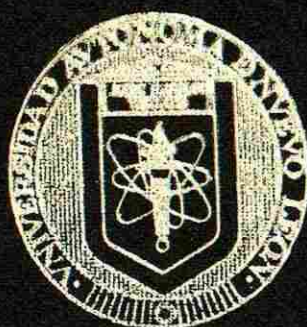


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INDUCCION DE RESPUESTA INMUNE PROTECTORA
CONTRA LA TOXINA a (fosfolipasa C) De Clostridium
perfringens TIPO A ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS.

TESIS

REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA.

QUE PRESENTA

M. V. Z. DANIEL JULIO EGUIARTE LARA

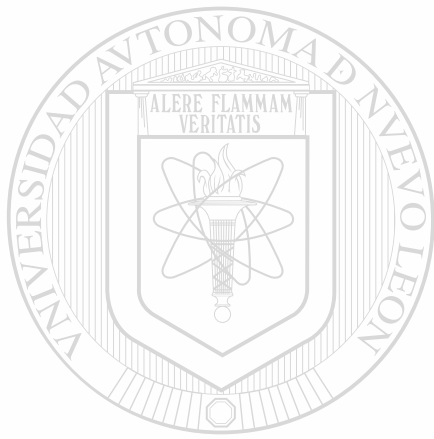
MONTERREY, N. L.

JULIO DE 2002

TM
QR82
.C6
E4
2002
c.1

M. V. Z. DANIEL JULLIO EGUIARTE LARA 2002

T



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

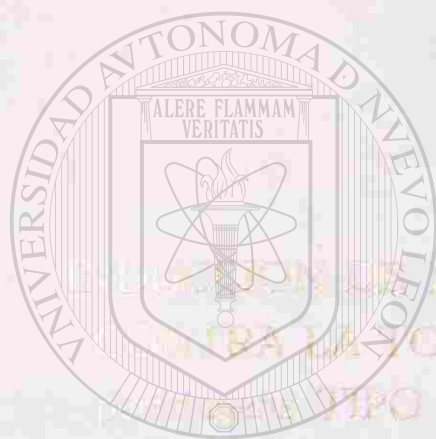


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGÍA.

QUE PRESENTA

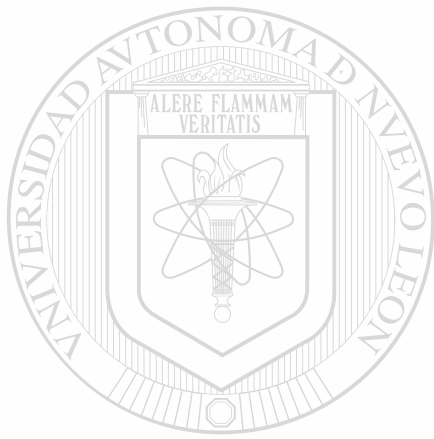
M.V.Z. DANIEL JULIO EGUIARTE LARA

MONTERREY, N. L.

JULIO DE 2002



TM
QR 82
-C6
E4
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

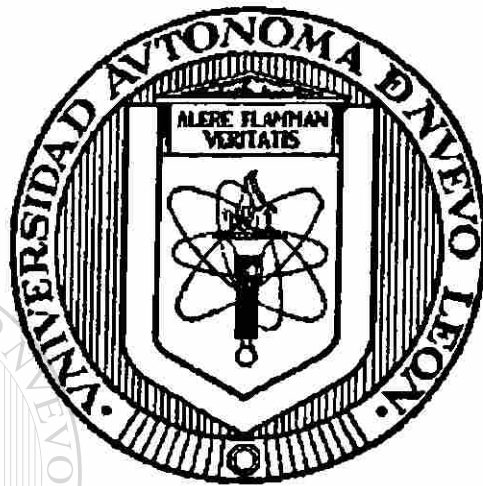


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE PROTECTORA CONTRA
LA TOXINA α (fosfolipasa C) De Clostridium perfringens TIPO A
ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

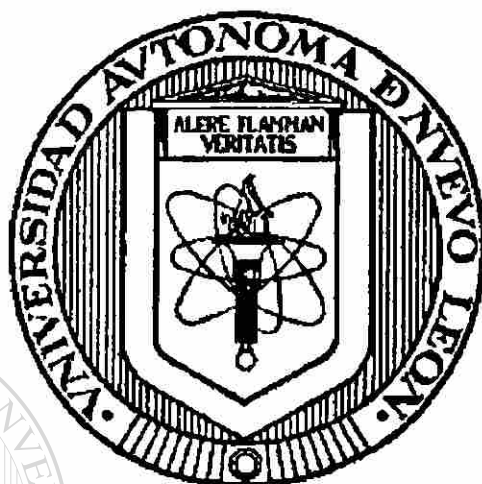
TESIS

QUE PRESENTA

**M. V. Z. Daniel Julio Eguiarte Lara como Requisito para Obtener el
Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMISIÓN DE TESIS

Presidente: Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario: Dr. Reyes Tamez Guerra

Vocal: Dr. José Santos García Alvarado

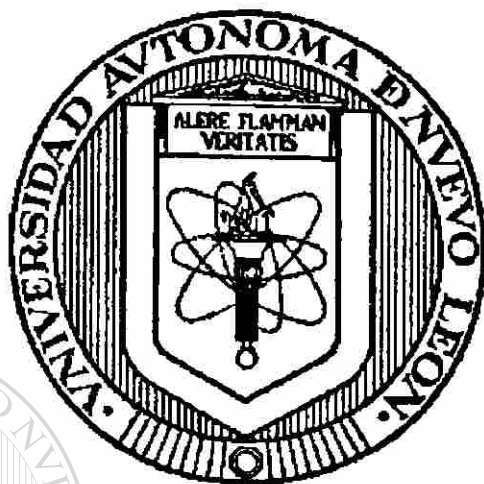
Vocal: Dr. Juan Manuel Alcocer González

San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Julio de 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIRECCIÓN DE TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dra. Ma. Cristina Rodríguez Padilla

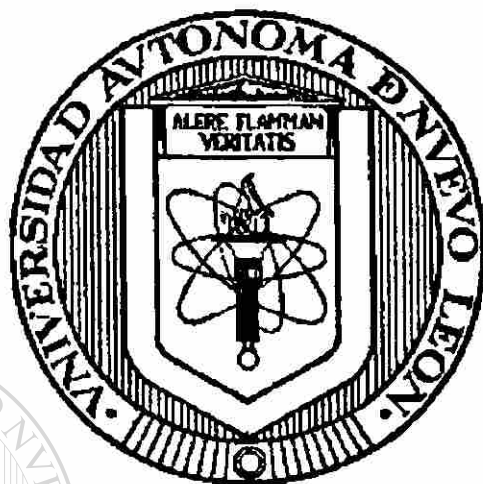
Directora

San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Julio de 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ÁREA DE TRABAJO:

El presente trabajo se desarrollo en las instalaciones del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Bajo la dirección de la Doctora Ma. Cristina Rodríguez Padilla y la asesoría del personal profesional técnico de las diferentes áreas.

CRÉDITOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca de Maestría, cubriendo los gastos de inscripción, materias, seguro y manutención lo cual me permitió lograr la obtención del grado.

A la UANL a través de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia representada por el Maestro Rafael Ramírez R. En su momento y posteriormente por el Dr. José Antonio Salinas M. Los cuales me brindaron su apoyo, buscando la superación académica de la institución. Así mismo la Facultad de Ciencias Biológicas por conducto del Maestro Juan Adame que me recibió de una forma excelente y posteriormente el Dr. José Santos García A. Colaborador en la obtención del grado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIAS

A Dios por darme salud, la entereza y la tenacidad necesarias para no desistir en lograr mi meta de alcanzar el grado de Maestro en Ciencias.

A mi padre y madre que siempre se han preocupado por lo que me suceda y nunca dejan de aportar consejos avalados con un buen ejemplo.

A mi esposa e hijas que son la razón principal de querer superarme cada día.

A las personas que en algún momento dudaron de mí, y sin contemplaciones me hicieron blanco de sus sarcasmos y críticas, además de menospreciar a mi persona, lo cual fue fuente de inspiración para no renunciar y emprender con mayor ánimo el presente trabajo.

Un gran placer en la vida, es lograr lo que la gente te dice que no puedes lograr.

Walter Bagehot.

Aléjate de la gente pequeña que tratan de minimizar tus ambiciones, la gente pequeña siempre hace eso, pero la persona que es verdaderamente grande, te hace sentir que tu puedes también convertirte en grande.

Mark Twain.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Ma. Cristina Rodríguez P. Que desde la entrevista de admisión a la maestría se ha comportado y conducido en una forma franca y sincera con mi persona.

Durante el diseño de este trabajo tubo gran paciencia y comprensión, y me permitió libremente seleccionar el tema y definir el proyecto.

Siempre me ha brindado un apoyo firme y decidido, nunca dudó en que lo planteado, aunque se veía algo raro no se llegaría a lograr.

Gracias por darme esa palabra de aliento cuando lo necesite y por ser también estricta cuando fue necesario.

Los Doctores José Santos García y Juan Manuel Alcocer González por sus acertadas intervenciones en la realización de este trabajo ya que sin su orientación y experiencia no hubiera logrado la culminación del mismo.

El Doctor Tamez que por sus múltiples responsabilidades poco tiempo compartimos, sin embargo ese tiempo fue de una intensidad y calidad excelente.

Al maestro Benito Pereyra que desde que se me notifico que había sido aceptado a la maestría me hizo saber que mi determinación y el saber asimilar una negativa como una lección para mejorar, habían influido en gran medida para que se me brindara la oportunidad de iniciar el posgrado, así mismo me conmino a no abandonar los estudios diciéndome que tenía la capacidad y que podría lograr la culminación de la maestría.

Ramón Belmontes el colega, que durante varios años de alguna forma él conseguía los ratones que me hacían falta para los experimentos.

AGRADECIMIENTOS

En forma especial el Dr. Julio Sepúlveda, que con una gran amabilidad participó directamente en la realización de las imágenes de los liposomas, gracias por su tiempo y apoyo. Así mismo el QBP. José Ruiz Ordóñez que con su experiencia y paciencia ha sido parte importante para lograr las fotografías en el microscopio electrónico.

Gracias a los compañeros y amigos Pablo Zapata, Juana Ma. Reina Reyes, Leonardo Castillo, José Luis Méndez, Eugenio Román, Esther, Laura, Moisés Franco, Sigifredo Lazcano, Beatriz, Nelly, Abraham Rodríguez, Herminio, Berta, Pera, Catarino, Nancy, Quijano ya que todos ellos participaron ayudándome en forma directa e indirecta y forman parte de este trabajo.

A mi amigo Francisco López, que con su habilidad para escuchar colaboró en la realización del mismo, a la Sra. Cristina Palomino que realizó gran parte de la captura de esta tesis.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A los compañeros médicos y trabajadores de la Facultad de Veterinaria que desde un principio demostraron su interés por que yo me superara y me apoyaron en todo momento.

A todos y cada uno de ellos mi mas profundo agradecimiento y que Dios los colme de bendiciones.

