

11674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FES-COAHUILTLAN

EVALUACIÓN DE LA FASE CÚBICA DEL MONOLEATO DE
GLICERILO COMO SISTEMA DE PROTECCIÓN Y ACARREO
DE TOXINAS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JORGE ALEJANDRO LÓPEZ BERMÚDEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

MÉXICO D.F.

2005

m. 345228



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lo que puedas hacer, o has soñado que podrías hacer, debes comenzarlo. La osadía lleva en sí, genio, poder y magia.

Goethe

Este trabajo esta dedicado a todos aquellos que junto a mi alguna vez creyeron que con un poco de esfuerzo y dedicación los sueños se pueden hacer realidad.

A mi hija Alejandra por su ternura, su comprensión y su amor.

A la Dra. Susana Mendoza Elvira, por darme la oportunidad de continuar con mis estudios, por su apoyo incondicional, por creer en mi.

Al Dr. Abel Ciprian Carrasco, por su invaluable cooperación para la realización de este trabajo, por su confianza.

Al Dr. David Quintanar Guerrero por indicarme el camino a seguir para alcanzar la superación académica. Por su amistad.

Al Dr. Andres Romero Rojas, por sus invaluable consejos, porque sin su ayuda este trabajo no hubiera podido ser realizado.

A los integrantes del laboratorio de Virología, en especial al Sr. Gabino Sanchez y al MVZ David Trujillo por su ayuda y su inolvidable convivencia.

Mi mas sincero agradecimiento.

ÍNDICE

	Página
Resumen	3
1.0 Introducción	4
1.1.1 Agente etiológico	4
1.1.2 Factores de patogenicidad	5
1.1.3 Toxinas Apx	6
1.1.4 Epidemiología	9
1.1.5 Diagnóstico de la enfermedad	10
1.1.6 Control de la enfermedad	11
1.1.6.1 Quimioterapia	11
1.1.6.2 Inmunización	11
1.1.6.3 Manejo de los animales	11
1.2 Producto farmacéutico con actividad de acarreador	13
1.2.1 Acarreadores lipídicos con actividad de acarreador	13
1.2.2 Monoleato de glicérido	13
1.2.3 Lípidos polares y fases de transición	14
1.2.4 Fase cúbica de la monoleína	15
1.2.5 Luz polarizada y la fase cúbica de la monoleína	17
1.3 Justificación	20
1.4 Hipótesis	22
2.0 Objetivo general	23
2.1 Objetivos particulares	23
3.0 Material y métodos	24
3.1.1 Cepa bacteriana	24
3.1.2 Obtención de la semilla	24
3.1.3 Obtención de sobrenadantes ricos en toxinas Apx	24
3.2 Inactivación con formaldehído	25
3.3 Filtración	25
3.4 Concentración por liofilización	26
3.5 Determinación de proteínas por el método de Bradford	26
3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS	27
3.6.1 Preparación del gel de poliacrilamida SDS	28
3.6.2 Preparación de las muestras para electroforesis	29
3.6.3 Corrimiento electroforético	29
3.6.4 Tinción de proteínas en el gel de poliacrilamida SDS	29
3.7 Dosificación de la toxina	29
3.7.1 Ensayo de citotoxicidad en cultivos celulares	30
3.7.2 Prueba de actividad hemolítica	30
3.8 Preparación del gel de monoleína acarreador de las toxinas Apx	31
3.8.1 Preparación del antígeno	31
3.8.2 Obtención del gel	31
3.8.3 Evaluación para el gel de monoleína	31
3.8.4 Pruebas de disolución "in vitro"	32
3.9 Diseño experimental	33

3.9.1	Inmunización parenteral	33
3.9.2	Inmunización oral	33
3.9.3	Monoleína en fase cúbica oral	34
3.9.4	Solución salina fisiológica	34
3.10	Parámetros de evaluación	34
3.10.1	Citometría de flujo	34
3.10.2	Prueba de ELISA	36
4.0	Resultados	37
4.1	Determinación de proteínas por el método de Bradford	37
4.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS	39
4.3	Titulación de las toxinas Apx	40
4.3.1	Efecto citotóxico en cultivos celulares	40
4.3.2	Ensayo de actividad hemolítica	41
4.4	Evaluación del gel de monoleato de glicerilo	42
4.4.1	Propiedades físicas del gel	42
4.4.2	Microscopia de luz polarizada	42
4.4.3	Pruebas de disolución "in vitro"	43
4.5	Evaluación del modelo experimental en ratones	46
4.5.1	Citometría de flujo	46
4.5.2	Prueba de ELISA	49
5.0	Discusión	51
6.0	Apéndice I	59
7.0	Referencias	61

RESUMEN

Se probó la capacidad del monoleato de glicerilo en fase cúbica como vehículo acarreador y protector, de las toxinas Apx I, II y III, con la finalidad de obtener un inmunógeno que administrado por vía oral proteja de la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

La monoleína, un lípido anfifílico, en presencia de altas concentraciones de agua y a la temperatura corporal da lugar la denominada fase cúbica caracterizada por la formación de una bicapa curvada que se extiende en tres dimensiones que separan así dos sistemas congruentes de canales de agua que forman un poro de aproximadamente 5 nm en donde se atrapó a las toxinas Apx.

Las toxinas Apx I, II y III se obtuvieron de los sobrenadantes de los cultivos de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *A. pleuropneumoniae*.

Se evaluó la capacidad del gel de monoleína para atrapar las toxinas Apx así como el efecto de la inclusión de estas sobre la fase cúbica mediante estudios de microscopia de luz polarizada. Se estudio la liberación de la toxina del gel utilizando pruebas de disolución *in vitro*.

El gel de monoleína fue capaz de atrapar una concentración de 400 µg/ml de antígeno sin que esto afectara la formación de la fase cúbica. Aproximadamente el 60 % de las moléculas proteicas fueron liberadas del gel en un tiempo de 4 horas.

Se observó el efecto antigénico del producto inoculado por vía oral en ratones en donde se identificaron cambios en las poblaciones celulares de linfocitos T y B mediante citometría de flujo y se buscaron anticuerpos contra el antígeno utilizando una prueba de ELISA.

Mediante la citometría de flujo se detectaron pequeños cambios en las poblaciones de linfocitos con los marcadores CD4 y CD19 que permitieron especular sobre una posible estimulación del sistema inmune por el antígeno, lo cual se confirmó con la aparición de anticuerpos en el suero de los animales identificados por la prueba de ELISA.

Los resultados obtenidos son alentadores y abren la posibilidad de desarrollar un inmunógeno que administrado por vía oral proteja a los cerdos de la infección por *A. pleuropneumoniae*.

1.0 INTRODUCCION

1.1 La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina

La pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad devastadora, altamente contagiosa y se asocia en particular con cerdos en crecimiento, posee un extraordinario interés económico que se traduce, según los casos, por los altos porcentajes de mortalidad y más importante aún, por las mermas en las producciones, alargamiento en el periodo de cebo, altos costos en medicamentos, asistencia veterinaria, etc. (26,33).

La enfermedad puede variar desde un curso hiperagudo hasta el crónico. La lesión aguda característica es una neumonía hemorrágica necrosante asociada a una pleuritis fibrinosa, mientras que la lesión crónica se distingue por un tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado (16). El microorganismo se transmite por aerosoles o contacto directo pudiendo causar la muerte de animales de cualquier edad y aquellos que sobreviven se convierten en portadores crónicos (12,16,17).

1.1.1 Agente etiológico

La bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, la cual está ampliamente distribuida en el mundo. Se trata de un microorganismo Gram negativo integrado en el género *Actinobacillus* de la familia *Pasteurellaceae* (12), son bacilos inmóviles, pleomórficos, de tamaño pequeño, anaerobios facultativos, no esporulados, encapsulados, que en los aislamientos iniciales requieren de una atmósfera con 5 % de CO₂. Entre sus características bioquímicas está la de ser ureasa positivo y fermentador de ribosa, manitol y xylosa. En la actualidad se reconoce la

existencia de dos biovariedades. La biovariedad 1 dependiente de NAD (Nicotin adenin dinucleotido) y la biovariedad 2 independiente de NAD.

Para su aislamiento primario se utiliza el agar infusión cerebro corazón (BHI) en donde el NAD puede ser proporcionado mediante una estría de una cepa nodriza a través del fenómeno conocido como satelitismo, en donde las colonias suelen ser muy pequeñas, blanquecinas, brillantes y mucoides, o bien utilizando medio suplementado con extracto de levadura en el que las colonias se observan de mayor tamaño. Basados en su serotipificación capsular se han encontrado hasta el momento 15 serotipos (13).

1.1.2 Factores de patogenicidad

Este microorganismo posee varios factores de patogenicidad, que interactúan entre ellos para producir en los cerdos susceptibles la Pleuroneumonía. Entre estos factores se encuentran:

- a) La cápsula, responsable de la especificidad del serotipo y que como en otros organismos debido a su carga negativa le confiere a la bacteria protección en contra de la fagocitosis por las células del sistema inmune del hospedador (16). Entre sus propiedades biológicas se sabe que es inerte, no tiene actividad tóxica ni actividad pirógena. Sin embargo mata al embrión de pollo y presenta actividad blastogénica linfocitaria. De gran interés resulta el hecho de que los anticuerpos generados contra la cápsula, solo protegen al animal contra la muerte, pero no contra las lesiones pulmonares y la infección crónica.
- b) El lipopolisacárido (LPS), compuesto principalmente de glucosa, galactosa, ramnosa y los aminoazúcares n-acetilglucosamina y n-acetilgalactosamina es responsable de la infiltración de células inflamatorias en la patogenia de la enfermedad (16,18). Sus propiedades biológicas son: actividad clásica de una endotoxina de Gram negativos; produce una reacción de Schwartzman

inoculado por vía intradérmica, gelifica amebocitos del género *Limulus* y actúa como pirógeno (14).

- c) Fimbrias citoadherentes permiten la adherencia de la bacteria a receptores específicos en la mucosa respiratoria del cerdo sólo se observan en modelos "in vivo " o por un tiempo muy corto en modelos " in vitro " (26).
- d) Sistemas de captación de hierro entre los que se incluyen las proteínas de membrana externa captadoras de transferrina TfbA y TfbB, así como otros mecanismos que le permiten a la bacteria obtener hierro del medio a través de agentes sideroforos (18).
- e) La producción de exotoxinas denominadas toxinas Apx las cuales presentan actividad hemolítica y citotóxica (16,18).

1.1.3 Toxinas APX

Las toxinas Apx pertenecen a la familia de toxinas RTX (Repeat in toxin). Son importantes factores de virulencia producidos por un amplio grupo de bacterias Gram negativas. Estas pertenecen a dos categorías: la hemolisina, que afecta una variedad de células y la citotoxina que afecta sólo células específicas (20).

