puede determinar en número e identidad de los antígenos o anticuerpos presentes en la muestra.

2.9.6 Prueba de inmunolectroforesis

En esta prueba, se acelera la velocidad del desplazamiento del antígeno y del anticuerpo a través del gel mediante la aplicación de una corriente eléctrica. La electroforesis posee dos ventajas: en primer lugar, al acelerar el desplazamiento se obtienen los resultados más rápidamente que con la difusión simple; en segundo lugar, se puede separar en distintas bandas de precipitación los componentes de una mezcla compleja de antígenos y anticuerpos, a diferencia de la prueba de difusión simple (Ingraham y Ingraham, 1998).

2.9.7 Prueba de contrainmunolectroforesis

Esta prueba se basa en la carga eléctrica neta de los antígenos y los anticuerpos que se estudian en un buffer de prueba determinado. Como el antígeno y los anticuerpos que se buscan migrar uno hacia otro en una matriz semisólida bajo la influencia de una corriente eléctrica, el método se conoce como contrainmunolectroforesis (Forbes, 2009).

La contrainmunolectroforesis (CIE) se utiliza para una detección rápida de la presencia en una muestra de un determinado tipo de antígeno o anticuerpo. Con frecuencia se utiliza en el diagnóstico precoz de infecciones bacterianas graves como la meningitis bacteriana. Para ello, se coloca en un extremo de un gel de agarosa una muestra de líquido cefalorraquídeo o de orina, que se sospecha puedan contener antígenos bacterianos; en el otro extremo se pone una suspensión del anticuerpo específico. Cuando se aplica la corriente eléctrica, tanto el antígeno como el anticuerpo se desplazan hacia el extremo opuesto del gel. Si se produce una unión antígeno-anticuerpo, se observa una zona de precipitación en la zona ecuatorial del gel, indicando un resultado positivo (Ingraham y Ingraham, 1998).

2.9.8 Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional es una técnica especialmente eficaz para separar mezclas complejas de antígenos o anticuerpos. La muestra se separa electroforéticamente en una dirección, y luego se cambia la orientación de la corriente eléctrica para separarla en otra dirección. El número y localización de

los arcos de precipitina nos indica el número e identidad de las diferentes proteínas que se encuentran en la mezcla

2.9.9 Prueba de aglutinación

En la prueba de aglutinación, el antígeno o el anticuerpo se fija a una partícula de gran tamaño, como una célula o una bolita de látex. Por lo tanto, en la prueba de aglutinación se forma un coagulo visible que está constituido por el antígeno, al anticuerpo y las partículas a las que se fijan.

2.9.10 Aglutinación directa

En la prueba de aglutinación directa intervienen antígenos o anticuerpos que forman parte de manera natural de una partícula de mayor tamaño, como un microorganismo o un eritrocito; si la partícula es un eritrocito, la prueba se denomina prueba de hemaglutinación

2.9.11 Aglutinación indirecta

En la prueba de aglutinación indirecta los antígenos o los anticuerpos se adsorben de forma artificial a una partícula, por ejemplo, una partícula de látex.

2.9.12 Prueba de inmunofluorescencia

En las pruebas de inmunofluorescencia, los anticuerpos se ligan covalentemente a colorantes fluorescentes para permitir su fácil observación. El color de los anticuerpos está determinado por el tipo de colorante que se utiliza. Los anticuerpos fluorescentes pueden emplearse para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos en el interior de los tejidos o sobre las células.

Las pruebas de inmunofluorescencia pueden ser directas o indirectas. Las directas emplean anticuerpos fluorescentes que se unen al antígeno objeto del estudio y los hacen visibles bajo la luz ultravioleta. Las pruebas indirectas son más complicadas al estar diseñadas para detectar anticuerpos, en vez de antígenos. Para ello, se debe preparar una solución de anticuerpos fluorescentes que se una al anticuerpo objeto de estudio (Ingraham y Ingraham, 1998).

