UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

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

2002

M.V.Z. DANIEL JULIO EGUIARTE LARA

T

TM
QR82
.C6
E4
2002
c.1

1080124414

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
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

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

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.

TESIS

QUE PRESENTA

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

San Nicolás de los Garza Nuevo León. Julio de 2002

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

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.

San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Julio de 2002

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.

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 criticas, 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.

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.- Ratones 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 LD_{50} Página 21

Tabla 4 Dosis alta para calculo de LD_{50} Página 21

Tabla 5 Dosis baja para calculo de LD_{50} 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 Sobrevivencia de ratones después del desafío con 5 LD_{50} 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

LD_{50}	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	Iterleucina 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 LD_{50}. 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.

SUMMARY

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 tree 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 LD_{50}. 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.