Estas toxinas se caracterizan por estar codificadas en un operón constituido por cuatro genes designados como *rtxC*, A, B y D con base en el orden de transcripción. Para poder ser biológicamente activas éstas proteínas requieren de una modificación posterior a su traducción que se efectúa por el producto del gen *rtxC* cuya función es la de agregar una cadena de ácido graso en la proteína estructural codificada por el gen *rtxA* la cuál presenta una secuencia consenso característica de aminoácidos que se repite (27). Esta secuencia consenso es:

GGXGDXLX

(donde X puede ser cualquier aminoácido). El número de veces que este motivo se repite puede variar, desde 6 hasta 40 veces, su presencia es característica de

la familia de toxinas RTX. Las proteínas RtxB son proteínas de transporte y las proteínas RtxD pertenecen a una familia de proteínas de fusión a membrana (20). La transcripción de estos genes da lugar a la proteína RTX la cual consta de 4 subregiones: a) La región amino-terminal formadora de poros altamente hidrofóbica. b) La región en la que se da la activación biológica de la toxina debido a la unión de una cadena de ácido graso. c) La región característica con repeticiones de glicina la cual contiene el sitio de unión de calcio a la proteína. d) Por último la región carboxi-terminal en la cual se encuentra asociada la señal para su secreción (2,6,19).

La secreción de factores de virulencia en bacterias Gram negativas envuelve el transporte de la proteína a través de dos membranas para alcanzar el exterior de la célula. Cuatro principales sistemas de secreción de exotoxinas se han descrito. En los sistemas tipo II y IV, las toxinas son inicialmente exportadas al periplasma gracias a una secuencia señal N-terminal; un segundo grupo de proteínas es utilizado para el transporte extracelular (tipo II), o el extremo C-terminal de la toxina es usado para tal fin (tipo IV). El tipo III de secreción envuelve por lo menos 20 moléculas que se ensamblan en una estructura como jeringa y mediante la cuál las proteínas efectoras son transportadas después sin necesidad de una secuencia señal. En el sistema tipo I, un canal completo es formado a través de ambas membranas, y la señal de secreción es acarreada en el extremo C-terminal de la exotoxina. La familia de toxinas RTX pertenecen al sistema de secreción tipo I (2).

Aunque se sabe que la virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es multifactorial, varios estudios señalan que su virulencia esta fuertemente relacionada con la producción de las toxinas Apx. Existen cuatro tipos de toxinas Apx, el tipo I producido por los serotipos 1, 5, 9 y 11, el tipo II producido por prácticamente todos los serotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12) y el tipo III producido por los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8, todos los serotipos producen al menos un tipo de toxina y en ocasiones varios, siendo los serotipos productores de Apx I,

junto con Apx II los más virulentos (23,30). Recientemente se ha clonado, secuenciado y caracterizado la Apx-IV, una nueva Apx cuyo conocimiento es, todavía escaso. Sólo se produce *in vivo*, por lo que pueden detectarse anticuerpos en el suero de convalecientes y se desconoce su relación con la patogenicidad (36).

Apx I es una proteína con un peso molecular de 105 kDa. Que muestra las características típicas de una toxina perteneciente a la familia RTX, incluyendo un dominio fuertemente hidrofóbico y 13 repeticiones de un péptido rico en glicina. Es fuertemente hemolítica y ligeramente citotóxica, y presenta una elevada similitud con la hemolisina de *Escherichia coli* HlyA. Apx II es una toxina RTX con un peso molecular de 103 kDa, que tiene los dominios típicos de una toxina RTX pero sólo 8 repeticiones de péptidos ricos en glicina. Es ligeramente hemolítica y ligeramente citotóxica. Inmunológicamente diferente a Apx I, presenta una fuerte similitud con la leucotoxina Lkt de *Pasteurella hemolitica*. Apx III tiene un peso molecular de 120 kDa. y una estructura RTX con 13 repeticiones ricas en glicina, presenta una notable semejanza en su secuencia de aminoácidos con Apx I y HlyA. Es sin embargo, no hemolítica pero fuertemente citotóxica y produce junto con la esfingomielinasa de *Staphylococcus aureus* una cohemólisis conocida como la reacción de CAMP (2,23) La toxina Apx IV proviene de la expresión del gen *apx IV*, del que se han descrito dos variantes presentes, respectivamente, en los serotipos 1 y 3, que ya han sido clonados, secuenciados y expresados en *E. coli*. La Apx IV recombinante es débilmente hemolítica y produce CAMP con *S. aureus*. Solo se produce *in vivo* y presenta un peso molecular de 202 kDa, con 24 repeticiones ricas en glicina. Se detecta en todos los serotipos y parece ser específica de especie.

En la pleuroneumonía porcina la actividad de las toxinas Apx es probablemente la responsable de las lesiones iniciales, caracterizadas por ser hemorrágicas y necróticas.

1.1.4. Epidemiología

La aparición y difusión de la Pleuroneumonía Porcina es muy rápida, especialmente si son grupos de cerdos sin historial de infecciones de este tipo. Sus efectos pueden llegar a producir muertes de animales sin estos presentar signo alguno.

El cerdo constituye el huésped exclusivo del *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La transmisión de la bacteria puede producirse de manera indirecta, también puede darse de manera directa, cuando al recinto porcino penetra algún animal previamente infectado o portador de la bacteria. Por eso es muy importante el traslado de animales y la vigilancia en cuanto al ingreso desde otras localidades o explotaciones porcinas.

En la forma indirecta se pueden enumerar las herramientas de trabajo, la vestimenta de los trabajadores y todo aquel personal que entre en contacto directo o muy cercano con los cerdos, porque la vía aérea es una de las modalidades de transmisión probadas

La Infección subclínica, en ausencia de lesiones en los pulmones, es lo más peligroso de esta enfermedad. Muchas granjas están infectadas, pero el equilibrio inmunológico y un manejo adecuado impiden la eclosión de los signos clínicos. Esto trae principalmente dos problemas: 1) Pueden aparecer de forma explosiva casos agudos de la enfermedad frente a cambios que pueden favorecer a los factores predisponentes; 2) Los lechones de destete que provienen de maternidades infectadas son probablemente portadores de la bacteria. La mezcla de esos animales con otros provenientes de granjas libres del microorganismo puede ocasionar también la aparición de la enfermedad clínica. La introducción de reproductores infectados en maternidades libres de App, puede también ser responsable de la introducción de la infección en dicha granja y de la aparición de signos clínicos en el engorde (sistema de producción continuo).

Cuando se tienen diferentes grupos de cerdos, donde hay madres con partos en fechas simultáneas, agrupar luego del destete puede ser altamente peligroso, ya que un lechón infectado podría contaminar fácilmente al resto del grupo, por lo que

la supervisión y examen a este nivel es de gran importancia para la salud de todo el conglomerado. Esto va a influir de manera muy favorable en menores grado de morbilidad y mortalidad, en caso de presentarse la enfermedad (24).

1.1.5. Diagnóstico de la enfermedad

Para el diagnóstico de la Pleuroneumonía Porcina se emplean varios métodos, los más importantes son :

a) Diagnóstico clínico

Observación de los síntomas en el cerdo:

Dificultad respiratoria.

Eventuales descargas por nariz y boca, de aspecto espumoso y con presencia de sangre.

Temperaturas muy altas, que pueden sobrepasar los 40 °C

Disturbios nerviosos que provocan falta de apetito o inapetencia.

Emaciación (adelgazamiento extremo con agotamiento pronunciado).

b) Diagnóstico histopatológico

Observación de las lesiones a la necropsia de animales muertos. Lesiones características en pleura con adherencias engrosadas y purulentas.

c) Diagnóstico bacteriológico

Aislamiento y tipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de muestras de pulmones de animales enfermos.

d) Diagnóstico serológico

Pruebas basadas en la identificación de anticuerpos en el suero de los animales

Dentro de las cuales se encuentra la prueba de ELISA y aglutinación en placa (neumotest)(26).

1.1.6 Control de la enfermedad

1.1.6.1 Quimioterapia

Para el control de la PCP se han utilizado una variedad de antibióticos, entre los cuales están las Penicilinas, Tetraciclinas, Sulfonamidas, Eritromicina, Estreptomina y antibióticos nuevos como la Tiamulina, Spectomicina, Ceftriaxona y a últimas fechas la Ketasomicina, así como quinolonas de primera generación (26). Debido a que los animales se encuentran anoréxicos durante el curso de la enfermedad el tratamiento con antibióticos orales tiene poca utilidad, aquellos que se utilizan por vía intramuscular han demostrado ser los más efectivos para el tratamiento de la enfermedad (26).

1.1.6.2 Inmunización

Las vacunas que se fabricaron inicialmente contra la pleuroneumonía frecuentemente fallaban al tratar de conferir protección suficiente contra la enfermedad además de ser útiles solo contra el serotipo específico para el cual eran preparadas. La mayoría consistía de células bacterianas completas inactivadas con calor o formaldehído. Estas reducen la mortalidad, pero no previenen la infección inicial y el desarrollo del estado de portador (6). En la actualidad existe ya otro tipo de vacunas en el mercado que combinan bacterinas y toxoides como la vacuna Ingelvac APPX o bien como la vacuna subunitaria producida por Intervet, que se han utilizado con mejores resultados, sin embargo, estas siguen utilizando la vía de administración intramuscular o subcutánea lo cual implica la necesidad de personal especializado para su aplicación y pueden además ocasionar daños al tejido del animal. El desarrollo de métodos de inmunización oral podría por tanto ser de suma importancia para el control de esta enfermedad (18,28).

1.1.6.3 Manejo de los animales

Un manejo adecuado de los animales dentro de la granja puede impedir la aparición de la enfermedad. La vigilancia durante el traslado de los animales así como los cuidados relacionados con la vestimenta y herramientas de los trabajadores podría evitar la transmisión indirecta de la enfermedad. De igual forma el control adecuado de todos los ingresos reduciría la posibilidad de introducir animales previamente infectados o portadores (24).

1.2 Producto Farmacéutico con actividad de Acarreador.

1.2.1 Acarreadores lipídicos

Un acarreador es una matriz utilizada en preparaciones de liberación controlada de principios activos. Consiste en un sistema en el cual un principio activo se encuentra homogéneamente disperso en un material que generalmente es de naturaleza polimérica. La carbóximetilcelulosa, hidróxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, alcohol polivinílico y polietilenglicol son algunos de los más comunes polímeros utilizados como acarreadores de principios activos (11).

Los lípidos han recibido una considerable atención como alternativos a los polímeros acarreadores o materiales de recubrimiento en el desarrollo de sistemas de transporte y protección para fármacos. Las mayores ventajas de los lípidos contra los polímeros incluyen: su baja temperatura de fusión, lo que evita el uso de solventes orgánicos para solubilización, la ausencia de impurezas tóxicas como monómeros residuales, catalizadores e iniciadores, así como su potencial biocompatibilidad y biodegradabilidad (4).

1.2.2. Monoleato de glicerilo

El monoleato de glicerilo o monoleína, una molécula utilizada desde los años cincuenta como emulsificante y aditivo de algunos alimentos, ha despertado un gran interés en la industria farmacéutica en los últimos años por sus características de baja toxicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad. Se trata de una mezcla de glicéridos de ácido oleico y otros ácidos grasos que por su estructura molecular presenta tanto características polares como hidrofóbicas (4,7,22).