2.9.13 Radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) es un método automatizado para detectar anticuerpos que habitualmente se realiza en un laboratorio de química y no de serología. (Forbes, 2009) Los ensayos que utilizan radioisótopos como marcadores tienen la ventaja de ser extremadamente sensibles. Por otra parte, los sistemas de detección de isótopos son caros lo que, combinados con los riesgos de la radioactividad y la necesidad de eliminar el material radioactivo

con la máxima seguridad, hace del radioinmunoanálisis una opción razonable solo cuando se requieren ensayos altamente sensibles (Tizard, 2009).

En el radioinmunoensayo, el reactivo contiene un anticuerpo que está ligado a una molécula radioactiva, en vez de a un compuesto fluorescente. En estas pruebas se puede detectar cantidades extraordinariamente pequeñas del antígeno o el anticuerpo, debido a que se puede medir con instrumentos adecuados el descenso en la concentración de incluso un solo átomo radioactivo (Ingraham y Ingraham, 1998).

2.9.14 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Es un método empleado habitualmente para la detección y/o cuantificación de sustancias, generalmente proteínas, que se encuentran en concentraciones muy bajas. Se utiliza para cuantificar, entre otras cosas, hormonas y marcadores tumorales, para determinar la presencia de antígenos microbianos y para la determinación cualitativa o cuantitativa de anticuerpos totales frente a algún antígeno en particular (Ferrer *et al.*, 2004).

El enzimoimmunoanálisis (ELISA) es similar a la prueba de inmunofluorescencia y el radioinmunoensayo, excepto en que en este caso los anticuerpos indicadores se unen a una enzima, en vez de hacerlo a una molécula fluorescente o un isotipo radioactivo. Las enzimas sirven como marcadores debido a que cuando se combinan con su sustrato producen un cambio de color que se puede observar (Ingraham y Ingraham, 1998).

2.9.15 Técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony

La prueba de inmunodifusión doble de Ouchterlony, muy parecida a la de precipitación, es ampliamente usada para detectar anticuerpos dirigidos contra componentes de las células micóticas (Forbes, 2009).

Técnica serológica en la que reactantes antígenos y anticuerpos son separados en un gel. Las muestras de antígenos y anticuerpos se colocan en "pozos" (pequeñas perforaciones) de un gel de agarosa (o material similar); los reactantes difunden en todas direcciones, pero al encontrarse se produce una reacción de tipo antígeno-anticuerpo, llamada reacción de endorreagentes, formando una línea de precipitación en la región donde se unen. La inmunodifusión en placa de Ouchterlony se emplea para analizar la especificidad de antígenos y anticuerpos y determinar la relación antigénica. (Reyes y Camargo, 2001) Si las sustancias que se van a estudiar contienen múltiples antígenos o anticuerpos, se forman varias líneas de precipitación en la zona de equilibrio. Se puede hacer una evaluación de la semejanza de las muestras colocadas en pozos vecinos, de acuerdo con las características de la banda de precipitación ante un reactante común situado en el pozo central (Gómez y Susana Fiorentino Gómez, 1994).

Para poder comparar distintos antígenos o distintos anticuerpos entre sí, se utiliza la inmunodifusión doble en dos dimensiones o angular, que fue descrita por Ouchterlony y que representa una variación de la inmunodifusión doble. Normalmente los pocillos de antígeno y anticuerpo se colocan en distintos ángulos para así poder comparar con los adyacentes. Hay tres patrones básicos de reacción en la inmunodifusión doble angular: Reacción de identidad (figura 2), reacción de no identidad (figura 3) y reacción de identidad parcial (figura 4).

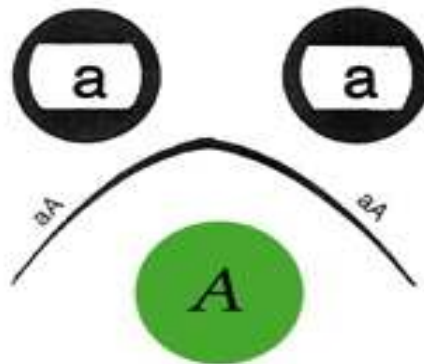


Figura 2.- Reacción de identidad, en las que las líneas de precipitación son semejantes y se unen cuando se cruzan. Esto ocurre cuando los dos antígenos son iguales.