ÍNDICE GENERAL

Portada		I
Comisión de Tesis		II
Dirección de tesis		III
Área de trabajo		IV
Créditos		V
Dedicatoria		VI
Agradecimientos		VII
Índice general		IX
Índice de figuras y tablas		X
Abreviaturas		XI
Resumen		XII
Introducción	1	
Antecedentes	2	
I. La bacteria y la toxina alfa (fosfolipasa C)	2	
II. Vacunas para clostridios en animales	5	
III. Adyuvantes para vacunas y los liposomas.	6	
Hipótesis	11	
Objetivos	11	
Material y Métodos	12	
I. Calculo de la dosis letal media LD50	13	
A.- Preparado de la toxina	13	
B.- Ratonos	13	
C.- Aplicación de la toxina	13	
D.- Método de calculo de dosis media letal	13	
II. Elaboración de liposomas y eficiencia de atrapamiento	15	
A.- Diseño de liposomas	15	
B.- Extracción de la toxina de los liposomas	17	
C.- Actividad hemolítica de la toxina alfa	18	
III. Aplicación del preparado toxina-liposomas (L-TA)	19	
A.- Estrategia de inmunización	19	
B.- Modelo Animal	19	
IV. Desafío de animales	20	
Resultados	21	
I. Calculo de la dosis letal media	21	
A.- Llenado cuadro Reed y Muench	21	
B.- Calculo de datos del cuadro a la formula	22	
II. Liposomas y eficiencia de atrapamiento	23	
A.-Calculo para la proporción masa peso volumen	23	
B.- Medición de la actividad hemolítica de las diferentes preparaciones	23	
C.- Fotografías y descripción de liposomas	24	
III. Desafío de animales inmunizados	28	
Discusión	32	
Conclusiones	35	
Perspectivas	36	
Bibliografía	37	

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

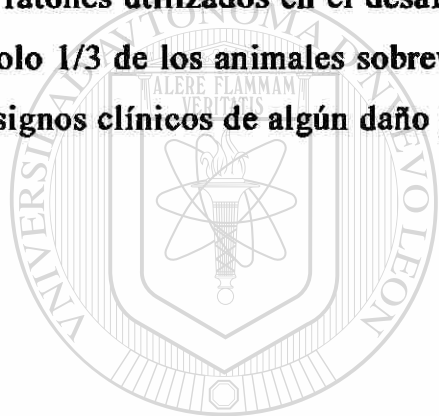
Tabla 1 Condiciones clínicas por Clostridium y sus principales toxinas	Página	5
Tabla 2 Antígenos atrapados en liposomas de importancia Médica o veterinaria (resumen)	Página	9
Tabla 3 Dosis inicial para calculo de LD50	Página	21
Tabla 4 Dosis alta para calculo de LD50	Página	21
Tabla 5 Dosis baja para calculo de LD50	Página	22
Tabla 6 Dosis para la cual se aplica el método de Reed y Muench	Página	22
Tabla 7 Concentrado comparativo de la actividad Hemolítica de la TA	Página	24
Tabla 8 Supervivencia de ratones después del desafío con 5 LD50	Página	28
Figura 1 Conformación de la toxina Alfa	Página	3
Figura 2 Esquema de un liposoma	Página	8
Figura 3 Aplicación de liposomas	Página	20
Figura 4 Fotografía de microscopio electrónico de liposomas con tamaño similar	Página	25
Figura 5 Fotografía de microscopio electrónico de liposomas con diferente tamaño	Página	26
Figura 6 Fotografía de microscopio electrónico de liposomas acercamiento	Página	27
Figura 7 Fotografía de lesión en ratón	Página	29
Figura 8 Fotografía de lesión en zona de aplicación	Página	30
Figura 9 Fotografía de lesión en ratón después de 2 semanas	Página	31

ABREVIATURAS

LD50	Dosis Letal media
Cl.	Clostridium
Balb/c	Clasificación de la cepa a la que pertenecen los ratones
I.M.	Intramuscular
I.V	Intravenosa
L-TA	Liposomas conteniendo toxina alfa
Kd	Kilodaltons
µg	microgramos
mg	miligramos
ng	nanogramos
Kg	Kilogramos
E.	Escherichia
LPS	Lipopolisacarido
MDP	Dipéptido de Muramilo
MAF	Factor Activador de Macrófagos
INF-γ	Interferón Gamma
DRV	Vesículas de Deshidratación y Rehidratación
MLV	Vesículas Multilamerales
IgG	Inmunoglobulina Clase G
IgG1	Inmunoglobulina Clase G Isotipo 1
IgG2B	Inmunoglobulina Clase G Isotipo 2B
IL-2	Interleucina 2
C-Terminal	Carbono Terminal
N-Terminal	Amino Terminal
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfato Salina
BBS	Solución Amortiguadora de Boratos Salina
pH	Potencial de Hidrógeno
ml	Mililitros
rpm	Revoluciones por Minuto
min	Minutos
°C	Grados Centígrados
Vol	Volumen
nm	nanómetros
ex vivo	Experimentos bajo condiciones de laboratorio
in vivo	Ensayos con animales de experimentación vivos

RESUMEN

Una combinación de fosfatidiletanolamina sintético y colesterol ha sido utilizada para formar liposomas de tipo multilamelares grandes, los cuales en su interior contienen moléculas de la toxina alfa de Clostridium perfringens tipo A . Estos liposomas (L-TA) fueron aplicados I.M. a ratones Balb/c cada 7 días en tres ocasiones a una dosis de 3 ng de TA en liposomas por animal. Una semana después de la última aplicación, los ratones fueron desafiados con 5 LD₅₀. Esta inmunización protegió contra los efectos letales de la toxina, a 2/3 de los ratones utilizados en el desafío, durante las primeras 24 h . Sin embargo después de 72 h solo 1/3 de los animales sobrevivieron. Durante el proceso de inmunización no se observó signos clínicos de algún daño por la toxina en los ratones.



UANL

SUMMARY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cholesterol and synthetic L-A-phosphatidylethanolamine dilauroyl has been used to make multilamellar liposomes, containing Clostridium perfringens type A alpha toxin. These liposomes (L-TA) were weekly injected I.M. into Balb/c mice three times at dosage 3 ng of alpha toxin in liposomes per mouse. One week later after the last application, immunized mice were challenged I.V. with 5 LD₅₀. After 24 h 2/3 of mice survived. However after 72 h only 1/3 of animals were alive. During the immunization procedure no clinical signs of damage by the toxin were detected.

INTRODUCCIÓN

Clostridium perfringens, es una bacteria anaerobia habitante común en el suelo y el intestino del hombre y animales (Cato et al.1986) El tipo A, (CPA) es responsable de la enfermedad del pasto, la colitis necrótica y la enterotoxemia del caballo (Logan et al., 1991), en humanos del envenenamiento alimentario (Lyristis et al., 1994 & Hauschild et al., 1971), así mismo se ha sugerido la participación de la bacteria y sus toxinas en la patogénesis del síndrome de muerte súbita infantil (SIDS sudden infant death syndrome) (Murrell et al.,1993).

El CPA pertenece al grupo de armas biológicas utilizadas en los conflictos bélicos de los últimos años y no se reconoce o acepta la existencia de una vacuna para proteger a los soldados contra la infección por la bacteria (Nicolson et al., 2000).

Por su parte la toxina α (TA) se considera el principal mecanismo de infección por el CPA (Ninomiya et al., 1994 & Williamson & Titball, 1993). El toxoide de la TA ha demostrado estimular protección en animales contra sus efectos letales, sin embargo presenta leves vestigios de toxicidad (Kameyama et al., 1972 & Evans, 1943 & Evans, 1943 & Traub et al., 1991).

Hasta el momento no se cuenta con una vacuna bien definida contra las enfermedades asociadas al CPA, en humanos o animales. (Schoepe et al., 1997) y las antitoxinas comerciales por otra parte, pueden llegar a ser poco efectivas para evitar la gangrena gaseosa ocasionada por el CPA (Traub et al., 1991).

El presente trabajo describe las condiciones para atrapar la TA de CPA en liposomas y su aplicación a ratones Balb/c como vacuna. Algunas observaciones del comportamiento de la misma encapsulada en liposomas y la protección que se obtiene ante un desafío de 5 LD50 por vía I.V. con la TA.

Otro aspecto relevante del presente, es el efecto adyuvante que nos permite desarrollar nuevas opciones en la elaboración de vacunas. Por lo que en este trabajo se buscó información del comportamiento de la TA encapsulada en liposomas (L-TA) y la respuesta de protección ante un desafío por vía intravenosa contra los efectos letales de la TA.

ANTECEDENTES

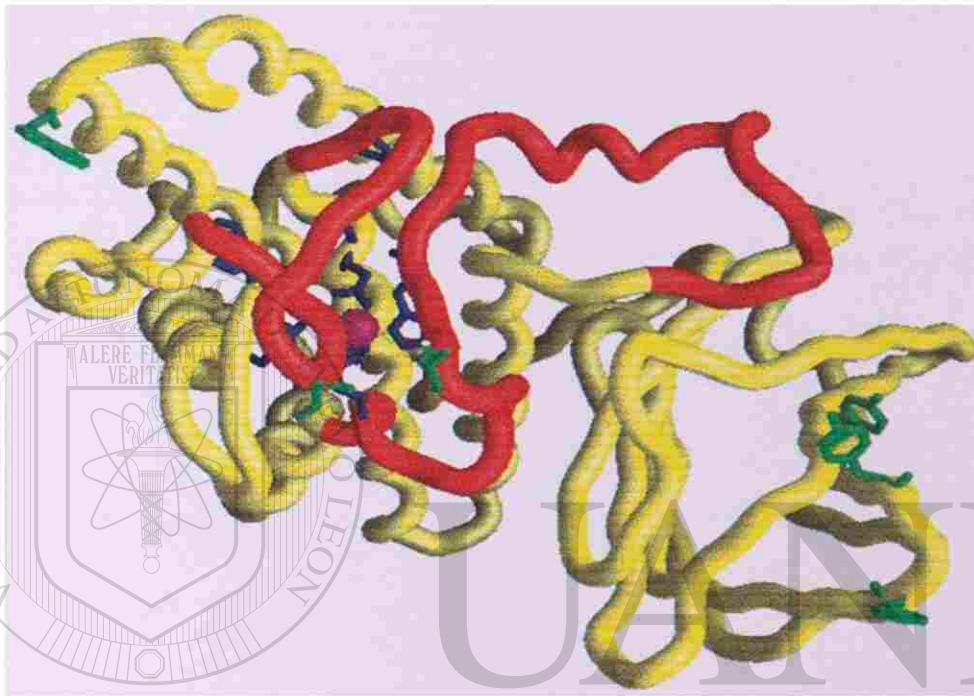
I. La bacteria y la toxina alfa (fosfolipasa C).

La bacteria se caracteriza por producir exotoxinas y exoenzimas, las cuales presentan actividades biológicas y bioquímicas tanto *ex vivo*, (Mitsui et al., & 1973 Ninomiya et al., 1994) como *in vivo* (Clarke et al., 1994). En base a sus principales exotoxinas letales (Tabla 1) Cl. Perfringens se dividió en 5 tipos A, B, C, D y E. (Cato et al. 1986). El CPA produce las exotoxinas denominadas alfa (α), theta (θ), kappa (κ), miu (μ), y algunas exoenzimas como la neuraminidasa, desoxiribonucleasa y la enzima hidrolizante de esfingomielina (Cato et al., 1986 & Clarke et al., 1994 & Mitsui et al., 1973), así como otras proteínas no menos importantes como la sialidasa, hialuronidasa, colagenasa, proteasa, desoxiribonucleasa y hemaglutinina. (Lyristis et al., 1994).

En combinación, la bacteria y sus toxinas pueden ocasionar la gangrena gaseosa. Este problema se presenta cuando una herida se contamina por la bacteria, y el tejido lesionado permite que se produzca un nicho anaeróbico con un potencial de oxidación y reducción suficientemente bajo y un pH ácido que permite el crecimiento de la bacteria. Las formas vegetativas o en algunos casos esporas inician la infección en el tejido desvitalizado (Stevens & Bryant, 1993). Generalmente los organismos son depositados en las capas profundas de los tejidos, donde se inicia la producción de las toxinas y enzimas. Así, la infección se disemina de 1 a 3 días hasta producir crepitación en el tejido subcutáneo, exudación y olor fétido de la zona, además necrosis rápida y progresiva, fiebre y hemólisis hasta llegar a un estado de toxemia, choque y muerte (Boyd et al., 1972 & Boyd & Thomson, 1972 & Cato et al., 1986 & Stevens et al., 1997). Es capaz de contaminar heridas o asociarse con otras especies de clostridios, como el Cl. novyi tipo A ó B y el Cl. septicum y ocasionar la gangrena gaseosa (Boyd & Walker 1972).

La TA (Figura 1) desde 1941 ha despertado un particular interés como principal protagonista de las infecciones por CPA y los efectos que esta puede tener en los tejidos de animales como sustrato de su actividad enzimática y letal (Zamecnik et al., 1947).