1.2.3. Lípidos polares y fases de transición

Los lípidos polares son moléculas anfifílicas, esto es que una parte de su estructura es compatible con sistemas acuosos mientras que la otra parte no lo es. De tal forma, cuando son colocados en soluciones acuosas se asocian de una u otra manera formando diferentes tipos de agregados. Tal vez la forma de agregado más conocida es la forma micelar, esta consiste de 50-100 moléculas lipídicas arregladas de manera que sus colas de hidrocarburos (parte hidrofóbica) forman el interior de la micela, y sus cabezas polares (parte hidrofílica) actúan como un escudo en contra del sistema acuoso que las rodea.

La forma micelar, es sólo una de los muchos tipos de agregados que se pueden formar. Es posible encontrar otras formas como la micelar inversa, hexagonal y hexagonal inversa, lamelar y la denominada fase cúbica la cuál toma su nombre del hecho de que en estudios de difracción de rayos X el patrón observado revela una simetría cúbica (4,21).

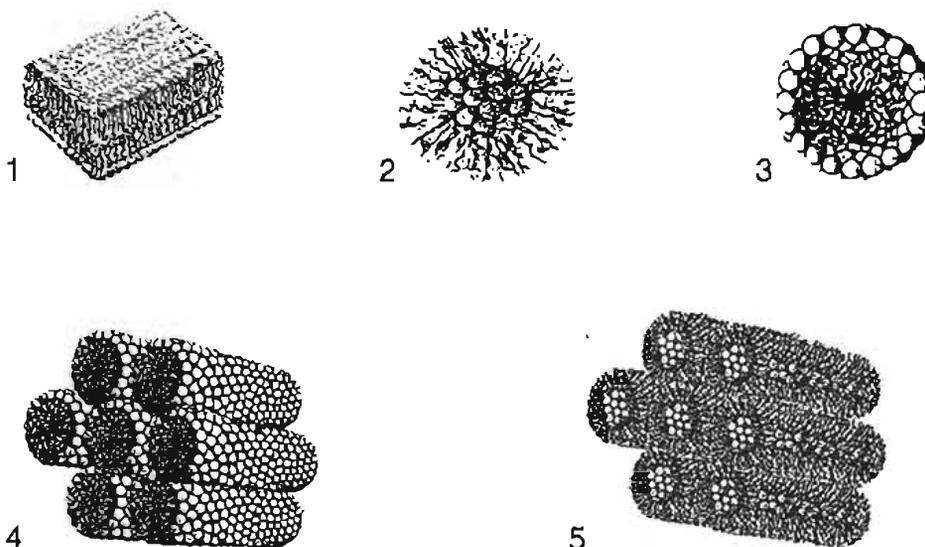


Figura 1. Estructuras de agregación de moléculas anfifílicas. 1) Bicapas lineares (lamelar, $L\alpha$) 2) Micelas esféricas ($L1$), 3) Micelas inversas ($L2$), 4) Micelas cilíndricas (hexagonal, $H1$) y 5) Micelas cilíndricas inversas.

Los lípidos anfifílicos forman al contacto con el agua fases de transición que resulta en la existencia de estados intermediarios denominados mesofases o fases de cristales líquidos, los cuáles son dependientes de las propiedades estructurales del lípido, el contenido de agua y la temperatura. (4,8)

1.2.4 Fase cúbica de la monoleína

Si se agrega una pequeña cantidad de agua a la monoleína a 37° centígrados se observa la fase de cristal líquido micelar inversa. Conforme el contenido de agua aumenta diferentes fases se forman. Figura (2).

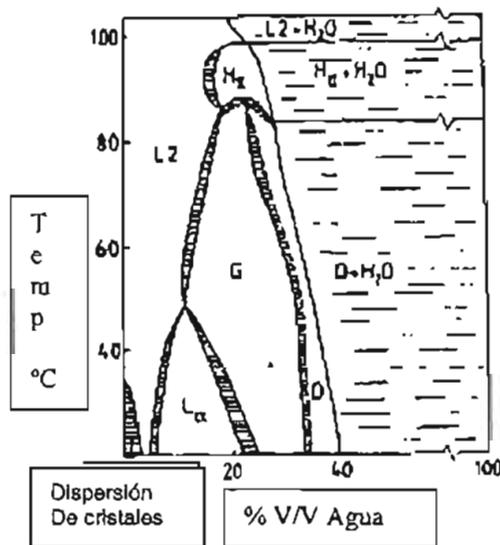


Figura 2. Diagrama de fases de la monoleína con respecto a la temperatura y el contenido de agua. A 37 °C y una cantidad de agua pequeña, la monoleína forma la fase micelar inversa (L2) caracterizada por una textura aceitosa. Agregando más agua, se forma un sistema tipo mucoide que corresponde a la fase lamelar (L α). Una larga región de fase isotrópica prevalece cuando más agua es agregada al sistema. Esta fase es conocida como fase cúbica (G) y es caracterizada por una alta viscosidad.

En presencia de un exceso de agua, el sistema forma un gel viscoso conocido como fase cúbica, que a nivel molecular consiste de una bicapa curvada que se extiende en tres dimensiones que separan así dos sistemas congruentes de canales de agua que forman un poro de aproximadamente 5 nm. (11,35) Figura (3).

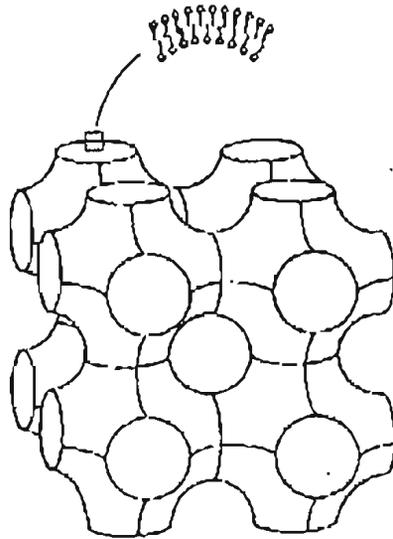


Figura 3. Forma esquemática de la fase cúbica del monooleato de glicerilo. Bicapa curvada que se extiende en tres dimensiones formando un sistema congruente de canales acuosos.

Estas características permitirían a la monooleína funcionar como un sistema de acarreo y protección para moléculas proteicas que sería administrado por vía oral (5,9).

El mecanismo para la liberación de moléculas proteicas atrapadas en el sistema de canales de la fase cúbica es el intercambio disfuncional de agua del medio externo con la matriz, con el consecuente intercambio de agua y moléculas proteicas del interior hacia el medio exterior (22,35).

1.2.5 Luz polarizada y la fase cúbica de la monoleína

La energía luminosa se traslada con un movimiento ondulatorio transversal en el cual la vibración de las partículas es usualmente perpendicular a la dirección en la que la energía se desplaza (a). Así, la luz ordinaria (no polarizada) se considera que vibra en numerosas direcciones, todas ellas formando ángulo recto con la dirección del rayo luminoso.

Se denomina luz polarizada plana a aquella cuyas vibraciones están restringidas a una única dirección en el espacio (b). Los materiales o aparatos que convierten la luz ordinaria en luz plano-polarizada se denominan en general polarizadores. La luz incidente plano-polarizada (las partículas vibran exclusivamente en un plano) se refracta en la sustancia siguiendo la ley de Snell. Al incidir la luz en una sustancia cristalina anisótropa, y, por tanto, birrefringente, ésta se divide en un rayo ordinario, cuyo camino sigue la Ley de Snell, y en un rayo extraordinario polarizado a 90° del primero y cuyo recorrido no se rige por la Ley de Snell.

El comportamiento de la luz al introducirse en un cristal está controlado fundamentalmente por la estructura cristalina. En este sentido la propiedad más importante de un cristal es el índice de refracción (n), que se determina con respecto al del aire.

El índice de refracción del aire (V_v / V) a presión del nivel del mar es 1,00029 indicando que la velocidad de la luz en el aire es débilmente menor que su velocidad en el vacío. Normalmente este valor se iguala a 1 y todos los valores de índices de refracción de los cristales serán superiores a este valor ya que la luz disminuye su velocidad cuando entra en ellos.

La relación entre las trayectorias del rayo incidente y del rayo refractado fueron determinadas por la Ley de Snell

$$n_i \cdot \text{sen } i = n_r \cdot \text{sen } r$$

Siendo n_i y n_r los índices de refracción de cada medio y $\text{sen } i$ y $\text{sen } r$ los senos de los ángulos de incidencia y de refracción con la normal.

Así, la trayectoria de la luz durante este proceso de refracción originado al cambiar de medio (ej. aire/cristal) queda determinado por la Ley de Snell, con $n_i = 1$ (aire):

$$n_r = \text{sen } i / \text{sen } r$$

Sin embargo, el índice de refracción de un cristal no es necesariamente el mismo en todas las direcciones. La simetría interna de un cristal es un reflejo de la orientación de los átomos y esto determinará la interacción de la luz con el cristal.

Así, se reconocen dos tipos básicos de comportamiento óptico:

a) ISÓTROPO - igual índice de refracción en todas las direcciones. En esta categoría se encuentran los materiales vítreos y los cristales isométricos.

b) ANISÓTROPO - diferente índice de refracción en diferentes direcciones cristalográficas. Los cristales de todos los demás sistemas pertenecen a esta categoría (31).

Todos los cristales del sistema cúbico son ópticamente isótropos; el índice de refracción es único e independiente de la dirección de incidencia de la luz, y sus características ópticas son similares a las del vidrio. Todos los cristales no cúbicos, es decir, los anisótropos presentan una dependencia respecto a la dirección de su interacción con la luz, de forma que presentan diferentes índices de refracción (8).

Si colocamos un material cristalino entre dos lentes polarizados orientados de manera que el segundo lente detiene el rayo de luz polarizado por el primer lente podremos saber si el material es isótropo o anisótropo en base a si este desvía o no el rayo de luz polarizada. Así los materiales anisótropos desviarán el rayo de

luz polarizada permitiendo observar en el campo de observación del microscopio estructuras de tipo cristalino, mientras que los materiales isotrópicos al no desviar el rayo de luz polarizada se observan como un campo visual en completa oscuridad en el microscopio de luz polarizada.

Estas características permiten utilizar la microscopía de luz polarizada como un elemento importante para poder identificar la formación de la fase cubica de la monolefina así como determinar el efecto que pueda tener la inclusión de material proteico en el poro acuoso que esta fase presenta.