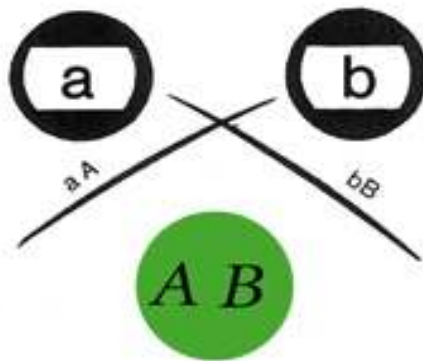


Figura 3.- Reacción de no identidad, donde las líneas se cruzan por completo. En este caso los dos antígenos son totalmente distintos.

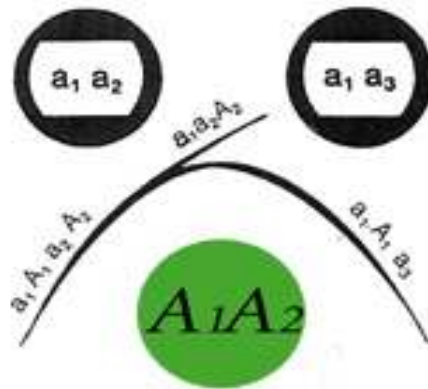


Figura 4.- Reacción de identidad parcial, donde hay reacción del anticuerpo con los dos antígenos, pero las líneas no forman una cruz completo. En este caso el anticuerpo comparte parcialmente los determinantes antigénicos (Arderiu, 1997).

2.10 ¿Qué animales se emplean para la producción de sueros hiperinmunes?

Aunque varias especies de animales se utilizan para la producción de anticuerpos, conejos y ratones son las especies más frecuentemente utilizadas para la producción de anticuerpos policlonales (pAbs) y anticuerpos monoclonales (mAbs), respectivamente. La selección de las especies animales para la producción de anticuerpos policlonales depende, al menos en parte, de la cantidad de antisuero necesario y la facilidad de obtención de muestras de sangre (Leenaars *et al.*, 1999).

Al seleccionar las especies animales para la producción de anticuerpos policlonales, es importante tener en cuenta lo siguiente: (1) la cantidad de anticuerpos policlonales necesario, (2) la facilidad de obtención de muestras de sangre, (3) la relación filogenética entre el antígeno y la especie animal, y (4) el uso previsto de los anticuerpos policlonales. Las especies animales más frecuentemente utilizadas para la inducción de anticuerpos policlonales en el laboratorio son el conejo, ratón, rata, hámster, conejillo de Indias, cabro, ovejo y pollo.

Cuando no hay necesidad identificada para una especie animal específica, los animales de los que se toman muestras de sangre deben ser relativamente fáciles de obtener y no a los que es difícil sangrar (Leenaars y Hendriksen, 2005).

La edad de los animales es otra consideración importante debido a que el factor puede influir en el resultado de la inmunización. Es importante utilizar los jóvenes adultos, para los que la respuesta inmune es bastante robusta y no se

ve afectado por los anteriores retos inmunes (Leenaars y Hendriksen, 2005; Leenaars *et al.*, 1999).

2.10.1 ¿Por qué emplear cabras?

Conejos, ovejas y cabras son los mamíferos más comúnmente utilizados sobre la base de su tamaño, la facilidad de acceso vascular, la naturaleza y la solidez de su respuesta inmune (Lipman *et al.*, 2005), cuando son necesarias grandes cantidades de anticuerpos policlonales son, Generalmente empleados animales de granja, como ovejas, cabras y caballos (Leenaars y Hendriksen, 2005).