Figura .- 1 Conformación de la toxina Alfa. El sitio activo es de color azul. (Tomado de: www.cryst.bbk.ac.uk/~bcole04/ambrose.html)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Así mismo la TA se considera el principal factor patogénico en el desarrollo de las manifestaciones tóxicas de la gangrena gaseosa y la septicemia (Zamecnik et al.,1947 & Sato et al., 1989). Su alta toxicidad se atribuye a la capacidad para hidrolizar la fosfatidilcolina y la esfingomielina, componentes de la membrana de células eucariota (Lyrstis et al., 1994); esta propiedad se conoce como, actividad de fosfolipasa C ya que hidroliza la fosfatidilcolina en fosforilcolina y 1-2- diacilglicerol. (Logan et al., 1991 & Mitsui et al., 1973 & Ninomiya et al., 1994). Esta toxina tiene un peso molecular alrededor de 49 kD. (Krug & Kent 1984) y está formada por 370 aminoácidos (Logan et al., 1991 & Sato et al.,1989).

El interés por su efecto letal y el comportamiento de la TA provocó que se realizaran algunos estudios al respecto. En 1968 Lynch reportó para ratones la relación de los efectos letales

de la TA, la vía de administración así como la pureza de dos preparados de la toxina, correlacionados con el tiempo de sobrevivencia, destacando la vía intraperitoneal como la que mata a los animales en un menor tiempo. Mitsui en 1970, reportó una LD₅₀ de 0.11 µg por ratón de 15 a 17 g vía intravenosa para el purificado que preparó de la toxina. Después, Yamamoto y colaboradores en 1972 repitieron el trabajo de Lynch, pero esta vez utilizaron un purificado de la TA fraccionado a través de una columna de Sephadex G100 y determinaron la importancia del grado de pureza de los preparados de la toxina para la sobrevivencia de los ratones, además de destacar la vía intravenosa como la que proporcionó una muerte más rápida. Tso por su parte en 1989, aplicó diluciones en sales de Hanks de la toxina purificada en un volumen de 0.25 ml vía intravenosa a ratones Balb/c de 18 a 22 g y observó que la dosis se encontraba en el rango de 0.03 a 0.1 µg.

Williams y colaboradores en 1993 describieron para ratones Balb/c de 18 a 22 g que la dosis fue menor a 1 µg vía intraperitoneal. Por otra parte (a través del servicio a clientes) la empresa que vende el preparado comercial que se utilizó en este estudio nos informó que para conejos y ratas, vía intravenosa la LD₅₀ es de 450 µg/ Kg. y de 1500 µg/ Kg. respectivamente, y que con relación a ratones desconocían la información.

La actividad de la toxina puede ser inhibida por anticuerpos contra esta, ya sea *ex vivo* (Schoepe et al., 1997) ó *in vivo* (Boyd et al., 1972 & Sato et al., 1989). Desde 1943 Evans con dos estudios en coballos demostró el efecto de protección de la antitoxina alfa, para prevenir la infección ocasionada por la bacteria comparando ésta propiedad con la poca o nula protección de la antihemolisina y la antihialuronidasa las cuales no previnieron la enfermedad. Por otra parte Boyd en 1972, llevó al cabo un experimento en ovejas donde utilizó balas contaminadas con esporas de la bacteria para herir e inocular en la pierna a los ovinos. Después observó el comportamiento de la bacteria en los animales desde dos puntos de vista, el primero a través de la inmunización pasiva y el segundo de la inmunidad en forma activa, llegó a la conclusión de la importancia de tener anticuerpos específicos contra la TA para evitar el establecimiento de la enfermedad.

Tabla.-2 Las principales toxinas de Cl. perfringens diferencian las condiciones clínicas el tipo A es el que mayor interés genera ya que afecta al hombre, el resto solo es de interés para la medicina veterinaria.(Clarke et al.,1994).

Tipo	Condición Clínica	Toxinas letales			
		α alfa	β beta	ϵ epsilon	ι iota
A	Gangrena Gaseosa Envenenamiento por alimento (Humanos y Animales)	+			
B	Disentería en corderos ovejas y cabras	+	+	+	
C	Enteritis necrotizante de la post-guerra Alemana anteriormente tipo F	+	+		
D	Infección intestinal en corderos, ovejas, cabras y posiblemente humanos.	+		+	
E	Ovejas y ganado bovino				+

II. Vacunas para Clostridios en animales.

En 1977, Kennedy y colaboradores aplicaron un toxoide comercial de Cl. perfringens tipo C en ganado bovino. Durante el estudio midieron la respuesta de anticuerpos en sangre, ellos detectaron la presencia de anticuerpos contra la toxina beta antes de iniciar la vacunación y después de una segunda aplicación observaron un incremento de los niveles de anticuerpos. Así demuestran que con este producto se estimuló una buena respuesta inmune por anticuerpos. En

otro reporte los mismos autores complementaron la vacuna con un toxoide de la toxina epsilon de Cl. perfringens tipo D, el cual aplicaron en ganado ovino y bovino donde observaron un comportamiento de la respuesta inmune por anticuerpos similar al estudio anterior; lo que demuestra una buena antigenicidad para este tipo de vacunas. Sin embargo, en ambos estudios no describen si la respuesta inmune obtenida protege adecuadamente de la enfermedad ante un desafío de la enfermedad.

Una combinación de varias especies de clostridios con sus toxoides a la cual se le conoce como de 7 vías se utiliza en el ganado de engorda. Esta se acompaña de un adyuvante oleoso y tiene la desventaja de ocasionar lesión en el sitio de aplicación además de fiebre y pérdida del apetito (Stokka et al., 1994). En términos generales para las principales enfermedades ocasionadas por los diferentes tipos de clostridios en animales domésticos, existen vacunas comerciales (Walker, 1992).

Con relación a Cl. perfringens tipo A y la TA para provocar inmunidad se ha descrito el uso del toxoide, el cual requiere un proceso delicado y bajo condiciones específicas ya que fácilmente pierde su antigenicidad, además permanece con restos de toxicidad (Ito, 1968).

En 1993 Williamson y Titball, utilizaron técnicas de manipulación genética y produjeron fragmentos de la TA con los cuales inmunizaron ratones y reportaron que el fragmento C-terminal fue el que protegió contra los efectos letales de la toxina, además el mismo también protegió ante un desafío de hasta 10 LD₁₀₀ de Cl. perfringens tipo A.

Recientemente Bennett y colaboradores en 1999 describieron la utilización del virus de vaccinia recombinante para expresar este fragmento e inmunizar ratones, ellos observaron que ésta provee protección contra un desafío letal con la toxina.

III . Adyuvantes para vacunas y los liposomas.

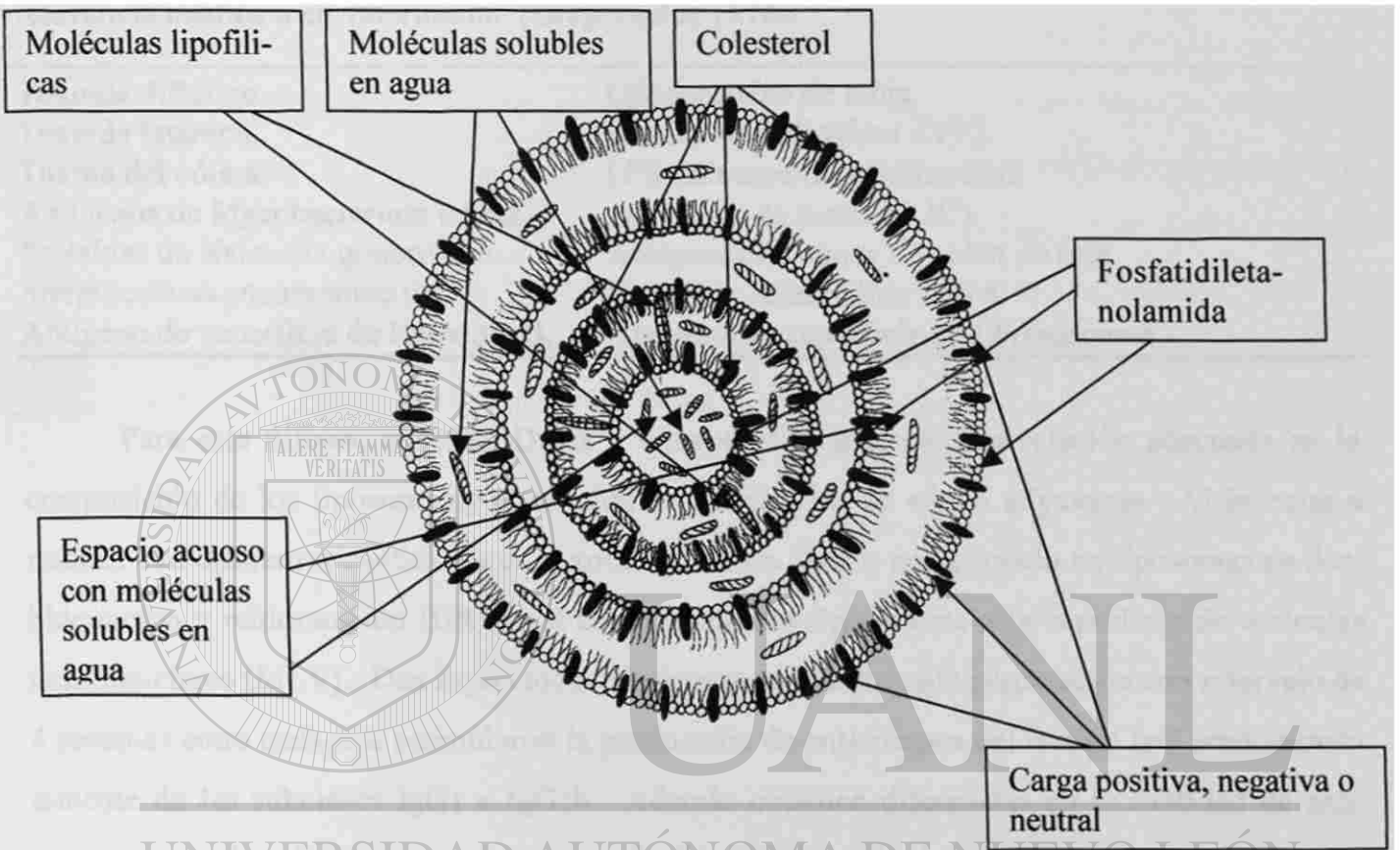
Recientemente los avances tecnológicos han resultado en la producción de vacunas a partir de subunidades y péptidos sintéticos pequeños (Azuma,1992). Por lo que el tipo de preparaciones usadas en vacunas tradicionales es actualmente remplazada por inmunógenos mucho mejor purificados y caracterizados, lo cual repercute en una mejor respuesta inmune. Así se debe

considerar que la protección debe ser multifactorial e involucrar a un buen número de antígenos (Reddy et al., 1992). Desafortunadamente estas vacunas son poco o nada inmunogénicas y no estimulan buena protección si no son administrados con un adyuvante inmunológico (Gregoriadis, 1990). Estos últimos están reconocidos por desempeñar principalmente 2 papeles, la estimulación no específica de la resistencia del individuo contra infecciones y cáncer y la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas (Azuma, 1992). Lo más importante para una vacuna es proporcionar protección, no tener efectos secundarios adversos, ser barata, estable y adaptable para vacunaciones masivas (Walker, 1992).

Existen varias formulas de adyuvantes para vacunas; por ejemplo, complejos de saponinas con antígenos protéicos de membrana, polímeros plurónicos con aceite mineral (adyuvante completo de Freund), productos bacterianos como el lipopolisacarido (LPS) y el dipéptido de muramilo, (MDP), el hidróxido de aluminio (alumbre) y los liposomas (Gregoriadis, 1976). Durante los últimos 70 años el alumbre es el único adyuvante aprobado para su uso en humanos (Ulanova et al., 2001), aunque los adyuvantes de aluminio han sido utilizados ampliamente, existen reportes de nódulos en el sitio de inyección, particularmente seguido de una inyección subcutánea mas que una intramuscular. De hecho las sales de aluminio consistentemente inducen reacciones granulomatosas en el sitio de inyección. También se han observado problemas asociados con la variación en las preparaciones de aluminio de un lote a otro resultando en vacunas con una potencia variable (Byars & Allison, 1987) y se menciona que es poco efectivo con algunos antígenos como la hemaglutinina del virus de la influenza y no siempre provoca una respuesta inmune celular (Allison & Byars, 1990). En medicina veterinaria existen diferentes adyuvantes para vacunas y por mucho los más potentes son los aceites minerales y sus derivados, desafortunadamente inducen la formación de granulomas en el sitio de la inyección por lo que no son aceptados para la vacunación en humanos y aún en medicina veterinaria su uso esta severamente limitado debido al daño que se ocasiona a la carne y la pérdida en la canal (Stokka et al., 1994).