1.3 Justificación

Pocas enfermedades progresan tan rápidamente como la Pleuroneumonía Porcina, la muerte puede presentarse dentro de las cuatro primeras horas desde que aparecen los primeros signos clínicos. En la actualidad los intentos por controlar este padecimiento a través del uso de antibióticos y vacunas han resultado ser frustrantes, muy caros e insatisfactorios. La adición de los antibióticos al alimento es de poco valor en un brote de Pleuroneumonía, ya que los animales están anoréxicos, además de que es difícil dar una dosis terapéutica que contenga la concentración que el microorganismo requiere para ser eliminado, por lo que una medida preventiva por esta vía no protege contra la infección, sólo se puede reducir la severidad de la enfermedad. Los tratamientos con antibióticos parenterales han demostrado ser los más efectivos en los brotes de la enfermedad, sin embargo, el costo de los mismos es alto y no confieren protección (18,34).

Las vacunas que se fabricaron inicialmente contra la pleuroneumonía frecuentemente fallaban al tratar de conferir protección suficiente contra la enfermedad además de ser útiles solo contra el serotipo específico para el cual eran preparadas. La mayoría consistía de células bacterianas completas inactivadas con calor o formaldehído. Estas reducen la mortalidad pero no previenen la infección inicial y el desarrollo al estado de portador (6). En la actualidad existe ya otro tipo de vacunas en el mercado que combinan bacterinas y toxoides como la vacuna Ingelvac APPX o bien como la vacuna subunitaria producida por Intervet, sin embargo, estas siguen utilizando la vía de administración intramuscular o subcutánea. El desarrollo de métodos de

inmunización por vía oral utilizando sistemas de acarreo y protección podría por tanto ser de suma importancia para el control de esta enfermedad (18,28).

En contraste con vacunas elaboradas con cápsulas o bacterinas, la infección natural o experimental con cepas virulentas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* generalmente confiere protección contra la reinfección con cualquier serotipo, lo que implica la existencia de antígenos protectores producidos por el microorganismo “ *in vivo* ”(10). Debido a que la virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* esta fuertemente relacionada con la producción de exotoxinas Apx, es factible pensar que éstas proteínas funcionan como antígenos protectores contra la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (15). Por lo que se puede especular que su uso como inmunogenos sea útil si se cuenta con un sistema de acarreo y protección adecuado que permita presentar estos antígenos en los sitios de reconocimiento inmunológico del animal (15).

1.4 Hipótesis

El monoleato de glicerilo en fase cubica es capaz de proteger y acarrear las toxinas Apx I, II y III administradas por vía oral hasta los sitios de reconocimiento inmunológico del intestino del animal, funcionando así como una vacuna oral que puede prevenir la Pleuroneumonia Porcina.

2.0 OBJETIVO GENERAL

Estudiar un gel a base de monoleato de glicerilo como vehículo acarreador y protector para las toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que será utilizado como una posible vacuna para el control de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las toxinas Apx I, II y III de *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- Enriquecer los sobrenadantes que contienen las toxinas Apx I, II y III mediante filtración tangencial y liofilización
- Evaluar la formación de la fase cúbica del monoleato de glicerilo mediante microscopía de luz polarizada
- Optimizar una técnica de atrapamiento de toxinas de *Actinobacillus* usando monoleína en fase cúbica como acarreador y protector.
- Evaluar la capacidad antigénica “*in vivo*” e “*in vitro*” del sistema propuesto en relación con otras preparaciones.

3.0 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1 Cepa Bacteriana

Se utilizaron los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de cepas de campo para la producción de sobrenadantes enriquecidos con exotoxinas Apx que fueron inactivados con formaldehído.

3.1.2 Obtención de la semilla

Cultivo de serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Para su conservación las cepas bacterianas se mantuvieron en viales con caldo infusión cerebro corazón (BHI) adicionado de Skim Milk al 15 %, en un criocontenedor con nitrógeno líquido a -196 °C, después de descongelar a temperatura ambiente, las cepas bacterianas se sembraron en agar infusión cerebro corazón con una estría de una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, que proporcione el NAD (Nicotin adenin dinucleotido) necesario para su desarrollo, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

3.1.3 Obtención de sobrenadantes ricos en toxinas Apx.

Del crecimiento inicial se tomaron varias colonias que se sembraron para su crecimiento masivo en agar PPLO adicionado de extracto de levadura al 20 %. Este crecimiento masivo se utilizó para inocular 250 ml de caldo BHI adicionado de extracto de levadura al 20 %. Se incubo a 37 °C, con agitación en un baño de agua durante 24 hrs. Con este crecimiento se inoculó un garrafón con 10 litros de caldo BHI con extracto de levadura al 20 % el cuál se incubo a 37 °C. durante 12 hrs. para evitar la destrucción de las toxinas Apx por la acción de las proteasas (1).

3.2 Inactivación con formaldehído

Al crecimiento de 12 hrs. se le adicionó formaldehído hasta obtener una concentración final de 0.5 % esto se llevó a temperatura ambiente.

3.3 Filtración

- Se eliminó la biomasa por centrifugación a 5000 RPM durante 30 minutos, conservando el sobrenadante.
- La filtración del sobrenadante se realizó con una membrana de $0.22\ \mu\text{m}$ para tratar de eliminar los restos de cuerpo bacteriano.
- Filtración de flujo tangencial con membrana de 100 kDa. En la filtración tangencial el flujo del fluido no se dirige en forma directa contra el filtro, se dirige como se muestra en la figura No.3 de manera tangencial, evitando que el filtro se sature y permitiendo además tener un proceso alterno de concentración (Equipo de filtración tangencial millipore/filtros pellicon).

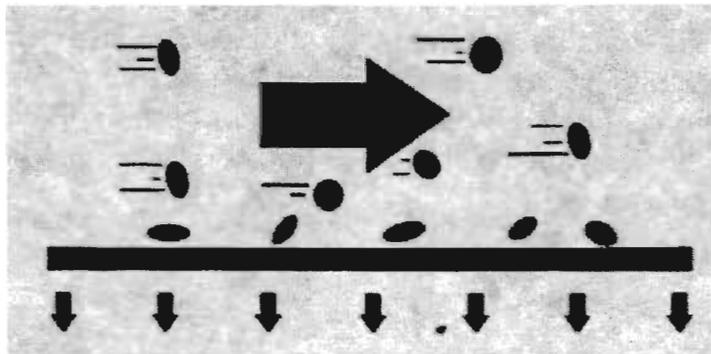


Figura No.4 Filtración de flujo tangencial. La flecha más grande indica la dirección del flujo del fluido, esto evita la saturación de la membrana ya que las partículas de mayor tamaño son arrastradas por el flujo evitando acumularse en la superficie del filtro, las flechas pequeñas indican como las moléculas de menor tamaño atraviesan la membrana para poder ser recolectadas.

Después de la filtración de flujo tangencial el sobrenadante quedo dividido en dos fracciones, un sobrenadante retenido que contuvo las moléculas de un peso mayor a 100 kDa en donde se encuentran las toxinas Apx. Cuyos pesos moleculares son de 103 kDa para Apx I 105 kDa para Apx II y 120 kDa para Apx III y un sobrenadante permeado que contiene las moléculas con un peso menor, que fue utilizado sólo como control en posteriores procedimientos.

3.4 Concentración por liofilización

El sobrenadante retenido se sometio a liofilización para concentrar las toxinas Apx. Se liofilizaron 100 ml de sobrenadante retenido de cada serotipo bacteriano resuspendiendo el polvo obtenido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

3.5 Determinación de proteínas por el método de Bradford

El método de Bradford es una prueba rápida y bastante sensible para la cuantificación de proteínas. Esta basada en la observación de que el colorante azul de Coomasie G-250 existe en dos formas coloridas diferentes, rojo y azul. La forma roja es convertida en azul tras la unión del colorante a proteínas. El complejo proteína-colorante tiene un elevado coeficiente de extinción lo que lleva a una gran sensibilidad en la determinación de proteínas. La unión del colorante a la proteína es un proceso muy rápido, aproximadamente 2 minutos, y el complejo colorante-proteína permanece estable en solución por un tiempo relativamente largo, aproximadamente 60 minutos, lo que hace de la técnica un procedimiento rápido y que no requiere de un tiempo crítico para su medición (3).

Para la determinación de proteínas por el método de Bradford se preparó una curva de calibración utilizando los reactivos en las cantidades que se incluyen en la tabla No.1.

TUBO	0	1	2	3	4	5	6
Solución estándar de albúmina 0.01% en microlitros	--	10	20	40	60	80	100
Agua desionizada En microlitros	100	90	80	60	40	20	--
Reactivo de Bradford En microlitros	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentración de Proteínas µg/ml	0	1	2	4	6	8	10

Tabla No.1 Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

Para los problemas se utilizaron 100 µl del sobrenadante y se le adicionaron 1000 µl del reactivo de Bradford.

A continuación los tubos se dejaron en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 595 nm.

3.6 Electroforésis en gel de poliacrilamida.

La electroforésis es un método analítico-semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos negativo y positivo), dependiendo de una combinación de su carga, peso molecular. La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforésis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible.

3.6.1 Preparación del gel de poliacrilamida

- Preparación de un gel tapón
- Preparación del gel de separación (la mezcla se vertió rápidamente a la cámara de electroforésis guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización), se agregó alcohol isopropílico sobre el gel y se retiró cuando ocurrió la polimerización, se enjuagó con agua desionizada para eliminar el exceso de alcohol y se secó con papel filtro. El gel de separación se preparó a una concentración de 10 %.
- Preparación el gel de condensación (se adicionó sobre el gel de separación con cuidado y rapidez, guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización), se colocó un peine el cual se retiró cuando el gel se polimerizó.

Los geles tapón, de separación y de condensación se prepararon de acuerdo a la tabla No.2

		Gel de separación				Gel de condensación
		12%	10%	7.5%	5.0%	
Agua destilada (ml)	----	3.35	4.05	4.85	5.68	6.1
Tris-HCl,pH 8.8 (ml)	1.0	2.50	2.50	2.50	2.50	----
Tris-HCl,pH 6.8 (ml)	----	----	----	----	----	2.5
SDS 10 % (μl)	100	100	100	100	100	100
Acrilamida-Bis (ml)	2.0	4.0	3.3	2.5	1.67	1.3
Persulfato de amonio 10% (μl)	50	50	50	50	50	50
TEMED (μl)	5	5	5	5	5	5

Tabla No.2 Preparación de geles de poliacrilamida-SDS. La concentración del gel de separación se selecciona en base al tamaño de las biomoléculas que se quieren identificar. Se utilizó una concentración del 10 %.

3.6.2 Preparación de las muestras para electroforésis

Las muestras de los sobrenadantes liofilizados y resuspendidos de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de App se diluyeron 1:4 con solución digestora y se colocaron en ebullición durante 4 minutos.

3.6.3 Corrimiento electroforético

Se colocaron 25 μ l de las muestras diluidas en los pozos formados en el gel, además de las muestras se corrió en un pozo un marcador de peso molecular. La corriente se fijó a 100 V y se trabajó a temperatura ambiente hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) llegó al extremo final del gel de corrimiento.

3.6.4 Tinción de proteínas en el gel de poliacrilamida-SDS

Se separó el gel del vidrio y la placa que sirvieron como molde para formarlo y se sumergió en solución teñidora de 1 a 24 hrs.