III.- Materiales y Métodos

3.1 Manejo del hato

En el estudio se utilizaron 15 cabras de tres diferentes razas de las cuales 5 fueron Saanen, 5 Toggenburg, y 5 Criollas. Los animales se desparasitaron con ivermectina previo al inicio del experimento así mismo se comprobó que fueron negativas a brucelosis.

3.2 Área de estudio

Las cabras se alojaron en las compostas caprinas en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en la ciudad de Torreón Coahuila México, donde se aclimataron al ambiente por un periodo de dos semanas después de la desparasitación. Se alimentaron a base de forraje (alfalfa), concentrado y agua. El peso aproximado de los animales fue de 33.4 kg en promedio.

3.4 Material para inmunización

- Adyuvante completo de Freund
- Antígeno IgG 1000 ug/ml
- Jeringas
- Adaptador para conectar jeringas
- Torundas con alcohol
- Guantes
-

3.5 Material para sangrado

- Tubos vacutainer al vacío
- Aguja vacutainer
- Canastilla para transportar tubos
- Torundas con alcohol
- Porta aguja
- Guantes

3.6 Emulsión antígeno-adyuvante

Se mezclaron partes iguales de antígeno y de adyuvante en dos jeringas diferentes. Se eliminó todo el aire de las jeringas. Utilizando un adaptador se conectaron ambas jeringas juntas y se mezclaron para formar una emulsión estable. La emulsión esta lista cuando se vuelve difícil de mover en la jeringa. Se Probó la emulsión agregando una gota en un recipiente con agua fría; si la emulsión permanece intacta, ya está lista, si no, se continua mezclando.

3.7 Inmunización y sangrados

Para inyectar el antígeno se rasuro previamente la parte central y partes laterales de la espina central de las cabras para facilitar la manipulación de los puntos de inyección que fueron 10 sitios ya que la vía de inyección fue intradérmica.

La sangre se tomó de la vena yugular con una aguja del 16 y se dejó coagular y retraer a 37°C durante toda la noche. El suero se decantó y se clarifico por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. El suero fue almacenado en refrigeración por períodos cortos de almacenamiento y congelado en períodos largos.

El protocolo de inmunización y sangrados fue el siguiente:

7 de agosto se realizó un sangrado previo a la inmunización tomándose 25 ml de sangre en tubos vacutainer para conocer las condiciones originales de los animales.

14 de agosto se realizó la primera inmunización, inyectando 1 mg de antígeno IgG de conejo en adyuvante completo de Freund (CFA) vía intradérmica.

28 de agosto se realizó la segunda inmunización, se inyectó 500ug de antígeno en adyuvante completo de Freund vía intradérmica.

4 de septiembre se realizó el primer sangrado, se obtuvieron 300 ml de sangre en tubos vacutainer. La sangre se tomó de la vena yugular con una aguja del 16 y se dejó coagular y retraer a 37°C durante toda la noche. El suero se

decantó y se clarificó por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos, después el suero se almacenó y refrigeró.

11 de septiembre se realizó la tercera inmunización, se inyectó 500ug de antígeno en adyuvante completo de Freund vía intradérmica.

11 de septiembre se realizó el segundo sangrado, se obtuvieron 300 ml de sangre en tubos vacutainer. La sangre se tomó de la vena yugular con una aguja del 16 y se dejó coagular y retraer a 37°C durante toda la noche. El suero se decantó y se clarificó por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos, después el suero se almacenó y refrigeró.

18 de septiembre se realizó el tercer sangrado, se obtuvieron 300 ml de sangre en tubos vacutainer. La sangre se toma de la vena yugular con una aguja del 16 y se deja coagular y retraer a 37°C durante toda la noche. El suero se decanta y se clarifica por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos, después el suero es almacenado y refrigerado.

2 de octubre se realizó el cuarto sangrado, se obtuvieron 300 ml de sangre en tubos vacutainer. La sangre se toma de la vena yugular con una aguja del 16 y se deja coagular y retraer a 37°C durante toda la noche. El suero se decanta y se clarifica por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos, después el suero es almacenado y refrigerado.