Una opción para estimular una respuesta inmune protectora sin los problemas antes mencionados son las vesículas de fosfolípidos o liposomas, que se forman cuando los fosfolípidos y otros anfipáticos polares son confrontados con exceso de agua ocasionando que se orienten ordenadamente en estrechas membranas de bicapa concéntrica (Gregoriadis, 1976).

Figura.-2 Esquema de un liposoma donde se aprecia la bicapa de lípidos y espacio donde moléculas hidrosolubles pueden quedar atrapadas



Cada liposoma (Figura 2) representa una lámina bimolecular de lípidos sin romper, en el proceso de formación se atrapan o encapsulan agua o solutos si están presentes (Schneider, 1985). Alternativamente agentes solubles en lípidos y moléculas unidas a ellos pueden ser incorporadas a la membrana liposomal (Reddy et al.,1992). Los liposomas se han utilizado por ser biodegradables no tóxicos y fácilmente dirigidos hacia el sitio de acción (Brynstad et al., 1990). De esta manera se han podido utilizar sustancias que activan las propiedades tumoricidas de los macrófagos como el Factor activador de macrófagos (MAF) el interferón gamma (INF- γ) así como péptidos de muramil encapsulados en liposomas (Fidler, 1985). Por otra parte, se han incorporado a los liposomas (Tabla 3) enzimas y hormonas como la citocromo oxidasa, y la insulina para administrarse en pacientes deficientes de estas. Los liposomas se han usado para

ser adyuvante de antígenos bacterianos como la toxina del cólera, el toxoide diftérico y el toxoide tetánico (Gregoriadis, 1976).

Tabla.- 3 Algunos de los antígenos que han sido atrapados en liposomas y descritos como de relevancia médica o en veterinaria. (Gregoriadis, 1976).

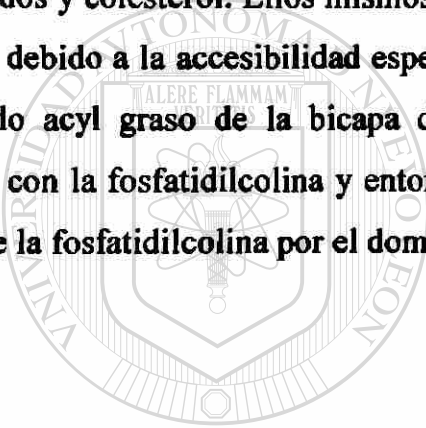
Toxoide diftérico.	Glicoproteína de rabia.
Toxoide tetánico.	Péptido de poliovirus 3VP2.
Toxina del cólera.	LPS Salmonella typhimurium.
Antígenos de Mycobacterium leprae.	Antígenos de tumor (L2C).
Proteínas de Neisseria gonorrhoeae.	Antígenos de tumor de colon de rata.
Streptococcus pneumoniae tipo 3.	Hexon de Adenovirus tipo 5.
Antígeno de superficie de Hepatitis B.	Antígeno de superficie de fibrosarcoma.

Para este último, en 1989 Davis y Gregoriadis buscaron una relación adecuada en la composición de los liposomas y el toxoide necesario para un efecto adyuvante. Al inyectar a ratones con diferentes cantidades de toxoide en forma libre o encapsulado en liposomas de deshidratación y rehidratación (DRV) así como unido covalentemente a la superficie de vesículas multilamelares (MLV). Dos inyecciones vía intramuscular de cada preparación con intervalo de 4 semanas entre cada una estimularon la producción de anticuerpos del isotipo IgG predominantemente de las subclases IgG1 e IgG2b. Además obtienen diferencias en la cantidad de anticuerpos para las distintas preparaciones de liposomas según la concentración de antígeno y composición de cada uno. Garcon, y colaboradores en 1988 continuaron con el estudio del mismo antígeno encapsulado en liposomas DRV, estudiaron el efecto adyuvante al ligar una albúmina manosiliada. Ellos observaron ex vivo, que los liposomas manosiliados se unen selectivamente a macrófagos peritoneales de ratones Balb/c con mayor intensidad que los no manosiliados.

Davis y Gregoriadis en 1989 con el mismo toxoide encapsulado en liposomas estudiaron la respuesta primaria y el efecto adyuvante de algunos mediadores fisiológicos y no fisiológicos. Observaron que la respuesta primaria, que no fue detectable con el antígeno libre, si fue con la misma cantidad de antígeno (0.2 µg) proporcionado en liposomas, siendo la mejor respuesta en el rango de una proporción de masa de fosfolípido liposomal por toxoide de (37.4: 1-2857: 1). Cuando los rangos fueron mayores el efecto adyuvante se redujo a niveles muy bajos. Así mismo el uso de interleucina-2 (IL-2), INF-γ y MDP atrapados cada uno junto con el toxoi-

de en las proporciones adecuadas o encapsulados por separado, pero mezclados al momento de inyectarlos, redujeron generalmente la respuesta primaria a niveles menores que aquella obtenida con el antígeno encapsulado solo.

Uno de los lípidos más utilizados para elaborar liposomas es la fosfatidilcolina, desafortunadamente la misma, es sustrato de la actividad enzimática de la TA. En 1988 Moreau y colaboradores describieron la actividad de la toxina sobre monocapas de fosfolípidos de diferentes tipos donde destacan a la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol como fosfolípidos resistentes a la actividad enzimática de la toxina. Nagahama y colaboradores en 1996, observaron los efectos de la toxina sobre liposomas multilamelares preparados con varios fosfolípidos y colesterol. Ellos mismos en 1998, reportaron que el daño de la toxina en la membrana es debido a la accesibilidad especial del dominio C-terminal de la toxina hacia el residuo insaturado acyl graso de la bicapa de fosfatidilcolina, la unión específica del dominio N-terminal con la fosfatidilcolina y entonces el rompimiento de la unión de fosfodiéster en posición 3 de la fosfatidilcolina por el dominio N-terminal de la toxina.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

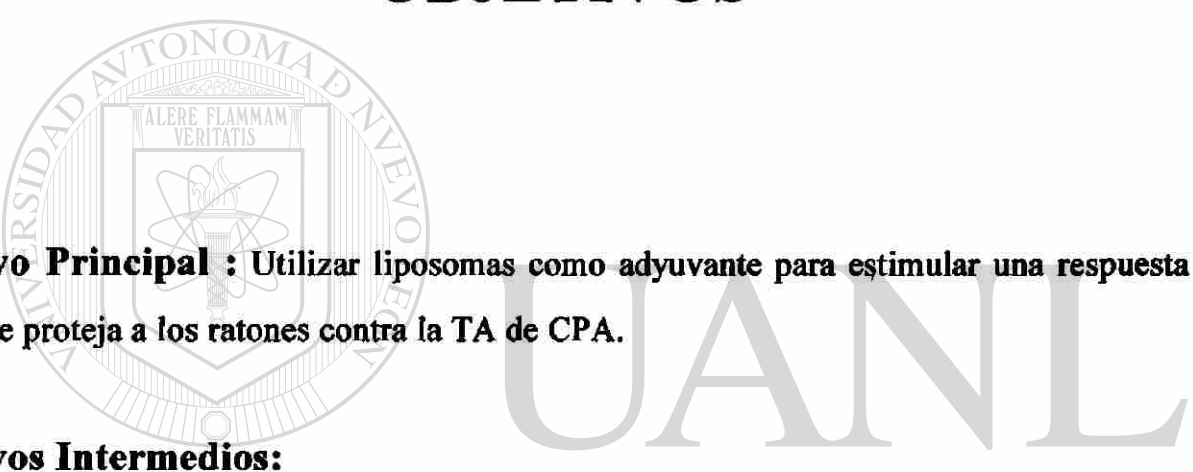
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

HIPÓTESIS

La toxina α de Clostridium perfringens tipo A atrapada en liposomas induce una respuesta inmune protectora.

OBJETIVOS



Objetivo Principal : Utilizar liposomas como adyuvante para estimular una respuesta inmune que proteja a los ratones contra la TA de CPA.

Objetivos Intermedios:

- 1) Calcular la dosis letal media (LD50) en ratones Balb/c con una preparación comercial de la toxina.
- 2) Elaborar liposomas que en su interior contengan la toxina alfa y medir la eficiencia de atrapamiento.
- 3) Aplicar el preparado toxina-liposomas en ratones Balb/c vía IM.
- 4) Evaluar la respuesta inmune y la protección obtenida, retando a los animales inmunizados con 5 veces la LD50.

Objetivo final: Demostrar que los liposomas pueden ser ideales para obtener una vacuna que confiera protección contra los efectos letales de la Toxina alfa de Clostridium perfringens tipo A que afecta al hombre y los animales.

MATERIAL Y MÉTODOS.

- Toxina alfa de CPA tipo XIV liofilizada SIGMA Chemical Co. México.
- L-A-fosfatidiletanolamina dilauroyl SIGMA chemical Co. México.
- Colesterol Avanti polar lipids U.S.A.
- Microplacas 96 pozos fondo plano Nalge Nunc
- Jeringa plástica desechable calibre 29 x 13 (1/2 pulgada) para 30 unidades de insulina.
- Tubos Vacutainer con citrato de sodio.
- Aguja para Vacutainer calibre 23
- Película blanco y negro APX formato 120 marca AGFA.

Sol. Amortiguadora de fosfatos salino PBS constituido por:

1.9 mM NaH_2PO_4 (anhidro) 8.1 mM Na_2HPO_4 (anhidro) 154 mM NaCl

Ajustar el PH a 7.2 (Yamamoto et, al.1972)

Sol. Amortiguadora de Boratos salino BBS constituido por:

0.17 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 0.12 M NaCl

Ajustar el PH a 7.6 con NaOH (Tso & Siebel.1989)

Cuando se utiliza para las diluciones seriadas se agrega 0.1 mg de albúmina sérica bovina /ml

- Centrífuga Eppendorf 5415 C
- Extruder lipiex biomembranics, Vancouver Canadá
- Sonicador Branson modelo 3210
- Centrífuga refrigerada para tubos y placas Beckman
- Microplate autoreader Bio-tek instruments EL311
- Campana de flujo laminar Labconco
- Vortex
- Microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-109
- Ultra micrótomo MTX

I.- Calculo de la dosis letal media LD50

A.- Preparado de la toxina: Se utilizó un purificado comercial liofilizado de la toxina alfa de CPA el cual fue resuspendido en solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) donde la concentración final fue de 0.4 mg / ml.

B.- Ratonés: Para este trabajo se utilizaron ratones Balb/c. de 18 a 22 g de peso. Los animales provenían del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, los mismos fueron conservados bajo régimen de alimentación y agua a libre acceso y en condiciones higiénicas acordes a este tipo de ensayos.

C.- Aplicación de la toxina: La administración de la toxina se realizó en la vena caudal en la base de la cola. Los ratones fueron inyectados previa limpieza con gasa impregnada de alcohol y aplicación de xilol para provocar dilatación de la vena. Cada dosis de la toxina fue calculada y ajustada para que el volumen final que se aplicara a cada ratón fuera de 0.25 ml.

D.- Método de cálculo de dosis media letal: Para obtener la dosis que mata al 50 % de la población o LD50 se aplicó la siguiente fórmula acorde al método descrito por Reed y Muench. Cada ensayo fue repetido una ocasión.

1.) Se llena el siguiente cuadro con los datos obtenidos.

Dosis	Vivos	Muertos	Total de Vivos	Total de Muertos	Número Acumulado	% Mortalidad
-------	-------	---------	----------------	------------------	------------------	--------------

Dosis = llenar con las diferentes dosis

Vivos = Animales que sobre viven a cada dosis

Muertos = Animales que mueren en cada dosis

Total de vivos = Sumar los animales vivos acumulativamente hacia abajo

Total de muertos = Sumar los animales muertos acumulativamente hacia arriba

Número Acumulado = Es la suma horizontal de total de vivos y total de muertos

% Mortalidad = La diferencia entre el total de muertos y el número acumulado expresado en porcentaje

2.) Se aplica la siguiente formula para los datos del cuadro.

$$C = A - 50 / A - B$$

$$LD_{50} = (C) (D) + *(E)$$

Donde se sustituyen los datos.