Después del tiempo requerido para la tinción de las proteínas, el gel fue sumergido en la solución desteñidora I, 2 horas con agitación ligera, por último el gel se transfirió a la solución desteñidora II.

3.7 Dosificación de la toxina

Para establecer la concentración adecuada de toxinas que se utilizaron como antígeno se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en cultivo celular y pruebas de actividad hemolítica, en ambos ensayos se utilizaron sobrenadantes no inactivados con formaldehído que permitieron observar la actividad biológica (hemolítica y citotóxica) de las toxinas.

3.7.1 Ensayo de citotoxicidad en cultivos celulares.

Los cultivos celulares utilizados fueron las líneas celulares PK-15 y VERO. Se preparó una microplaca para cada tipo de línea celular hasta tener una confluencia del 90 % en medio RPMI las cuales fueron inoculadas con 100 µl de diferentes concentraciones de proteínas (100, 200, 300, 400, 500 y 600 µg/ml) de cada serotipo bacteriano. El efecto citopático de la toxina sobre los cultivos celulares fue el criterio utilizado para obtener la concentración de proteína que fue atrapada en el gel de monoleato de glicerilo. La lectura se realizó a los 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 24 horas posterior a la inoculación.

3.7.2 Prueba de actividad hemolítica

La actividad hemolítica de los sobrenadantes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se determinó utilizando eritrocitos de oveja en amortiguador TS (Tris 10 mM, NaCl 0.8 %, pH7.5) 1 ml de sobrenadantes filtrados con una concentración inicial de 1000 µg/ml o diluciones de los mismos en amortiguador TS con concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 y 3.9 µg/ml se mezclaron con 1 ml de eritrocitos de oveja al 1 %. Se añadió CaCl₂ a una concentración final de 10 mM. se incubó durante 2 horas a 37 °C, los eritrocitos no lisados fueron removidos después de centrifugar a 2,500 rpm durante 5 minutos y la cantidad de hemolisis se midió finalmente determinando la absorbancia de las muestras a 540 nm. (1). Como control negativo se utilizó un tubo sin adición de sobrenadantes y como control positivo se utilizó un tubo al que se agregó 1 ml de agua destilada. La absorbancia del tubo control positivo se tomó como el 100 % de la hemolisis.

3.8 Preparación del gel de monoleína acarreador de la toxinas Apx.

Se obtuvo un gel sintético en base a monoleato de glicerilo y la toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para ser administrado por vía oral.

3.8.1 Preparación del antígeno

La manera de asegurar que en la mezcla de sobrenadantes se obtuvieran concentraciones adecuadas de las toxinas que presentan una mayor actividad hemolítica y citotóxica, Apx I y Apx III respectivamente se utilizaron los sobrenadantes de cada serotipo en las siguientes proporciones:

Serotipo 1 (Apx I y II)	40 %
Serotipo 3 (Apx II y III)	40 %
Serotipo 5 (Apx I y II)	10 %
Serotipo 7 (Apx II)	10 %

3.8.2 Obtención del gel

Una solución acuosa conteniendo 400 µg de toxinas Apx en un volumen de 300 µl se agregó sobre 700 mg de monoleína contenida en tubos Eppendorf y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se permitió que la mezcla entrara en equilibrio a temperatura ambiente durante 24 hrs.

3.8.3 Evaluación para el gel de monoleína

La fase cúbica de la monoleína se obtuvo inicialmente utilizando 300 µl de solución amortiguadora de fosfatos y 700 mg de monoleína.

El efecto de la inclusión de las toxinas Apx sobre la fase cúbica de la monoleína fue evaluado por microscopía de luz polarizada así como por la observación visual del gel formado. La disponibilidad de las toxinas fue seguida en pruebas de

disolución *"in vitro"* determinando el contenido de proteínas por el método de Bradford.

3.8.4 Pruebas de disolución *"in vitro"*

Para poder establecer si las toxinas fueron liberadas por el gel de monoleína se efectuaron pruebas de disolución *"in vitro"*. Para tal fin se utilizaron celdas que separan la muestra de la solución de disolución mediante una membrana. Inicialmente se identificó que tipo de membrana podría ser utilizada en el ensayo de manera que esta interfiriera lo menos posible con los resultados. Se colocaron entonces 200 µg del antígeno en las celdas de disolución utilizando tres tipos de membrana diferentes. Las membranas utilizadas fueron:

- a) Filtro Millipore 0.22 µm.
- b) Filtro Millipore 0.45 µm.
- c) Papel filtro Whatman No.5

Posteriormente se añadieron 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos a cada celda y se colocaron en un baño de agua a 37 °C con agitación individual. Se tomaron muestras a los 15, 30, 45, 60, y 75 minutos y se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Una vez establecida la membrana que fue utilizada (papel filtro Whatman) se procedió de igual forma con una muestra de gel de monoleína en fase cúbica conteniendo 200 µg del antígeno de toxinas Apx. En esta ocasión se tomaron muestras a los 30, 60, 90, 120 minutos, 4, 8 y 24 horas, midiendo una vez más la concentración de proteínas que fueron liberadas a la mezcla de disolución.

3.9 Diseño experimental

Grupos	Inmunización Parenteral	Inmunización Oral	Monoleína en fase cubica Oral	S.S.F. Oral
-A- Control (+)	+	-----	-----	-----
-B- Control (-)	-----	-----	-----	+
-C- Control del gel	-----	-----	+	-----
-D- Grupo de Ensayo	-----	+	-----	-----

Para el modelo animal se utilizaron 20 ratones macho CD1 de aproximadamente 15 g de peso divididos en cuatro grupos de 5 animales cada uno.

3.9.1 Inmunización parenteral.

Para la inmunización parenteral se utilizó la vacuna Ingelvac APPX por vía intramuscular (Bacterina-Toxoide contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cultivo de serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 7 y toxoide Apx I, Apx II y Apx III. Inactivado químicamente. Hidróxido de aluminio como adyuvante. Este grupo se utilizó como control positivo. La inoculación se realizó en los días 0,7 y 14.

3.9.2 Inmunización oral

Se utilizó monoleína en fase cúbica conteniendo 400 µg. del antígeno la cuál se mezcló con el alimento. Los animales se mantuvieron en contenedores

individuales para asegurar que recibieran la dosis correcta del antígeno. Este grupo será el grupo de ensayo. De igual forma el antígeno por vía oral se administró los días 0, 7 y 14 del ensayo.

3.9.3 Monoleina en fase cúbica oral

Un grupo de animales recibió el gel de monoleina sin el antígeno para establecer si el vehículo afecta de alguna manera los resultados. La monoleina en fase cúbica se administró los días 0, 7 y 14 del ensayo.

3.9.4 Solución salina fisiológica

Como control negativo se utilizó un grupo de animales al cuál sólo se le administró solución salina fisiológica también mezclada con el alimento.

Todos los animales fueron sacrificados el día 28 obteniendo muestras de sangre y de tejido (bazo) de cada uno de ellos.

3.10 Parametros de evaluación

Para evaluar la respuesta inmune celular y humoral de los animales al antígeno probado se utilizó la citometría de flujo y el ensayo de ELISA.

3.10.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo nos permite observar los cambios en las poblaciones de células marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos. Los marcadores utilizados fueron:

anticuerpos anti-CD 3, anticuerpos anti-CD 4, anticuerpos anti-CD 8 y anticuerpos anti-CD 19.

Se denominan antígenos de diferenciación (antígenos CD) a un conjunto de glucoproteínas que aparecen paulatinamente sobre la membrana de las células sanguíneas y endoteliales a medida que avanza su maduración o cuando se activan algunas de sus funciones, los antígenos CD reciben ese nombre porque su producción y su expresión sobre la membrana varían según el grado de diferenciación que ha alcanzado cada célula, la identificación de los antígenos CD permite clasificar todas las células que derivan del tejido hematopoyético pero principalmente a las células del sistema inmunitario, según la etapa de maduración en que se encuentre, el linaje al que pertenece o la condición fisiológica (reposo y/o actividad) que tienen en un momento dado (32).

El complejo CD 3 formado por 3 cadenas polipeptídicas cortas llamadas gamma, delta y epsilon se encuentra asociado al TCR (receptor de células T) por lo tanto su identificación se relaciona con la presencia de linfocitos T. El antígeno CD 4 es una molécula compuesta por una sola cadena polipeptídica de 55 kDa que se encuentra glucosilada y está anclada a la membrana de los linfocitos T cooperadores. Los linfocitos T cooperadores modulan la respuesta inmunitaria tanto celular o citotóxica como la producción de anticuerpos o respuesta humoral. El antígeno CD 8 es un heterodímero compuesto por 2 cadenas peptídicas, alfa y beta, que están unidas entre sí por un puente disulfuro y que se encuentran ancladas a la membrana de los linfocitos T citotóxicos.

Los antígenos de diferenciación CD 19 corresponden a proteínas que están en la membrana de linfocitos B, desde que estos son células inmaduras que todavía no abandonan el tejido hematopoyético de la médula ósea. Por esta razón han sido utilizados como marcadores de membrana para identificar a los linfocitos B.

Para la citometría de flujo se tomaron muestras de sangre y tejido de todos los animales. La sangre se obtuvo por punción cardíaca y se trató con EDTA para evitar su coagulación. El tejido utilizado fue el bazo del cual se obtuvo una suspensión celular conteniendo entre 200 y 250,000 células/ml. Una vez extirpado el bazo este se pasó a través de una malla para obtener así células individuales que se lavaron tres veces con solución salina fisiológica y resuspendieron posteriormente en medio de cultivo RPMI. Para ajustar el número de células, estas

se contaron en una cámara de Newbauer utilizando un colorante vital (azul de Tripán).

30µl de cada muestra se incubaran 30 minutos con 5 µl del anticuerpo monoclonal marcado. A continuación se agregaron 200 µl de solución de lisis, se agito y se incubó durante 10 minutos en obscuridad. Por último se hicieron tres lavados con solución salina fisiológica que fue desechada tras el último lavado resuspendiendo el paquete celular en 500 µl de paraformaldehido al 4 % manteniendo la suspensión en refrigeración hasta su lectura en el citómetro de flujo (25,29).

3.10.2 Prueba de ELISA

La técnica de ELISA es una prueba inmunoenzimática que forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar una reacción antígeno-anticuerpo. La ELISA utilizada en este estudio fue una ELISA indirecta que básicamente consiste en la inmovilización a un soporte sólido del antígeno contra el cual queremos detectar anticuerpos específicos..

Para pegar el antígeno se diluyó este a una concentración de 10 µg/ml utilizando solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.5. Se colocaron 100 µl de esta solución a cada pozo de la placa de ELISA, incubando durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó tres veces con 300 µl de una solución amortiguadora PBS/Twen-20 0.05% y se bloqueó durante 1 hora con skim-milk al 5 %. Después de lavar se agregaron los sueros problema diluidos 1:10 y se incubó durante 2 horas. Se lavó 3 veces con solución amortiguadora PBS/Tween-20 y se agregaron 100 µl de proteína A peroxidada. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar se agregó el sustrato de la enzima OPD (orto-fenilendiamina en amortiguador de citrato + Peroxido de hidrogeno al 30 %) a temperatura ambiente. La reacción se detuvo utilizando 50 µl de ácido sulfurico 4N. Por último se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 492 nm (25,29).