Las muestras de suero recolectadas fueron enviadas para la determinación cuantitativa de anticuerpos en los laboratorios de la empresa Albert O. Menn y asociados en Columbia, U.S.A. Dicha determinación se realizó por el método de inmunodifusión radial de Ouchterlon



Figura 5.- Sitios de inoculación



Figura 6.- Sitios de inoculación tratados

IV.- Resultados

Título de anticuerpos en las muestras de cabras inmunizadas con IgG de conejo.

Cuadro 2.- Títulos de anticuerpos obtenidos en raza Saanen

	Saanen 1	Saanen 2	Saanen 3	Saanen 4	Testigo
0 DIAS	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título
15 DIAS	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título
30 DIAS	1:32	1:32	1:32	1:32	No hay título
45 DIAS	1:32	1:32	1:32	1:32	No hay título

Cuadro 3.-Títulos de anticuerpos obtenidos en raza Criolla

	Criolla 1	Criolla 2	Criolla 3	Criolla 4	Testigo
0 DIAS	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título
15 DIAS	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título
30 DIAS	1:32	1:32	1:32	1:32	No hay título
45 DIAS	1:32	1:32	1:32	1:32	No hay título

Cuadro 4.- Títulos de anticuerpos obtenidos en raza Toggenburg

	Toggenburg 1	Toggenburg 2	Toggenburg 3	Toggenburg 4	Testigo
0 DIAS	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título
15 DIAS	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título	No hay título
30 DIAS	1:32	1:32	1:32	1:32	No hay título
45 DIAS	1:32	1:32	1:32	1:32	No hay título

Los resultados obtenidos nos muestran la producción de anticuerpos en las tres razas sin ninguna diferencia entre ellas. En las tres la producción de anticuerpos empieza a partir del día 30 y se mantiene constante hasta el día 45

V.- Discusión

Durante el tiempo que se trabajó para obtener los resultados que se muestran en este trabajo se realizaron actividades y protocolos para así poder tener datos correctos. Leenaars y Hendriksen (2005) mencionan 6 etapas críticas en la producción de anticuerpos policlonales y son las mismas que se utilizaron en el trabajo con el que se obtuvieron los resultados mostrados, solo con algunas pequeñas diferencias.

El primer paso crítico que menciona Leenaars y Hendriksen (2005) es la preparación del antígeno, en el trabajo realizado el antígeno usado fue IgG de conejo y la dosis utilizada fue 1 mg de antígeno en la primera inmunización y

en las siguientes fueron 500 μg de antígeno, el antígeno va diluido junto con un adyuvante. La mezcla de ambos se hace al momento de la inoculación.

Se debe mencionar que el antígeno debe ser manejado de una manera muy estricta ya que si es contaminado los resultados pueden ser afectados y puede causar problemas en el animal que será inoculado.

Otro punto y tal vez de los más importantes es la selección de la especie utilizada en el trabajo, en el trabajo se utilizaron cabras ya que son animales que se pueden manipular de una manera fácil al momento de inmunizar y se tiene la facilidad para sangrar. Otro punto por el cual se utilizaron cabras es por la cantidad de sangre que se necesita y el sitio de inyección, las inyecciones del antígeno-adyuvante se realizaron en los costados de la espina central, evitando que el propio animal se lama o se lastime los puntos de inyección.

Se recomiendan animales que estén entrando a la etapa adulta ya que cuentan con un buen sistema inmunológico capaz de producir una buena respuesta inmune.

El antígeno (IgG) utilizado se combinó con un adyuvante para potencializar la acción del antígeno, el adyuvante utilizado en el trabajo fue el adyuvante completo de Freund

Leenaars y Hendriksen (2005) han reportado efectos secundarios al utilizar el adyuvante completo de Freund, en el trabajo realizado en algunas ocasiones en el sitio de inyección se mostró inflamación pero nunca se tuvo un problema grave consecuencia del granuloma que tiende a formar el adyuvante, en algunos casos se presentó ulceración del sitio de inyección pero con cuidados menores se recuperaba el animal.