A = Porcentaje de mortalidad por arriba del 50 %

B = Porcentaje de mortalidad por abajo del 50 %

C = Distancia Proporcional

D = Logaritmo del factor de dilución

E = Dilución en la cual el porcentaje de mortalidad esta por abajo del 50%

* En este caso debido a que el número que se obtiene de la multiplicación (C) (D) es negativo, en lugar de ser sumado en forma directa se cambia a positivo y aplica sumado ya que así lo indica la característica.

3.) Criterio para definir vivos de muertos.

El criterio fue verificar a las 24 h después de aplicada la TA, aquel ratón que aún presentaba capacidad para respirar fue considerado vivo sin importar otras condiciones o que falleciera después.

II.- Elaboración de liposomas y eficiencia de atrapamiento.

A.- Diseño de liposomas: Debido a que no existe experiencia para realizar liposomas con la actividad enzimática de la toxina intacta, se decidió por su facilidad y versatilidad, elaborar vesículas multilamelares grandes (MLV) con fosfatidiletanolamina sintético y colesterol en un rango molar de 4:1 . Los liposomas fueron realizados en apego a la técnica descrita por Brynes-tad, y colaboradores en 1990, para realizar vesículas multilamelares grandes con algunas modificaciones, siendo como sigue:

1.) Elaboración de liposomas.

- 1.1) Se procedió a calcular la proporción de masa peso volumen para la fosfatidiletanolamina y el colesterol.
- 1.2) Se colocó en un matríz de vidrio de 25 ml limpio y estéril, 11 mg de L-A- fosfatidiletanolamina, 2 mg de colesterol, 4 ml de cloroformo y 1 ml de metanol, se mezclaron manualmente por 15 min.
- 1.3) Bajo flujo continuo de N₂ y rotación manual constante se evaporó el cloroformo y metanol hasta producir una película fina de fosfolípidos en la pared del matríz.
- 1.4) La mezcla se hidrató con 5 ml de PBS en el cual se disolvieron 50 µg de la TA. El preparado se selló y guardó a 4 ° C durante 24 h.
- 1.5) En baño María la mezcla se calentó de forma gradual hasta alcanzar la temperatura de transición entre los 45° a 50° C de inmediato se agito en un vortex durante 20 a 30 min hasta que se disolvió completamente la película de fosfolípidos y se formaron las vesículas multilamelares con la toxina incorporada.
- 1.6) El material obtenido ayudado por nitrógeno a presión es pasado a través de un extrusor, para obtener vesículas multilamelares de tamaño uniforme, utilizando membranas de policarbonato de 100 nm de diámetro repitiendo este paso 2 o 3 ocasiones.

1.7) El resultado del paso anterior, liposomas con TA (L-TA) son colocados en viales de 1 ml y almacenados a 4° C hasta ser utilizados. Como control también se elaboraron liposomas a los cuales no se agregó la TA.

2.) Caracterización de liposomas por microscopía electrónica de transmisión.

La microscopía fue realizada para verificar la formación de liposomas MLV.

Las muestras se someten al siguiente tratamiento:

2.1) Centrifugada a 2,500 r.p.m. 5' cada paso.

2.2) Fijada en glutaraldehído al 2.5% por 30'.

2.3) Lavada en amortiguador de cacodilatos-sacarosa por 5'.

2.4) Postfijada en tetraóxido de osmio 2% por 30'.

2.5) Lavada en el mismo amortiguador por 5'.

2.6) Colocada en nitrato de uranilo 1%, acuoso, por 30'.

2.7) Lavada en el mismo amortiguador por 5'.

2.8) Deshidratada en:

Acetona 30% por 5'

Acetona 50% por 5'

Acetona 70% por 5'

Acetona 90% por 5'

Acetona 100% por 5'

2.9) Preincluida en la mezcla acetona-resina epóxica (1:1), toda la noche a 4°C.

2.10) Incluida en resina epóxica pura a temperatura ambiente por hora.

2.11) Polimerizada a 60°C.

Los cortes semifinos se realizaron con cuchillas de vidrio en ultra micrótomo y se tificaron con azul de metileno, se observaron y fotografiaron en fotomicroscopio. Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo y acetato de plomo para ser observados al microscopio electrónico de transmisión. De donde se tomó el registro de las imágenes.

B.- Extracción de la toxina de los liposomas: Para conocer la cantidad de toxina que fue atrapada en liposomas, se procedió a extraer la misma con el siguiente procedimiento:

1.) Lavado de liposomas.

Las moléculas de TA que se quedaron sin incorporar en el exterior de los liposomas fueron eliminadas con el siguiente procedimiento:

- 1.1) La suspensión de L-TA obtenida fue centrifugada 5 min a 12000 r.p.m. obteniéndose un sedimento adherido en el fondo del vial.
- 1.2) Por decantación la solución de PBS-TA fue desechada.
- 1.3) El sedimento se resuspende al agregar 1ml de PBS y agitación manual, se repitieron los pasos anteriores en 3 ocasiones. En el último solo se resuspendió el preparado.

2.) Sonicado de liposomas.

Una vez lavados los liposomas y para romper la estructura bipolar que se forma por parte de los lípidos y extraer la TA del interior de los liposomas se utilizó la sonicación como se describe:

- 2.1) Diferentes viales de liposomas lavados son colocados en el aparato sonicador durante 3,5, 10, 15 y 20 min.
- 2.2) Así mismo se colocó un ml de PBS en un vial con una concentración conocida de TA para ser sonicada en forma paralela.

3.) Choque térmico.

La TA en PBS y los L-TA lavados fueron sometidos a un choque térmico de -20°C hasta 37°C para ocasionar la cristalización y ruptura de la bicapa de lípidos y liberar la TA.

- 3.1) En viales de 1.5 ml fueron colocados 1 ml de L-TA y 1 ml de TA en PBS en una concentración de $.125\ \mu\text{g} / \text{ml}$.
- 3.2) Estos viales fueron congelados por 24 h a -20°C
- 3.3) Los viales congelados fueron colocados en un baño María a 37°C hasta que volvieron a recuperar el estado líquido, aproximadamente 4 min.

3.4) Las muestras son centrifugadas 5 min a 12 000 r.p.m. y el sobrenadante es colocado en viales nuevos para la prueba de hemólisis.

C.- Actividad hemolítica de la toxina alfa: Una vez libre la TA de los liposomas se procedió a calcular su actividad hemolítica y así estimar la cantidad de TA liberada, para lo cual se utilizó la prueba de hemólisis en microplaca con frío y calor, en base a la técnica descrita por Tso y Siebel en 1989 con algunas modificaciones que a continuación se detallan:

1.) Obtención y preparación de eritrocitos de carnero.

1.1) Mediante punción de la vena yugular aguja calibre 23 y con sistema de tubos con vacío comerciales con citrato de sodio como anticoagulante, se extrajo sangre de ovinos adultos de raza pelibuey previa depilación y limpieza de la zona.

1.2) La muestra de sangre fue centrifugada a 4° C a 2000 r.p.m. 10 min.

1.3) El plasma y los leucocitos fueron retirados, solo se conservaron las células rojas.

1.4) Los eritrocitos fueron lavados por lo menos 5 veces con solución isotónica amortiguadora de boratos (BBS) y las células fueron suspendidas al 1% (vol/vol) en la misma solución.

2.) Prueba de hemólisis en frío y calor en microplaca.

2.1) Para hacer diluciones seriadas al doble en una placa de 96 pozos fondo plano se colocó por duplicado una cantidad conocida de la TA disuelta en BBS al cual se le agregó 0.1 mg./ ml de albúmina sérica bovina, para un volumen final por pozo de 0.15 ml.

2.2) En la misma placa se colocó 0.15 ml del sobrenadante de L-TA lavados o los problemas a verificar.

2.3) De los eritrocitos de carnero preparados se agregó 0.15 ml a cada pozo para un volumen final de 0.300 ml.

2.4) Se incubó en baño María a 37° C 30 min. seguido de un enfriamiento a 4° C por el mismo tiempo.

2.5) Después de centrifugar la placa a 2500 r.p.m. por 10 min se tomaron 200 µl para determinar la liberación de hemoglobina en un lector de microplacas a 540 nm.

3.) El calculo de la eficiencia de atrapamiento de la TA.

Las lecturas obtenidas en el lector son promediadas y se analizan en una prueba de regresión lineal simple.

III Aplicación del preparado toxina-liposomas (L-TA)

Para la aplicación de la L-TA se tomo como referencia el esquema utilizado por Logan y colaboradores en 1991 con algunas adecuaciones. Phillips y Emili en 1992 describen en su trabajo la importancia de la vía intramuscular para estimular predominantemente anticuerpos de la clase IgG y del isotipo IgG1 en liposomas compuestos de fosfatidilcolina y colesterol, motivo para utilizar esta via de administración.

A.- Estrategia de inmunización.

Se aplicó una dosis inicial 3 ng/ ratón del preparado L-TA en el grupo de músculos del fémur de cada animal (Fig. 3) seguido de una segunda y tercera aplicaciones iguales a la primera, con intervalo de 7 días entre cada una de ellas.

B.- Modelo animal.

Para esta parte se utilizaron ratones (Fig. 3) Balb/c. de 10 a 14 g de peso. Un grupo placebo inmunizado con liposomas sin TA y otro grupo inmunizado con L-TA. Cada grupo constó de 6 elementos y la prueba se realizó por duplicado.

Fig.- 3 La suspensión de L-TA fue aplicada en cada ratón de la cepa Balb/c en el miembro posterior derecho inicialmente e intercambiando de lado en cada subsiguiente aplicación.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV.- Desafío de animales.

7 días después de finalizar el esquema de inmunización se realizó el desafío por vía intravenosa en la base de la cola con 5 LD₅₀ / ratón (12.7 µg). Los ratones fueron observados por 24 h para fines de medición de la prueba, sin embargo los sobrevivientes se conservaron en observación por 6 semanas.

RESULTADOS

I.- Calculo de la dosis letal media.

A.) Llenado de cuadro para aplicar el método de Reed y Muench.

El primer ensayo se realizó con 3 grupos de 6 ratones cada uno (Tabla 4) y la dosis de inicio fue la que se reporta con mas frecuencia en la literatura. Donde ningún animal murió, por lo que se decidió explorar dosis mayores y posteriormente menores tablas 5, 6, y 7.

Tabla.- 4 Los ratones utilizados para esta dosis manifestaron en términos generales síntomas como pelo hirsuto, depresión, anorexia, necrosis leve en la zona de aplicación pero no murieron

Dosis	Vivos	Muertos	Total Vivos	Total muertos	Núm. acum..	% Mortalidad
110 ng.	6	0	30	0	30	0%
50 ng.	6	0	20	0	20	0%
10 ng.	6	0	10	0	10	0%

Tabla.- 5. En este ensayo con el propósito de consumir un número menor de ratones se redujo el número de elementos por grupo. Todos los ratones fallecieron en menos de 3 h.

Dosis	Vivos	Muertos	Total Vivos	Total muertos	Núm. acum..	% Mortalidad
20 µg	0	3	0	9	9	100%
15 µg	0	3	0	6	6	100%
10 µg	0	3	0	3	3	100%

Tabla.- 6. Las observaciones para este ensayo son las mismas que en el grupo anterior con diferencia de que requieren mas tiempo para morir y que dos ratones sobreviven en la dosis mas baja.

Dosis	Vivos	Muertos	Total Vivos	Total muertos	Núm. acum..	% Mortalidad
5 µg	0	3	0	10	10	100%
4 µg	0	3	0	7	7	100%
3 µg	0	3	0	4	4	100%
2 µg	2	1	2	1	3	33%

Tabla.- 7. Para esta prueba en cada grupo el factor de dilución se diferencio 0.2 µg entre cada uno, observándose una distribución adecuada para aplicar el método de Reed y Muench.

Dosis	Vivos	Muertos	Total Vivos	Total muertos	Núm. acum..	% Mortalidad
3 µg	0	6	0	21	21	100%
2.8 µg	0	6	0	15	15	100%
2.6 µg	2	4	2	9	11	81%
2.4 µg	3	3	5	5	10	50%
2.2 µg	4	2	9	2	11	18%

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

B.) Aplicación de datos del cuadro a la fórmula.

$$C = 81 - 50 / 81 - 18$$

$$C = 31 / 63 = 0.49$$

$$LD_{50} = (0.49) (-0.698) + *(2.2)$$

$$LD_{50} = (-0.342) + *(2.2)$$

LD₅₀ = 2.54 µg / ratón Balb/c de 18 a 22 g de peso vía intravenosa.