4.0 RESULTADOS

4.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford

Mediante la preparación de una curva de calibración se cuantificó la concentración de proteínas que se obtuvo de los sobrenadantes de los cultivos de los serotipos 1, 3, 5, y 7 de *A. pleuropneumoniae*. Las muestras se diluyeron 1:400 para que los valores de sus absorbancias quedaran dentro de la curva de calibración. Las concentraciones de proteínas obtenidas fueron semejantes para todos los serotipos con excepción del serotipo 3 para el cual se obtuvo una absorbancia más baja.

Los resultados de las absorbancias de la curva de calibración y las muestras problema se incluyen en la tabla No.3

	Repeticiones			Promedio	D. Estándar
	A	B	C		
Tubo curva de calibración					
1	0.063	0.059	0.061	0.061	0.002
2	0.097	0.108	0.132	0.112	0.017
3	0.228	0.187	0.236	0.217	0.026
4	0.323	0.310	0.360	0.331	0.025
5	0.464	0.415	0.446	0.441	0.024
6	0.507	0.488	0.501	0.498	0.009
Sobrenadante serotipo					
App1	0.423	0.460	0.460	0.454	0.021
App3	0.393	0.392	0.374	0.386	0.010
App5	0.486	0.498	0.500	0.494	0.007
App7	0.412	0.447	0.450	0.436	0.021

Tabla No.3 Resultados de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. A, B y C son repeticiones de las lecturas de absorbancia. App1, App3, App5 y App7 son los serotipos probados. La absorbancia de las muestras se midió a 595 nm.

Para establecer la relación entre las variables probadas se preparo un gráfico (figura No.5) y se obtuvo el coeficiente de correlación. El valor obtenido de 0.996 para el coeficiente de correlación permitió utilizar esta curva para la cuantificación de proteínas.

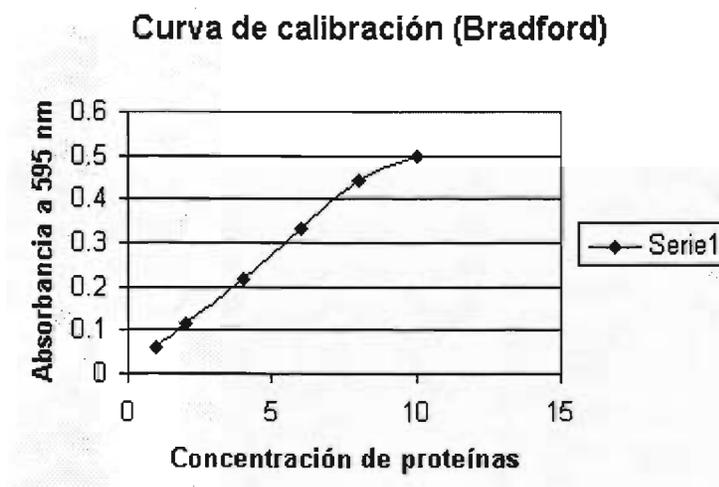


Figura No.5 Gráfico para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. El coeficiente de correlación fue de 0.996. En el eje X se gráfico la concentración de proteínas en el eje Y la absorbancia medida a 595 nm.

Con los datos y el gráfico obtenidos fue posible establecer la concentración de proteínas en los sobrenadantes de las muestras de App 1, 3, 5 y 7. Los resultados se muestran en la tabla No.4

SOBRENADANTE	CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS
App1	3.40 mg/ml
App3	2.92 mg/ml
App5	3.77 mg/ml
App7	3.31 mg/ml

Tabla No.4 Concentración de proteínas para los sobrenadantes de App 1, 3, 5 y 7.

4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Se realizó un corrimiento electroforético para los sobrenadantes de App 1, 3, 5 y 7 el cual fue teñido posteriormente con azul de Coomasie. El gel obtenido se muestra en la figura No.6

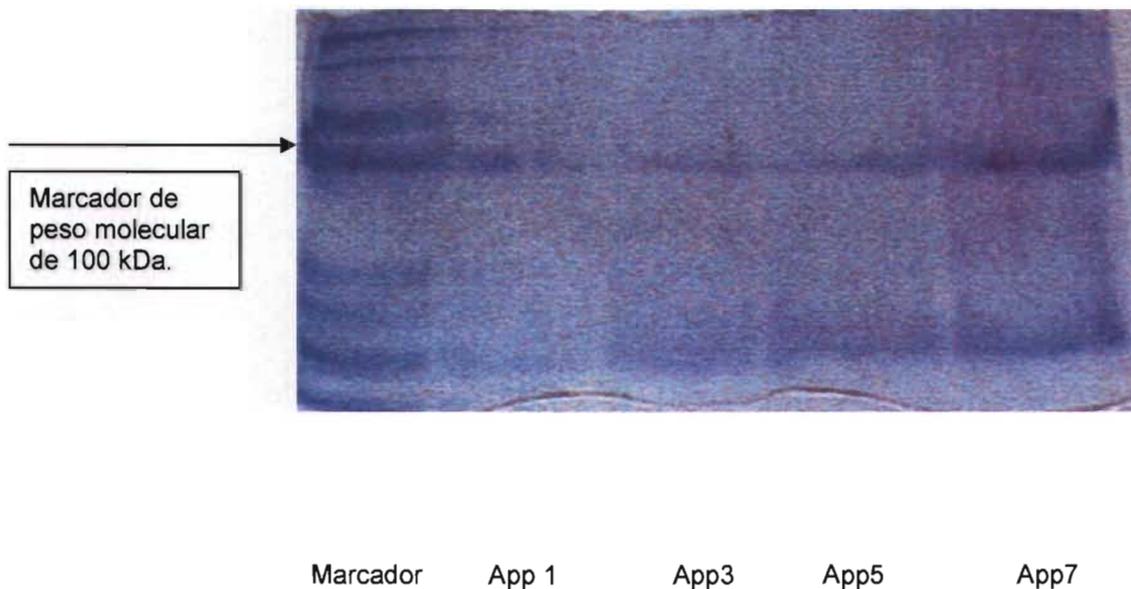


Figura No.6 Gel de poliacrilamida-SDS con bandas cerca del marcador de peso molecular de 100 kDa. en los carriles con sobrenadantes de App 1, 3, 5 y 7.

Mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS fue posible identificar bandas cerca del marcador de 100 kDa para todos los sobrenadantes de App probados.

A continuación fue necesario establecer la cantidad de toxina que se atrapó dentro del gel de monoleína y que fue utilizada como antígeno para la preparación de una posible vacuna contra la Pleuroneumonia Porcina.

4.3 Titulación de las toxinas Apx.

Para titular la cantidad de toxina que se utilizó como antígeno se realizaron dos ensayos. El primero de ellos evaluó el efecto citotóxico de la toxina sobre cultivos celulares en células PK-15 y células Vero. El segundo fue una prueba de actividad hemolítica.

4.3.1 Efecto citotóxico en cultivos celulares

Los resultados del ensayo se resumen en la Tabla No.5. El efecto citopático observado fue el aplanamiento y redondeamiento de las células. Se consideraron como positivos los pozos que presentaban este efecto en por lo menos el 50 % de la monocapa.

Los sobrenadantes con los serotipos 1 y 3 resultaron positivos a una concentración de 300 µg/ml mientras que los sobrenadantes de los serotipos 5 y 7 lo fueron a una concentración de 400 µg/ml.

En la figura No.7 se observa el efecto citopático causado por los sobrenadantes de App sobre células PK-15.

	POZO	1	2	3	4	5	6	7
SEROTIPO								
1		-	+/-	+	+	+	+	-
3		-	+/-	+	+	+	+	-
5		-	-	+/-	+	+	+	-
7		-	-	+/-	+	+	+	-
Concentración De proteínas		100	200	300	400	500	600	0

Tabla No.5.Efecto citopático en cultivo de línea celular PK-15 de los sobrenadantes de App. Se consideraron positivos los pozos con un efecto citopático del 50 % o más. El principal efecto citopático observado fue el aplanamiento y redondeamiento de las células. El pozo 7 se inoculó con PBS y se utilizó como control negativo.

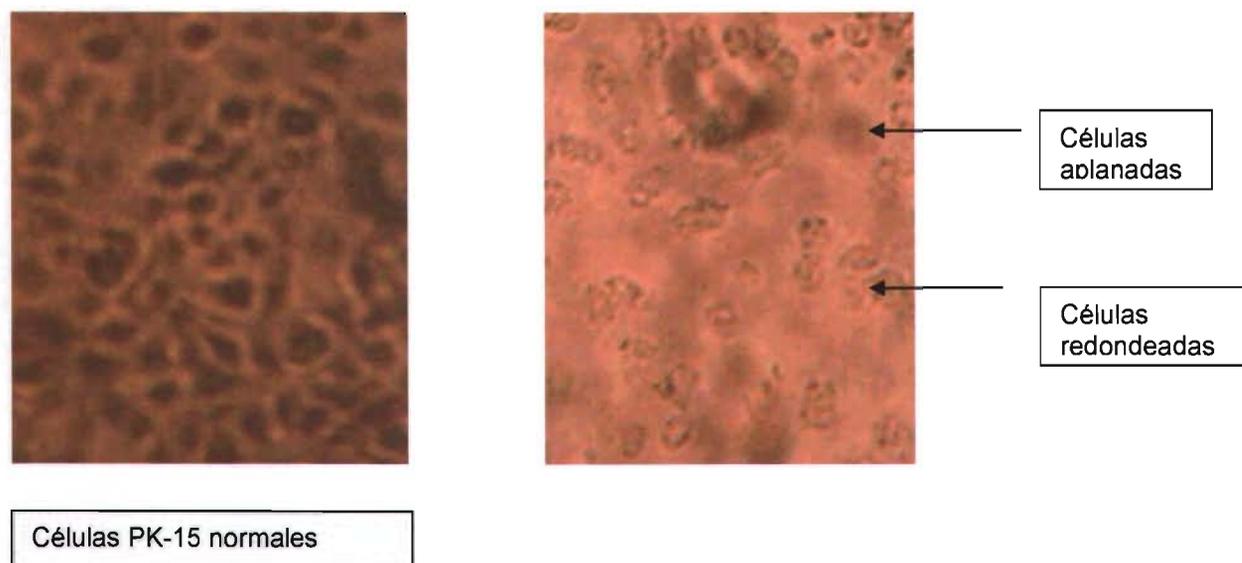


Figura No.7. Efecto citopático sobre cultivo de células PK-15 por los sobrenadantes de App. Izquierda, monocapa celular normal. Derecha monocapa celular con células aplanadas y redondeadas por el efecto de las toxinas Apx.