Algo importante es el protocolo de inyección el cual abarca varios puntos que son la vía de inyección, volumen de inyección e inyección de refuerzo.

La vía de inyección que se utilizó en el trabajo fue la vía intradérmica, la ventaja de esta vía es el rápido procesamiento del antígeno debido a la gran densidad de las células dendríticas de Langerhans, pero la desventaja es que se debe inyectar un bajo volumen por lo cual se realizaron diez inyecciones a cada animal, 10 sitios de inyección a lo largo de la espina central con el propósito de evitar ulceración.

Leenaars y Hendriksen (2005) señalan que no existe una recomendación clara debido a que si se inyecta en un solo sitio el volumen es mucho mayor y es posible que el dolor sea muy grande al igual que el riesgo de efectos secundarios, pero de la misma manera si se inyecta en diferentes puntos en volúmenes pequeños el dolor puede ser menor.

Basándose en el trabajo realizado es recomendable utilizar una mayor cantidad de sitios de inyección y evitar un solo sitio esto debido a la probabilidad de ulceración que presenta el adyuvante completo de Freund.

En cuanto al tiempo entre cada inyección de refuerzo utilizado fue de 2 semanas entre cada inyección utilizando la mitad de la dosis que se utilizó en la primera inmunización, Leenaars y Hendriksen (2005) recomiendan 4 semanas con una dosis menor a la utilizada en la primera inmunización.

Después de cada inmunización se mantenía una vigilancia en los animales para revisar cualquier efecto adverso que se pudiera presentar, si se presentaba alguna anomalía en los sitios de inyección se revisaban y palpaban, incluso se hicieron cultivos bacterianos para saber si se había presentado alguna infección o era el proceso inflamatorio normal.

En cuanto al sangrado se tomaban 20 ml de cada animal con tubos vacutainer de la vena yugular hasta alcanzar un total de 300 ml. El animal era sujetado por una persona y otra se encargaba de tomar las muestras esto con el propósito de evitar un mayor estrés en el animal y facilitar el trabajo de la persona que tomaba las muestras.

En general la mayor parte de lo que se realizó en este trabajo coincidió con lo que recomiendan Leenaars y Hendriksen (2005). Aunque dados los resultados proponemos que el tiempo de inmunización se extienda 15 o 30 días más para ver si se eleva el título de anticuerpos en el suero.

VI.- Conclusión

Después de haber obtenido los resultados de este trabajo se demostró que no se presentó diferencia en la producción de anticuerpos policlonales en alguna de las tres razas de cabras utilizadas ya que todas mostraron los mismos resultados en el mismo periodo de tiempo y bajo las mismas condiciones de mantenimiento en las que se encontraban. Por lo cual no se puede afirmar con los datos obtenidos que una de las tres razas utilizadas sea mejor que las otras dos para una mejor producción de anticuerpos.

Es recomendable que en un trabajo próximo se prolongue más la duración del mismo para poder obtener datos más concretos, también tener un cuidado más estricto en cuanto a una posible infección de los puntos de inoculación para evitar problemas que interfieran con los resultados. Se recomienda tener un adecuado control de fauna nociva como insectos, roedores y moscas principalmente que pueden causar infecciones en los sitios de inyección.