II.- Liposomas y eficiencia en el atrapamiento.

A.) El calculo para la proporción de masa peso volumen.

Para la fosfatidiletanolamina y el colesterol fue de la siguiente manera.

Fosfatidiletanolamina

g = Masa	Volumen	Peso Molecular
$g = (4 \times 10^{-3})$	(0.005)	(579.8)
$g = 0.011596$	mg = 11	

Colesterol

$g = (1 \times 10^{-3})$	(0.005)	(386.7)
$g = 0.001933$	mg = 1.9	

B.) Medición de la actividad hemolítica de las diferentes preparaciones.

En la tabla 8 se aprecia un comparativo de las pruebas realizadas. En los liposomas lavados con y sin TA atrapada no fue posible detectar actividad hemolítica, las pruebas se realizaron al finalizar la elaboración de los liposomas y después de 6 semanas de refrigeración.

Las muestras de L-TA que fueron sonicadas durante 5, 10 y 15 min. no mostraron actividad hemolítica. Sin embargo a los 20 min. la actividad fue calculada en 0.036 ng / μ l aproximadamente.

Cuando la TA en PBS fue sonicada durante 3 min no se apreció alteración en su actividad hemolítica pero al ser sonicada 5 min o más perdió la mencionada actividad.

El material que se obtuvo del primer paso del lavado de liposomas dió una medición de 0.846 ng / μ l . No se detectó actividad hemolítica en el resto de los lavados.

El choque térmico, no ocasionó alteración aparente a la TA en su actividad hemolítica.

Los L-TA sometidos al choque térmico mostraron actividad hemolítica de 0.38 ng / μ l

Tabla.- 8 La TA no sufre alteración en su actividad hemolítica por efecto del choque térmico, sin embargo es susceptible al efecto de la sonicación.

Liposomas sin TA lavados	Actividad hemolítica no detectable
TA sonicada 3' (0.5 ng/μl)	Actividad hemolítica sin alteración
TA sonicada 5' o más (0.5 ng/μl)	Actividad hemolítica no detectable
L-TA lavados	Actividad hemolítica no detectable
L-TA sonicados 15' o menos	Actividad hemolítica no detectable
L-TA sonicados 20'	0.036 ng / μl
Solución PBS-TA 1 ^{er} lavado	0.846 ng / μl
TA choque térmico (0.5 ng/μl)	Actividad hemolítica sin alteración
L-TA choque térmico	0.038 ng / μl

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

C.- Fotografías y descripción de los liposomas

El método para elaborar liposomas que se utilizó, dio como resultado vesículas de aproximadamente 150 nm de diámetro con espacio central interior grande y una lámina doble estrecha de por lo menos dos capas de una combinación 4 a 1 de fosfatidiletanolamina y colesterol respectivamente las imágenes de la fotografía original, han sido aumentadas de tamaño para ser apreciadas de mejor forma. Algunas fueron marcadas con un color para seleccionar el centro del liposoma la magnificación total varía de 28,800 hasta 120,000 aumentos.

Figura.-4 Esta fotografía muestra liposomas de tamaño similar, la imagen original fue tomada a 28,800 aumentos y se ha magnificado con la computadora tratando de distorsionar lo menos posible la forma original de la misma y llegar a apreciar mejor la forma esférica de los liposomas, sin embargo uno de ellos pierde su mencionada forma, por razones desconocidas. El espacio central fue señalado con un marcador. La fotografía es en blanco y negro.



**Figura.-5 En esta imagen tomada a 120,000 aumentos se aprecia dos vesículas aparentemente de diferente tamaño sin embargo la mas pequeña podría ser solo una parte de la esfera. En la su-
puesta grande se aprecia el espacio central interior amplio y una línea doble estrecha de por lo
menos dos láminas de fosfolípidos formando bicapas con un breve espacio acuoso entre ellas.**

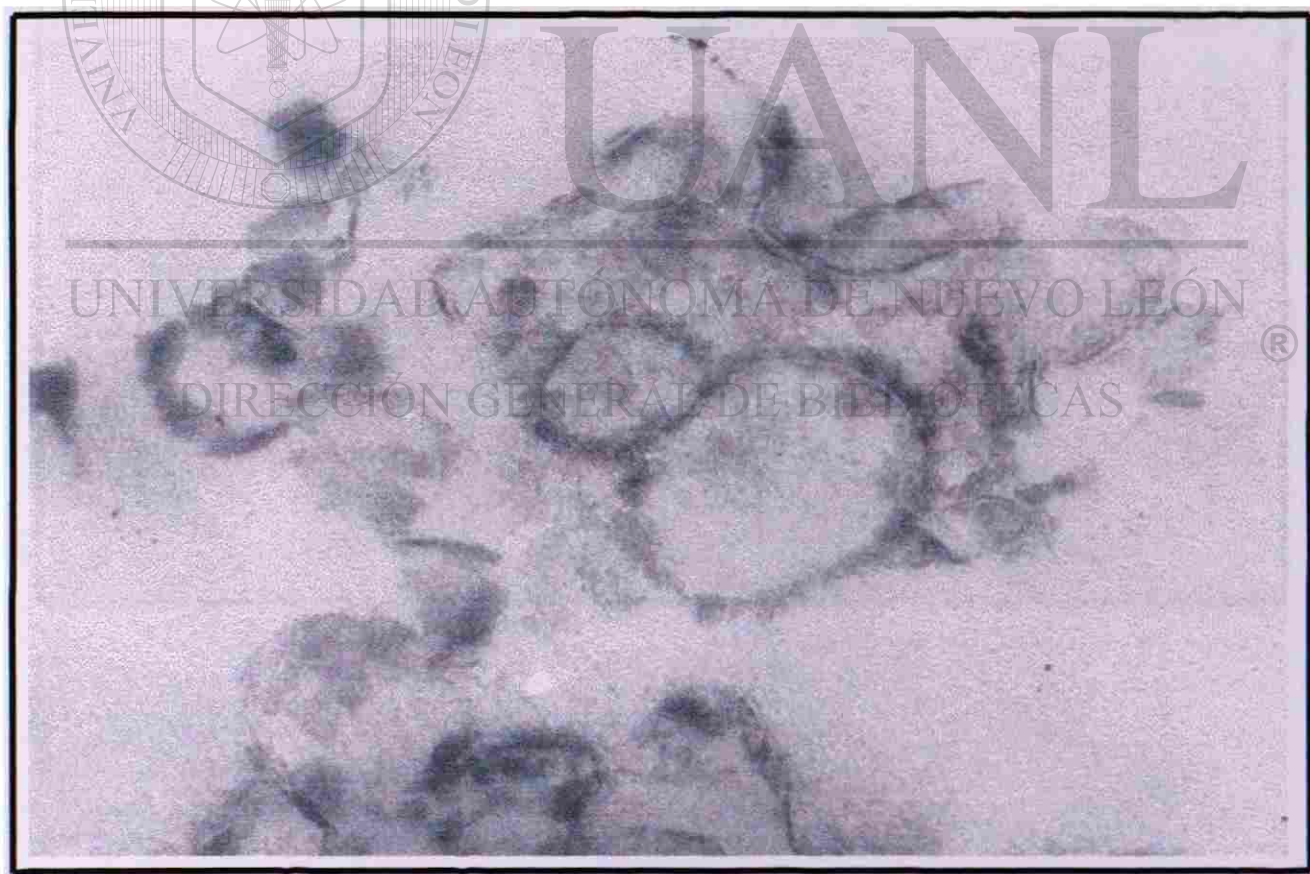


Figura.-6 De la figura 4 utilizando la computadora se seleccionó una sección para aumentarla de tamaño y tratar de apreciar la línea doble estrecha formada por las dos láminas de fosfolípidos ordenadas en bicapas. El espacio acuoso entre las bicapas no se aprecia totalmente.



III.- Desafío de animales inmunizados.

La sobrevivencia de los animales después de 24 h se describe en el Tabla 9. El 66 % de los ratones sobreviven al período de observación inicial, después de 72 hs. aproximadamente solo el 33.3 % de los animales se encontraron vivos. Los sobrevivientes presentaron necrosis de la zona donde se aplicó la TA. Después de 14 días se recuperaron por completo de la lesión, solo se observó la cicatriz en el sitio de aplicación de la TA. Figuras 7,8 y 9.

Tabla.- 9 Después de 24 h un animal muere, manifestándose letárgico con respiración aumentada y superficial así como posteriormente otro ratón comienza a presentar incoordinación antes de morir.

Inmunización	% Sobrevivencia /24 h	% Sobrevivencia /48 h	% Sobrevivencia /72 h	%Sobrevivencia / 6 sem.
L-TA 0.3ng/ratón	66.6	50	33.3	33.3
Liposomas sin TA	0			
Sin inmunizar	0			

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura.- 7 En esta imagen se aprecia la zona perianal en uno de los ratones utilizados para este ensayo donde hay deformación por la necrosis ocasionada por la toxina.

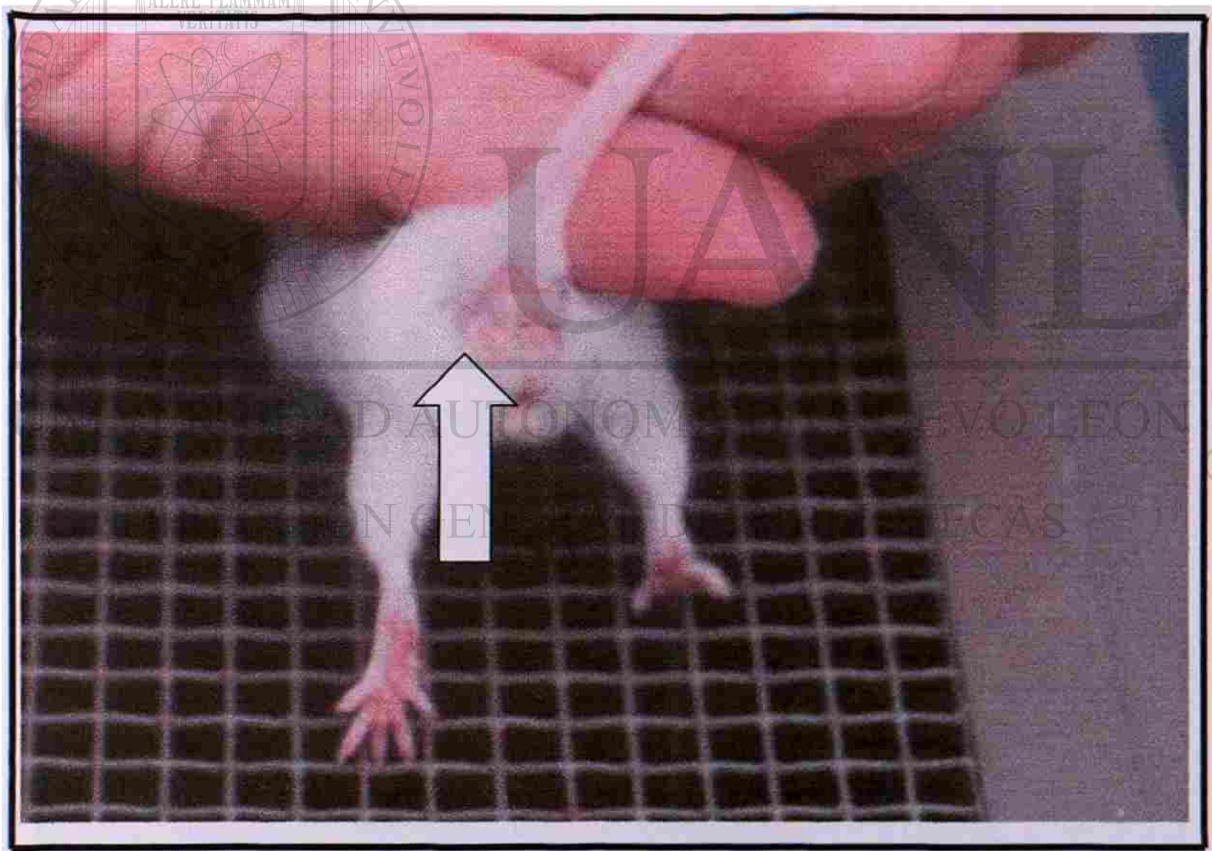


Figura.-8 En esta imagen se puede apreciar la zona granulomatosa en la parte lateral izquierda de las primeras vértebras coccígeas. Zona donde fue aplicada la toxina.