4.3.2 Ensayo de actividad hemolítica

La actividad hemolítica de los sobrenadantes de App se probó en glóbulos rojos de oveja en amortiguador TS (1).

La actividad hemolítica se midió espectrofotométricamente a 540 nm utilizando el tubo No.11 que contenía eritrocitos y agua destilada como valor de 100%. Los resultados de las absorbancias se indican en la Tabla No.6

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Absorbancia	0.370	0.250	0.106	0.052	0.009	0.010	0.008	0.009	0.010	0.009	0.410
Conc. Proteínas en µg/ml.	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	0	
% de hemolisis	90	60.9	25.8	12.6	2.10	2.4	1.9	2.1	2.4	2.1	100

Tabla No.6 Ensayo de actividad hemolítica. Absorbancias medidas a 540 nm de los tubos con eritrocitos y diferentes concentraciones de proteínas. El porcentaje de hemolisis se obtuvo utilizando el tubo 11 como 100 %.

4.4 Evaluación del gel de monooleato de glicerilo

Para poder establecer que se formó la fase cúbica de monooleína se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones. El aspecto del gel y su observación en el microscopio de luz polarizada. La disponibilidad de las toxinas se siguió en pruebas de disolución *"in vitro"*.

4.4.1 Propiedades físicas del gel

La fase cúbica de la monooleína se caracteriza por ser un gel viscoso estable. En la figura No.8 se muestra el gel que se obtuvo tras la adición de las toxinas Apx a la preparación.



Figura No.8 Gel de monooleína conteniendo las toxinas Apx. El gel obtenido es viscoso y estable, lo que nos hace pensar que la formación de la fase cúbica no se afecta por la inclusión de las toxinas Apx.

El gel obtenido con las toxinas Apx incluidas resulto visualmente igual al gel control preparado con monooleína y PBS.

4.4.2 Microscopia de luz polarizada

La fase cúbica del monooleato de glicerilo es isotrópica. Debido a esto no desvía la luz polarizada, por lo tanto cuando se le coloca en el microscopio de luz polarizada entre dos lentes polarizados el campo del microscopio debe observarse

completamente oscuro ya que toda la luz polarizada que pasa por el primer lente debe ser detenida por el segundo.

En la figura No.9 se observa la fase lamelar y cúbica de la monoleína observadas en el microscopio de luz polarizada.

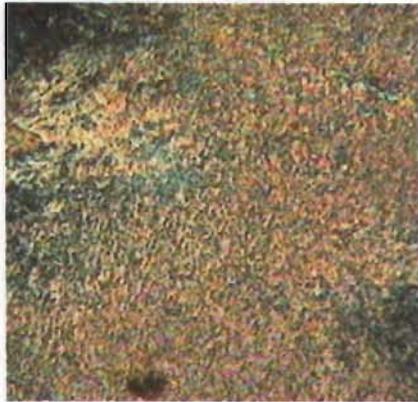


Figura No.9 Izquierda, fase lamelar de la monoleína. Al no ser isotropica la desviación de los rayos de luz polarizada permite observar una serie de formaciones cristalinas. Derecha, fase cúbica de la monoleína. El campo en completa oscuridad demuestra la existencia de una fase isotropica.

El gel de monoleína obtenido utilizando el antígeno (solución acuosa de toxinas Apx) resulto ser isotrópico en el microscopio de luz polarizada ya que no se observó desviación de la luz polarizada.

4.4.3 Pruebas de disolución “*in vitro*”

Los resultados de las pruebas de disolución “*in vitro*” en las que se probó sólo el antígeno sin el gel de monoleína se reportan en la tabla No.7, en donde se observan las absorbancias y las concentraciones respectivas para cada membrana probada. El papel whatman fue la membrana que interfería menos con los resultados del ensayo.

	Filtro Millipore 22um		Filtro Millipore 45 um		Whatman No.5	
	Abs.	Conc.	Abs.	Conc.	Abs.	Conc
Tiempo En minutos						
15	0.0020	0.22 µg/ml	0.0065	0.61 µg/ml	0.0125	1.13 µg/ml
30	0.0133	1.19 " "	0.0302	2.66 " "	0.0430	3.76 " "
45	0.0341	2.99 " "	0.0540	4.71 " "	0.0946	8.23 " "
60	0.0439	3.84 " "	0.0957	8.32 " "	0.0987	8.58 " "
75	0.0662	5.77 " "	0.0977	8.49 " "	0.0989	8.60 " "

Tabla No.7 Pruebas de disolución. Absorbancias y concentraciones de proteínas cuantificadas por el método de Bradford a diferentes tiempos. La concentración total de proteínas en todo el volumen de disolución será de 10 µg/ml.

En base a los resultados obtenidos se decidió utilizar como membrana de separación el papel whatman No.5. El ensayo se realizó utilizando gel de monoleína en fase cúbica que contenía en sus poros acuosos una concentración de 200 µg/ml de proteína. Las lecturas de la concentración de proteína se realizaron inicialmente con intervalos de 30 minutos, posteriormente cada 2 horas y la última lectura se tomo a las 24 horas. Los resultados se presentan en la Tabla No.8

	Absorbancia a 595 nm	Concentración de proteínas
Tiempo		
30 min.	0.0023	0.24 µg/ml
60 min.	0.0110	1.00 " "
90 min.	0.0335	2.94 " "
120 min.	0.0522	4.56 " "
4 hrs.	0.0728	6.34 " "
8 hrs.	0.0736	6.41 " "
24 hrs.	0.0732	6.37 " "

Tabla No 8. Pruebas de disolución. Absorbancia y concentración de proteínas en disolución medidas por el método de Bradford de un gel de monoleína conteniendo una concentración de proteínas de 200 µg/ml a diferentes tiempos.

Con los datos de la tabla No.8 se construyó un gráfico para establecer en que momento la concentración de proteínas permanecía constante en el medio de disolución, indicando que no más antígeno era liberado (figura No.10).

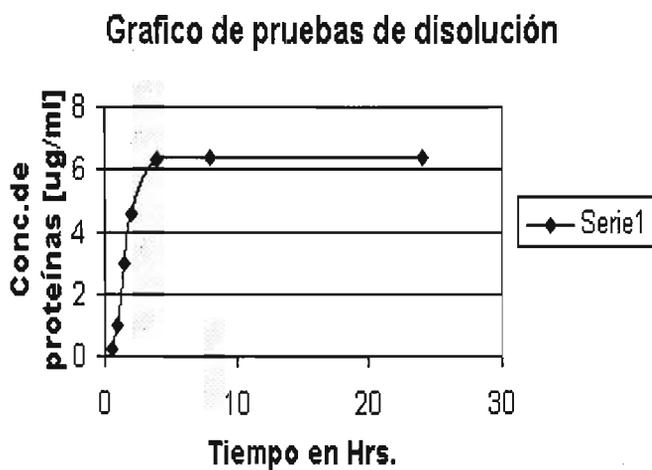


Figura No.10. Pruebas de disolución "in vitro". Gráfico de liberación de proteínas cuantificadas por el método de Bradford a diferentes tiempos.

4.5 Evaluación del modelo experimental en ratones

4.5.1 Citometría de flujo

Se contaron 10,000 células obtenidas del bazo de 20 ratones macho CD1 de aproximadamente 15 g. para cada marcador en un citometro de flujo Cyflow space-partec VASTELL.

En la tabla No.9 se muestran las medias y la desviación estándar de los resultados en porcentajes de cada población de linfocitos marcada. Aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas el grupo vacunado por vía oral presenta ligeros aumentos en las poblaciones de linfocitos CD3, CD4 y CD19 .

MARCADOR	CD3	CD4	CD8	CD19
CONTROL (-)	36.6/3.3	16.94/1.48	7.96/1.93	34.32/3.99
CONTROL GEL	36.6/2.32	16.74/1.54	7.47/0.66	35.50/3.43
CONTROL (+)	36.02/2.83	16.64/2.89	7.62/0.52	35.72/2.39
VACUNA ORAL	38.02/2.11	17.52/0.63	7.44/0.86	37.66/2.11

Tabla No.9. Medias y desviación estándar de los porcentajes de poblaciones de linfocitos obtenidos del bazo de ratones CD1. Cada grupo contenía 5 ratones macho.

Los gráficos de los resultados permiten observar muy pequeñas variaciones entre los diferentes grupos. La figura No.11 muestra los porcentajes de poblaciones celulares marcadas con anticuerpos anti-CD3. Complejo asociado con la identificación de linfocitos T.

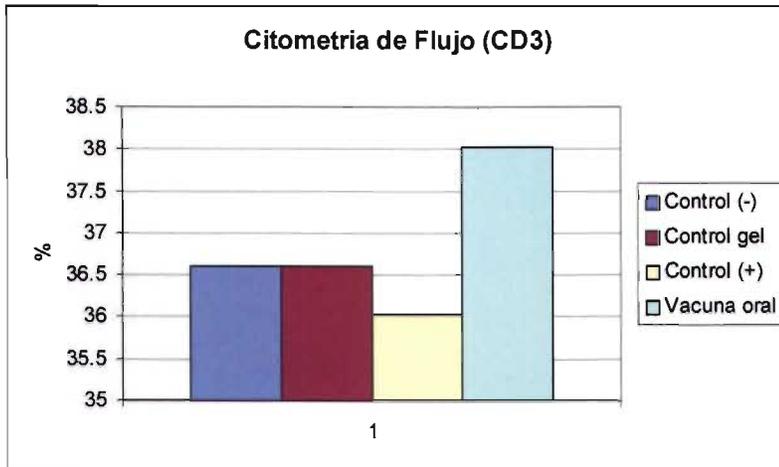


Figura No.11 Gráfico de porcentaje de células que presentan el marcador CD3.

En la figura No.12 se presenta el gráfico con los porcentajes de células marcadas con el anticuerpo anti-CD4. Las células que presentan el marcador CD4 se asocian con la identificación de linfocitos T cooperadores.

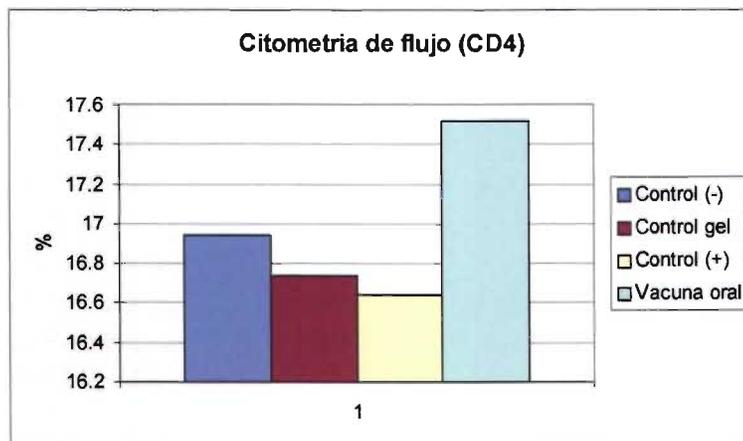


Figura No.12. Gráfico de porcentaje de células que presentan el marcador CD4.