VII.- Literatura citada

- Abbas, A. K., J. S. Pober y A. H. Lichtman. 2008. Inmunología celular y molecular. McGraw-Hill Interamericana de España. pp.
- Alexander, J. y J. M. Brewer. 1995. Adjuvants and their modes of action. *Livestock Production Science* 42: 153-162.
- Arderiu, X. F. 1997. Bioquímica clínica y patología molecular. I. Editorial Reverté, S.A. pp.
- Cabello, R. R. 2007. Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias/Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases. Ed. Médica Panamericana. pp.
- Coe Clough, N. E. y P. J. Hauer. 2005. Using polyclonal and monoclonal antibodies in regulatory testing of biological products. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 46: 300-306.
- Cox, J. C. y A. R. Coulter. 1997. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15: 248-256.
- Espinosa, O. R. 2006. Inmunología (de memoria). Ed. Médica Panamericana. pp.
- Ferrer, A. C., C. M. Ruiz y G. R. Pedraza. 2004. Manual de prácticas de inmunología. Masson. pp.
- Fodey, T. L., P. Delahaut, C. Charlier y C. T. Elliott. 2008. Comparison of three adjuvants used to produce polyclonal antibodies to veterinary drugs. *Veterinary immunology and immunopathology* 122: 25-34.
- Forbes, B. A. 2009. Diagnostico Microbiologico. Editorial Medica Panamericana Sa de. pp.
- George, S. E., C. T. Elliott, D. P. McLaughlin, P. Delahaut, T. Akagi, M. Akashi y T. L. Fodey. 2012. An investigation into the potential use of nanoparticles as adjuvants for the production of polyclonal antibodies to low molecular weight compounds. *Veterinary immunology and immunopathology* 149: 46-53.
- Goldsby, R. A., J. O. Samperio, S. S. Renard y M. E. A. Martínez. 2004. Inmunología. McGraw-Hill. pp.
- Gómez, S. F. y N. S. R. A. M. F. G. Susana Fiorentino Gómez. 1994. La inmunología en el diagnóstico clínico. Centro Editorial Javeriano. Ceja. pp.
- Halliwell, R. E. W., N. T. Gorman, M. de la Concepción Díaz de Villegas Solans y Á. R. S. Arévalo. 1992. Inmunología Clínica Veterinaria. Acribia. pp.
- Health, I. f. H. P. a. V. P. 2000. Code of practice for the immunisation of laboratory animals.
- Ingraham, J. L. y C. A. Ingraham. 1998. Introducción a la Microbiología. Reverté. pp.
- Leenaars, M. y C. F. Hendriksen. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 46: 269-279.
- Leenaars, P., C. F. Hendriksen, W. A. De Leeuw, F. Carat, P. Delahaut, R. Fischer, M. Halder, W. C. Hanly, J. Hartinger y J. Hau. 1999. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *ATLA-NOTTINGHAM*- 27: 79-102.
- Lipman, N. S., L. R. Jackson, L. J. Trudel y F. Weis-Garcia. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 46: 258-268.
- Montilla, F., R. Juan, M. V. Alvares de Montilla, E. E. Díaz Zavala, V. Urdaneta y H. Saulo. 2007. Hiperinmunización de ovinos contra veneno de *Bothrops asper* del estado Zulia, Venezuela. estudio preliminar. *Revista Científica* 17.
- Muñoz, E. 2001. Biotecnología y sociedad. Cambridge University Press. pp.

- Newcombe, C. y A. R. Newcombe. 2007. Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 848: 2-7.
- Quevedo, H. J. M., C. M. Manrique, R. T. A. Díaz y D. C. Orama. 1999. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed* 18: 130-137.
- Reyes, A. C. y B. C. Camargo. 2001. *Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines*. Plaza y Valdes. pp.
- Rubido, J. C. A. y M. d. J. L. Angulo. 2000. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología aplicada* 17: 147-160.
- Sivakumar, S. M., M. M. Safhi, M. Kannadasan y N. Sukumaran. 2011. Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 19: 197-206.
- Stills, H. F., Jr. 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 46: 280-293.
- Tapia, C. H. M., S. S. Elías y A. M. García. 2007. Descripción de algunos aspectos básicos de inmunización (Description of some basic aspects from immunization). *REDVET* 8.
- Tizard, I. R. 2009. *Inmunología veterinaria*. Elsevier Health Sciences. pp.
- Tortora, G. J., B. R. Funke y C. L. Case. 2007. *Introducción a la microbiología*. Editorial Medica Panamericana Sa de. pp.