Figura.-9 En esta imagen se aprecia una zona alopécica después de catorce días de haber sido aplicada la toxina no hay granulomatosis aparente solo la lesión en piel y después de seis semanas el pelo no creció.



DISCUSIÓN

El CPA produce en medio de cultivo varias exotoxinas y en forma paralela algunas enzimas, siendo la TA la principal, por su actividad biológica y bioquímica es conocida como letal, hemolítica, necrótica y de fosfolipasa C. (Krug, 1986 & Nagahama et al., 1998)

La información que existe con respecto a la dosis letal media es muy similar pero se aprecian algunas variaciones que dependen de cómo se obtiene la toxina, la forma de purificarla, la edad, o peso de los ratones y la vía de administración. Schoepe en 2001 reportó una dosis de 1.6 µg para ratones NMRI de 6 a 8 semanas de edad vía intraperitoneal con un peso aproximado de 26 g. Este dato no coincide con lo que se observó en este trabajo ya que la LD50 calculada supera por poco menos de 1 µg al reporte más reciente. Sato y colaboradores en 1989 describieron en su trabajo que cuando la TA se trata entre 50° y 70° C ésta forma agregados y su actividad enzimática se pierde, sin embargo entre los 80 y 100° C la TA se torna monómero y recupera su actividad enzimática. Otra observación que los mismos hacen es que la toxina cuando se trata con EDTA, reduce su actividad en un 20% con respecto a la toxina original. Al agregar zinc o al calentarse a 90° C la actividad se recupera casi por completo. Así mismo mencionan que estas toxinas modificadas muestran diferente afinidad con respecto a anticuerpos monoclonales, resultado que podría reflejar una alteración estructural de la toxina modificada. En 1984 Krug describe a la TA como una metalo-enzima ya que requiere para su actividad de iones de zinc. Moreau en 1988 reporta que los iones de calcio son esenciales para la unión a los lípidos mientras que los iones de zinc están involucrados específicamente en la hidrólisis catalítica del sustrato, por lo tanto para tener una actividad completa se requiere simultáneamente de ambos iones. Al cuestionar al proveedor de nuestras observaciones ellos respondieron que la actividad de fosfolipasa, que se ostenta en la etiqueta del producto no se ve alterada por el proceso de liofilización, pero mencionan desconocer si por el mismo se afecta la actividades hemolítica y letal de la TA. Estas actividades se localizan en diferentes epítomos de la toxina y son independientes (Schoepe et al., 1997). Mollby en 1976 compara estas actividades mediante una cepa de referencia y cepas que provenían de aislamientos frescos humanos, destacando que en

algunos casos las actividades mencionadas son iguales pero en otros es superior, lo cual demuestra diferencias entre bacterias de la misma especie. Por otra parte Murrell y colaboradores en 1993 observan que quizás debido al almacenado de las muestras con las que trabajaron la enterotoxina de *Clostridium perfringens* perdía la actividad letal en ratones.

En este estudio hemos utilizado un purificado comercial liofilizado y reconstituido en PBS situación que no se observa en las referencias revisadas, los argumentos antes expuestos quizás explican en cierto grado la diferencia entre los resultados de este trabajo y lo reportado en la literatura aun y cuando el proceso de liofilización no debería alterar la actividad biológica de la TA.

En relación al fosfolípido utilizado podemos mencionar que la fosfatidilcolina debido a sus características es uno de los lípidos más utilizados para elaborar liposomas desafortunadamente la misma, es sustrato de la actividad enzimática de la TA. Nagahama y colaboradores en 1996, reportaron los efectos de la toxina sobre liposomas multilamelares preparados con variedades de fosfatidilcolina y colesterol. En 1998 ellos mismos describen que el daño por la TA en la membrana es debido a la accesibilidad especial que presenta el dominio C-terminal de la misma hacia el residuo insaturado acyl graso de la bicapa de fosfatidilcolina. En 1988 Moreau y colaboradores describieron la actividad de la toxina sobre mono capas de fosfolípidos de diferentes tipos donde destacan a la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol como fosfolípidos resistentes a la actividad enzimática de la toxina. Estas observaciones nos llevaron a utilizar fosfatidiletanolamina como principal lípido y como elemento estabilizador de la estructura de la bicapa se agregó colesterol (Schneider, 1985). Ésta mezcla brindó liposomas multilamelares de aproximadamente 150 nm con capacidad de atrapar la TA. Además los mismos, demostraron ser estables en refrigeración por lo menos durante seis semanas y resistentes al efecto de sonicación hasta por quince min. Sin embargo un choque térmico de -20°C hasta 37°C fue suficiente para lograr romper los liposomas y liberar su contenido.

Con respecto a la integridad de la L-TA al ser aplicada a los ratones, se puede decir que aparentemente conservó su estructura ya que durante el ensayo no fue posible apreciar algún signo clínico de toxicidad, dolor al inspeccionar manualmente el miembro o daño en la zona donde se inyectó, sin embargo al considerar la cantidad tan pequeña de TA que fue aplicada, no es factible apreciar clínicamente algún daño por la posible liberación de la toxina. Uzal y colaboradores en 1999 atraparon la toxina iota de *Clostridium perfringens* tipo D y lo aplicaron en

cabras, ellos describen en su trabajo que considerando las condiciones de ese experimento al igual que nosotros no podríamos aseverar que no existe daño a nivel de tejidos o garantizar que la toxina permanece en el interior del liposoma. Como antecedente de la resistencia de los liposomas en tejidos, Gregoriadis en 1976 describe que liposomas examinados al microscopio electrónico antes y después de haber sido incubados con plasma mostraron retener su forma esférica, y menciona que mientras las proteínas estén atrapadas en el interior del liposoma ambos comparten el mismo destino. También reporta que la neuraminidasa de Clostridium perfringens atrapada en liposomas permaneció latente a todos los intervalos de tiempo que fue examinada, la actividad se detectó solo hasta que los liposomas fueron desbaratados por el uso de un detergente. Estas observaciones pudieran ser apreciadas en los liposomas aquí obtenidos sin embargo analizar el comportamiento de los mismos en el tejido animal no es competencia de este trabajo.

En lo que concierne a la vía de administración podemos mencionar que Phillips en 1991 obtuvo una respuesta de anticuerpos en ratones Balb/c del isotipo IgG predominantemente IgG1 para tres diferentes antígenos de origen proteico razón para aplicar la L-TA vía intramuscular. La dosis que se utilizó fue aproximadamente 3 ng / ratón en tres ocasiones, suficiente para estimular una respuesta que protegió parcialmente contra el efecto letal de la TA.

Para este trabajo nuestra intención no fue establecer una dosis adecuada para la inmunización, solo se buscó ver si se podía atrapar la toxina en liposomas y si esto podía proteger a los ratones contra un desafío letal con la TA. Por lo que consideramos que estudios posteriores sean diseñados para establecer la dosis apropiada para la inmunización en un protocolo de dosis-respuesta, la incorporación de la toxina en los liposomas con relación al rango de masa de fosfolípidos y toxina y la respuesta inmune que se obtiene.

CONCLUSIONES

La dosis letal media que se observa en este trabajo es mayor a los reportes encontrados en la literatura. Creemos que la toxina se pudo haber afectado por el proceso de liofilización y que por lo menos la actividad letal sufrió una leve alteración. Desconocemos si las demás actividades biológicas se ven afectadas ya que no fue interés de este trabajo buscar alteraciones de esa índole.

Bajo las condiciones descritas para este ensayo hemos demostrado que es posible, utilizando una preparación comercial, atrapar la TA en liposomas y que el material la preparación obtenida es estable en refrigeración por lo menos durante 6 semanas. La misma dista mucho de ser la mejor con respecto a la cantidad de toxina atrapada empero el procedimiento utilizado de inmunización con L-TA provoco protección contra los efectos letales de la TA, en más de la mitad de los ratones utilizados en el desaffo.

Aun y cuando no esta definido cual es la mejor concentración de antígeno en liposomas para el proceso de inmunización con L-TA, los datos observados en este trabajo son punto de referencia para buscar mejorar el diseño de los liposomas. Quedando claro que se debe de optimizar la relación del rango molar para buscar una mayor concentración de toxina atrapada. Lo cual puede representar una mejor respuesta inmune y lograr elaborar una vacuna que proteja contra las enfermedades ocasionadas por el CPA.

PERSPECTIVAS

El haber logrado atrapar la TA en liposomas, aplicarla en ratones y provocar la protección de los mismos contra los efectos letales de la toxina, solamente es el primer paso de temas posibles de investigación; conocer si la relación de la toxina atrapada en liposomas es la mejor para estimular protección, si la vía de administración es la adecuada para este preparado, es lo observado en ratones aplicable a otras especies, conocer el comportamiento de la L-TA a nivel tisular, que tipo de respuesta inmune se desencadena. Estos temas son de interés si pensamos en elaborar un biológico que pueda ser utilizado para inmunizar a humanos y evitar la infección por esta bacteria, además es pertinente recordar que es considerada un arma biológica y no existe una vacuna adecuada para humanos. Éste trabajo solo es la preparación de un campo fértil dentro de la investigación en las áreas de la inmunología y microbiología con respecto a Clostridium perfringens y la toxina alfa.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

- Allison,A.C ; Byars,N.E. ; (1990) ; Adjuvant formulations and their mode of action; Sem. Immunology.; 2 ; 369-374.
- Azuma, I. ; (1992) ; Synthetic immunoadjuvants: application to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity ; Vaccine; 10 ; 14 ; 1000-1006.
- Boyd, N.A.; Thomson, R.O. ; Walker, P.D. ; (1972) ; The prevention of experimental Clostridium-novyi and CL. Perfringens gas gangrene in high-velocity missile wounds by active immunization. ; J.Med.Microbiol. ; 5 ; 467-472.
- Boyd,N.A. ; Walker,P.D. ; Thomson,R.O. ; (1972) ; The prevention of experimental Clostridium novyi gas gangrene in high-velocity missile wounds passive immunization.; J.Med.Microbiol. ;5 ; 459-465.
- Byars N.E. ; Allison A.C.; (1987) ; Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity; Vaccine ; 5 ; 3 ; 223-228.
- Brynstad,K. ; Babbitt,B.; Huang,L. ; Rouse,B.T. ; (1990) ; Influence of peptide acylation, liposome incorporation,and synthetic immunomodulators on the immunogenicity of a 1-23 peptide of glycoprotein D of Herpes simplex virus : implications for subunit vaccines.
- Cato,E.P. ; Lance,W. ; Finegold,G.; Finegold. ; (1986) ; Bergey's manual of sistematic bacteriology ; Sneath,P.H. ; Mair,N.S.; Sharpe,M.E. ; Holt,J.G. Ed. ; William & Wilkins, U.S.A. ; 1179-1182.
- Clarke,L.E.; Diekmann-Guioy,B. ; McNamee,W. ; Java,Jr. D.J. ; Weiss,S.M. ; (1994) ; Enteritis necroticans with midgut necrosis caused by Clostridium perfringens. ; Arch.Surg. ; 129 ; 557-560.
- Davis,D.; Gregoriadis,G. ; (1987) ; Liposomes as adjuvants with immunopurified tetanus toxoide : influence of liposomal characteristics; Immunology ; 61 ; 229-234.

- Davis,D. ; Gregoriadis,G. ; (1989) ; Primary immune response to liposomal tetanus toxoide in mice: the effect of mediators ; Immunology ; 68 ; 227-282.
- Evans,DG.; (1943) ; The protective properties of the alpha antitoxin and antihyaluronidase occurring in CL. Welchii type A antiserum ; J.Pathol. Bacteriol. ; 55 ; 427-434.
- Evans,DG.; (1943) ; The protective properties of the alpha antitoxin and theta antihaemolysin occurring in CL. Welchii type A Antiserum. ; The british J. Exp.Pathology ; 24 ; 3 ; 81-88.
- Fidler.L ; (1985) ; Macrophages and Metastasis –A Biological Approach to Cancer Therapy: Presidential Address. ; Cancer Res. ; 45 ; 4714-4721.
- Garcon.N. ; Gregoriadis. G. ; Taylor. M. ; Summerfield. J. ; (1988) ; Mannose-mediated targeted immunoadjuvant action of liposomes. ; Immunology ; 64 ; 743-745.
- Gregoriadis. G. ; (1990) ; Immunological adjuvants: a role for liposomes ; Immunology Today ; 11 ; 3 ; 89-97.
- Gregoriadis. G. ; (1976) ; The Carrier Potential of Liposomes In Biology and Medicine ; The New England J. Med. ; 23 ; 704-710.
- Gregoriadis. G. ; Davis. D. ; Davis. A. ; (1987) ; Liposomes as immunological adjuvants: antigen incorporation studies ; Vaccine ; 15 ; 145-150.
- Hauschild,A.H.W. ; Nilo, L. ; Dorward, W.J. ; (1971) ; The role of enterotoxin in Clostridium perfringens type A enteritis ; Can.J.Microbiology ; 17 ; 987-991.
- Ito, A. (1968) ; Alpha Toxoid of Clostridium Perfringens I. Purification and Toxoiding of Alpha of C. Perfringens. ; Japan J. Med. Sci. Biol. ; 21, ; 379-391.
- Kameyama, S. ; Sato,H. ; Murata, R. ; (1972) ; The role of a-toxin of Clostridium perfringens in Experimental gas Gangrene in Guinea Pigs. Japan J. Med. Sci. Biol. ; 25 ; 200.

- Kennedy ,K.K. ; Norris, S.J. ; Beckenhauer, W.H. ; White, R.G. ; (1977) ; Antitoxin response in cattle vaccinated with Clostridium Perfringens Type C Toxoid. ; Vet.Med./Small Anim. Clinician ; 1213-1215.
- Kennedy , K.K. ; Norris, S.J. ; Beckenhauer, W.H. ; White, R.G. ; (1977) ; Vaccination of Cattle and Sheep with a Combined Clostridium perfringens Types C and D Toxoid. ; Am. J Vet Res. ; 38 ; 1515-1517.
- Krug, E.L. ; Kent, C. (1984) ; Phospholipase C from Clostridium perfringens; Preparation Characterization of Homogeneous Enzyme; Arch. Biochem. Biophys. ; 231 ; 2 ; 400-410.
- Logan, A. J. ; Williamson, E. D. ; Titball, R. W. Percival, D. A. ; Shuttleworth, A. D. ; Conlan, J. W. ; Kelly, D. C. ; (1991) ; Epitope Mapping on the Alpha-Toxin of Clostridium Perfringens ; Infect. Immunity ; 59 ; 12 ; 4338-4342.
- Lyristis, M. ; Bryant, A. E. ; Sloan, J. ; Awad, M. M. ; Nisbet, I. T. ; Stevens, D. L. ; Rood, J. I. (1994) ; Identification and molecular analysis of a locus that regulates extracellular toxin production in Clostridium Perfringens ; Mol. Microbiology ; 12 ; 5 ; 761-777.
- Mitsui , K. ; Mitsui, N. ; Hase, J. ; (1973) ; Clostridium perfringens exotoxins I. Purification and properties of α -toxin ; Japan. J. Exp. Med. ; 43 ; 2 ; 65-80.
- Moreau, H. ; Pieroni, G. ; Jolivet-Reynaud, C. ; Alouf, J. E. ; Verger, R. ; (1988) ; A new kinetic approach for studying phospholipase C (Clostridium perfringens α Toxin) activity on phospholipid monolayers. ; Biochemistry ; 27 ; 2319-2323.
- Murell, W. G. ; Stewart, B. J. ; O'neill, C. ; Siarakas, S. ; Kariks, S. ; (1993) ; Enterotoxigenic bacteria in the infant death syndrome; J. Med. Microbiol. ; 39 ; 114-127.
- Nagahama, M. ; Michiue, K. ; Mukai, M. ; Ochi, S. ; Sakurai, J. ; (1998) ; Mechanism of membrane damage by Clostridium perfringens alpha-toxin ; Microbiol. Immunol. ; 42 ; 8 ; 533-538.

- Nagahama, M. ; Iida, H. ; Nishioka, E. ; Okamoto, K. ; Sakurai, J. ; (1994) ; Roles of the carboxy-terminal region of Clostridium perfringens alpha toxin. ; FEMS Microb. Letters ; 120 ; 297-302.
- Nagahama, M. ; Michiue, K. ; Sakurai, J. ; (1996) ; Membrane-damaging action of Clostridium perfringens alpha-toxin on phospholipid liposomes ; Biochimica, et Biophys. Acta ; 1280 ; 120-126.
- Nicholson, G.L. ; Nass, M. ; Nicolson, N.L. ; (2000) ; Anthrax vaccine: controversy over safety and efficacy ; Antimicrobics and Infectious Disease Newsletter ; Elsevier Science ; www.flatlandbooks.com/anthrax.html
- Ninomiya, M. ; Matsushita, O. ; Minami, J. ; Sakamoto, H. ; Nakano, M. ; Okabe, A. ; (1994) ; Role of alpha-toxin in Clostridium perfringens infection determined by using recombinants of C. perfringens and Bacillus subtilis.; Infection and Immunity. ; 62 ; 11 ; 5032-5039.
- Phillips, N.C. ; Emili, A. ; (1992) ; Enhanced antibody response to liposome-associated protein antigens: preferential stimulation of IgG2a/b production ; Vaccine ; 10 ; 151- 158.
- Reed, L.J. ; Muench, H.A. ; (1938) ; A simple method of estimating fifty per cent endpoints ; Am. J. Hygiene ; 27 ; 493-497.
- Reddy, R. ; Nair, S. ; Brynestad, K. ; Rouse, B. T. ; (1992) ; Liposomes as antigen delivery systems in viral immunity ; Seminars in immunology ; 4 ; 91-96.
- Sakurai, J. ; Ochi, S. ; Tanaka, H. ; (1993) ; Evidence for coupling of Clostridium perfringens alpha-toxin-induced hemolysis to stimulated phosphatidic acid formation in rabbit erythrocytes.; Infect. Immunity.; 61 ; 9 ; 3711-3718.
- Sato, H. ; Chiba, J. ; Sato, Y. ; (1989) ; Monoclonal antibodies against alpha toxin of Clostridium perfringens.; FEMS, Microb. Letters. ; 59 ; 173-176.
- Schoepe, H. ; Wieler, L. H. ; Bauerfeind, R. ; Schlapp, T. ; Potschka, H. ; Hehnen, H. R. ; Baljer, G. ; (1997) ; Neutralization of hemolytic and mouse lethal activities of C. perfringens alpha-toxin need

simultaneous blockade of two epitopes by monoclonal antibodies.; *Microbial Pathogenesis* ; Academic Press limited; 23 ; 1-10.

-Schneider, M. ; (1985) ; *Liposomes as drug carriers: Ten years of research.*; Drug targeting P. Buri & Gumma, ed. ; Elsevier Science publishers.; 119-133.

-Stevens, D. L. ; Bryant, A. E. ; (1993) ; *Role of θ toxin, a sulfhydryl-activated cytolysin, in the pathogenesis of clostridial gas gangrene.* ; 16 ; 4 ; 195-199.

-Stevens, D.L. ; Tween, R.K.b ; Awad, M. M. ; Rood, J.I. ; Bryant, A.E. ; (1997) ; *Clostridial gas gangrene: Evidence that α and θ toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis* ; *J. Infectious Diseases* ; 195 ; 189-195

-Stokka, G.L. ; Edwards, A.J. ; Spire, M. F. ; Brandt, Jr. R.T. ; Smith, J.E. ; (1994) *Inflammatory response to clostridial vaccines in feedlot cattle* ; *J.A.V.M.A.* ; 204 ; 3 ; 415-419

-Titball, R.W. ; Hunter, S.E.C. ; Martin, K.L. ; Morris, B.C. ; Shuttleworth, A.D. ; Rubidge, T. ; Anderson, D.W. ; Kelly, D.C. ; (1989) ; *Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of Clostridium perfringens* ; *Infect. Immunity* ; 57 ; 2 ; 367- 376

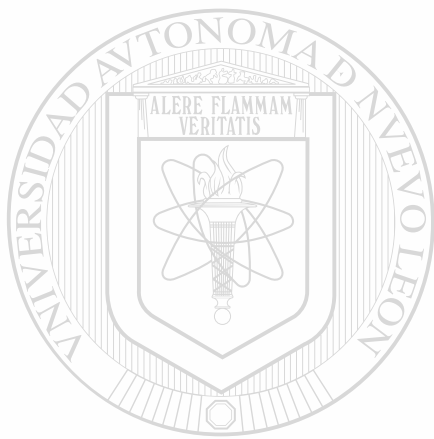
-Titball, R.W. ; Leslie, D.L. ; Harvey, S. ; Kelly, D. ; (1991) ; *Hemolytic and sphingomyelinase activities of clostridium perfringens alpha-toxin are dependent on a domain homologous to that of an enzyme from the human arachidonic acid pathway* ; *Infect. Immunity* ; 59 ; 5 ; 1872-1874

-Traub, W. H. ; Bauer, D. ; Wolf, U. ; (1991) ; *Immunobiology of Clostridium perfringens type A: Passive protection of NMRI mice* ; *Experim. Chemotherapy* ; 37 ; 318-326

-Traub, W. H. ; Bauer, D. ; Wolf, U. ; (1991) ; *Virulence of clinical and fecal isolates of Clostridium perfringens type A for outbred NMRI mice* ; *Experim. Chemotherapy* ; 37 ; 426-435

-Tso, J.Y. ; Siebel, C. ; (1989) ; *Cloning and expression of the phospholipase C gene from Clostridium perfringens and Clostridium bifermentans* ; *Infect Immunity* ; 57 ; 2 ; 468-476

- Ulanova, M. ; Tarkowski, A. ; Hahn-Zoric, M. ; Hanson, L. A. ; (2001) ; The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism ; *Infection and Immunity* ; 69 ; 1151-1159 .
- Uzal, F.A. ; Wong, J.P. ; Kelly, W.R. , Priest, J. ; (1999) ; Antibody response in goats vaccinated with liposome-adjuvanted *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. ; *Vet. Res. Commun* ; 23 ; 3 ; 143-150 .
- Williamson, E.D. ; Titball, R.W. ; (1993) ; A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene ; *Vaccine* ; 11 ; 12 ; 1253-1258
- Walker, P.D.; (1992); Bacterial vaccines : Old and new, veterinary and medical ; *Vaccine* ; 10 ; 14 ; 977-989
- Yamamoto, A. ; Ito, A. ; Soda, S. ; Sato, H. ; Sadahiro, S. ; Murata, R. ; (1972) ; Bioassay for α -toxin of *Clostridium perfringens* using survival time in mice ; *Japan J. Med. Sci. Biol.* ; 25 ; 15-23
- Zamecnik, P.C. ; Brewster, L.E.; Lipman, F. ; (1947) ; A manometric method for measuring the activity of the *Cl. Welchii* lecithinase and a description of certain properties of this enzyme ; *J.Exp. Med.* ; 8 ; 51 ; 381-384



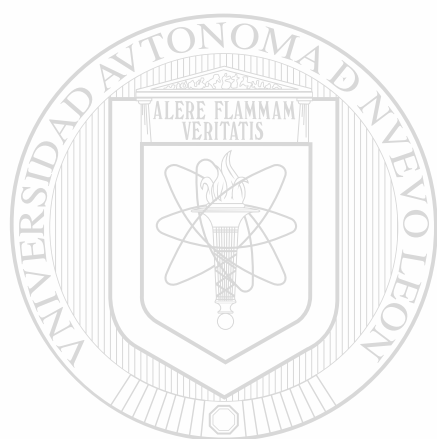
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ENCUADERNACIONES URGENTES
• SERVICIO A DOMICILIO •
Roberto Morales Soto
DIEGO DE MONTEMAYOR No. 637-1 NTE.
ENTRE TREVIÑO E ISAAC GARZA
ZONA CENTRO MONTERREY, N. L.
TEL., FAX 83-74- 3-00 PART. 83-81-94-41

12