En la figura No.13 se observan los resultados de las poblaciones marcadas con el anticuerpo anti-CD8. El complejo CD8 se asocia con la identificación de linfocitos citotóxicos. En contraste con las otras poblaciones celulares esta no se ve aumentada en los animales inmunizados por vía oral.

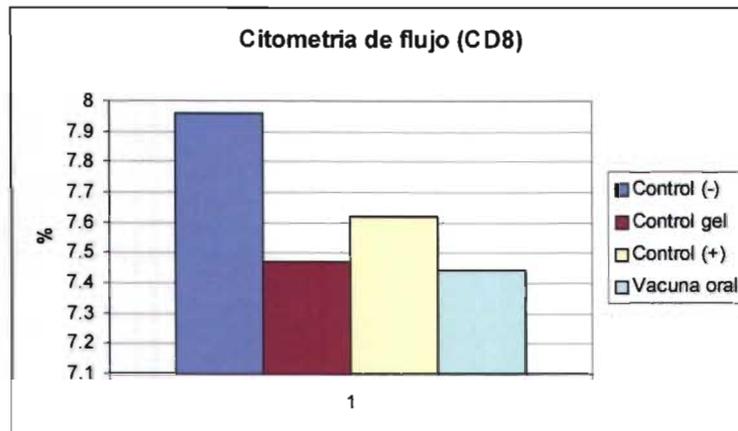


Figura No.13. Gráfico de porcentaje de células que presentan el marcador CD8.

Por ultimo, en la figura No.14 se muestra el gráfico de las poblaciones celulares marcadas con el marcador anti-CD19. Complejo asociado con la identificación de linfocitos B. Una vez mas el grupo vacunado vía oral presenta un ligero aumento en su población.

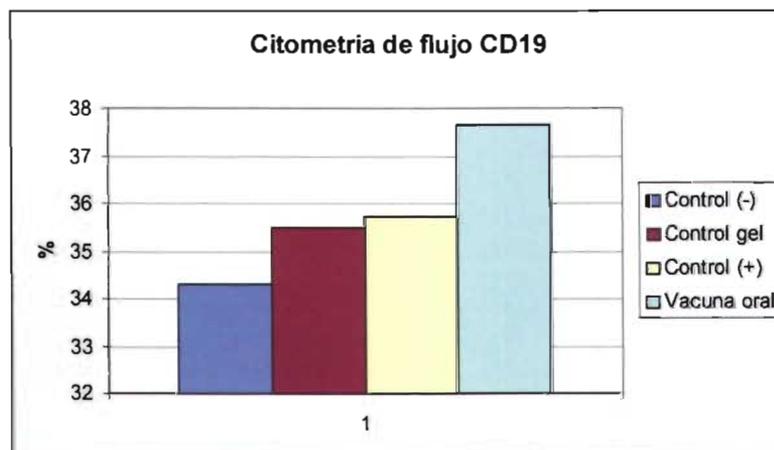


Figura No.14. Gráfico de porcentaje de células que presentan el marcador CD19.

4.5.2 Prueba de ELISA

Mediante una prueba de ELISA indirecta se estableció la presencia de anticuerpos contra el antígeno preparado con las toxinas Apx I,II y III. En la tabla No.10 se reportan las medias de los resultados obtenidos, indicando la abosorbancia medida a 492 nm para cada uno de los grupos experimentales. Todos los sueros probados se diluyeron 1:10.

Los grupos control positivo y vacuna oral presentaron un aumento significativo en la absorbancia medida, lo cual se traduce en la identificación de anticuerpos contra las toxinas Apx I, II y III así como otras proteínas con un peso molecular mayor a 100 kDa que pudieran estar presentes en los sueros de los animales pertenecientes a estos grupos.

Grupos	Lecturas de absorbancia					Promedio	D. Estándar
	A	B	C	D	E		
CONTROL (-)	0.046	0.044	0.048	0.050	0.044	0.046	0.002
CONTROL GEL	0.048	0.052	0.050	0.054	0.046	0.050	0.003
CONTROL (+)	0.340	0.331	0.366	0.364	0.328	0.345	0.018
VACUNA ORAL	0.336	0.348	0.368	0.338	0.360	0.350	0.013

Tabla No.10. Valores de absorbancia, promedio y desviación estándar medida a 492 nm para los diferentes grupos experimentales. A, B, C, D y E representan las lecturas obtenidas para cada ratón perteneciente a cada uno de los cuatro grupos experimentales.

En la figura No.15 se observa el gráfico de las absorbancias medidas a 492 nm de las muestras probadas por el método de ELISA indirecta, en donde se hace evidente la diferencia observada entre los grupos control positivo y vacuna oral que presentan absorbancias notablemente mas elevadas que los grupos control negativo y control para el gel.

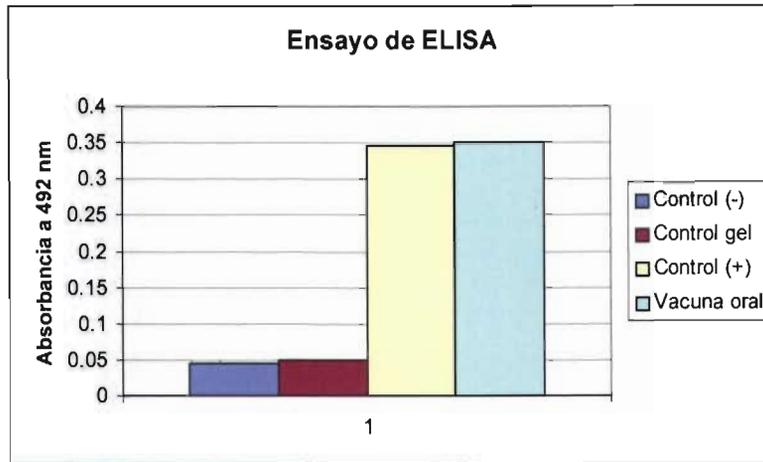


Figura No.15. Gráfico con absorbancias medidas a 492 nm de sueros de 20 ratones macho CD1 en una ELISA indirecta. El antígeno probado fueron las toxinas Apx I,II y III.

5.0 Discusión

El monooleato de glicerilo, un lípido anfifílico que por sus características de baja toxicidad y biodegradabilidad ha despertado recientemente un gran interés en la industria farmacéutica, podría funcionar como un sistema de acarreo y protección de moléculas proteicas aprovechando para este fin el sistema de canales acuosos que se forman cuando a elevadas concentraciones de agua se produce la fase cúbica de la monoleína. Un fármaco acarreador y protector de proteínas que administrado por vía oral permitiría llevar moléculas antigénicas hasta los sitios de reconocimiento inmunológico del animal funcionando así como una vacuna oral. En este estudio se desarrolló un inmunógeno utilizando las toxinas Apx I, II y III de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y la monoleína en fase cúbica como sistema de acarreo y protección.

Las toxinas Apx I, II y III por ser exotoxinas pueden ser obtenidas de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas bacterianas que las producen, al utilizar los serotipos 1 (productor de toxina Apx I y II), 3 (productor de toxina Apx II y III), 5 (productor de Apx I y II) y 7 (productor de toxina Apx II) se puede esperar encontrar las 3 toxinas en los sobrenadantes. De acuerdo a las curvas de crecimiento de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* para evitar la degradación de la toxina los cultivos deben ser inactivados a las 12 horas.

La filtración de flujo tangencial permite eliminar todas aquellas moléculas con un peso molecular menor a 100 kDa y conservar sólo aquellas con un peso molecular mayor en donde se espera se encuentren las toxinas Apx I (PM 105 kDa) Apx II (PM 103 kDa) y Apx III (PM 120 kDa).

La liofilización permitió concentrar los sobrenadantes ya que de un volumen inicial de 100 ml, el material liofilizado se resuspendió en un volumen final de 10 ml.

La electroforesis en gel de poliacrilamida, método analítico que permite separar biomoléculas dependiendo de una combinación de su carga y peso molecular se utilizó para tratar de identificar proteínas con un peso molecular cercano a los 100

kDa. La tinción de proteínas en el gel de corrimiento con azul de Coomassie permitió identificar bandas cercanas al marcador de peso molecular de 100 kDa para los 4 serotipos bacterianos probados (fig.6). Esta situación permite especular que en los sobrenadantes liofilizados están presentes las toxinas Apx I, II y III.

Para conocer la concentración de toxina en los sobrenadantes, se utilizó la determinación de proteínas por el método de Bradford; método sensible y rápido que permite establecer de manera indirecta la cantidad de toxinas Apx presentes en los sobrenadantes. La concentración de proteínas reportada en la Tabla No.3 hace pensar que se cuenta con una buena cantidad de toxina, sin embargo, es importante señalar que no todas las proteínas cuantificadas por este método son de hecho toxinas y que tal vez en este paso sería importante utilizar una metodología que permitiera obtener las toxinas purificadas. La electroelución de las bandas del gel de poliacrilamida sería una metodología adecuada para este fin, sin embargo, la cromatografía en columna de exclusión de peso molecular permitiría obtener una cantidad mayor de las toxinas purificadas.

Una vez obtenidas las toxinas Apx se estableció que concentración de proteínas sería utilizada en el modelo experimental con animales de laboratorio (ratones macho CD1). Para este fin se utilizaron 2 pruebas:

- a) Ensayo de citotoxicidad en cultivo de líneas celulares PK-15 y Vero.
- b) Prueba de actividad hemolítica (1).

En el ensayo de citotoxicidad en cultivos celulares se tomó como criterio de positividad el efecto citopático (aplanamiento y redondeamiento) de las toxinas Apx sobre las líneas celulares PK-15 y Vero (figura No.7).

Tomando en cuenta que las toxinas Apx I y Apx III son las que tienen una mayor actividad hemolítica y citotóxica respectivamente se decidió preparar el antígeno para inmunización utilizando una mayor concentración de los sobrenadantes de los serotipos productores de toxinas Apx I (serotipo 1 y 5) y Apx III (serotipo 3) de

tal forma el antígeno se preparó utilizando los siguientes porcentajes de sobrenadantes:

Serotipo 1 (Apx I y II)	40%
Serotipo 3 (Apx II y III)	40%
Serotipo 5 (Apx I y II)	10%
Serotipo 7 (Apx II)	10%

Siendo los serotipos productores de Apx I junto con Apx II los más virulentos (23,30) se podría haber utilizado porcentajes más elevados de los serotipos 1 y 5, sin embargo ninguno de estos produce la toxina Apx III, ya que la Apx III es producida solo por el serotipo 3 se decidió utilizar un porcentaje igualmente elevado para los serotipos 1 y 3.

Para la prueba de actividad hemolítica el criterio de positividad fue la producción de hemólisis medida espectrofotométricamente a 540 nm. Ambos ensayos reportaron que una concentración de 400 µg/ml sería suficiente para obtener una respuesta positiva. Basados en estos resultados se decidió utilizar esta cantidad de proteína como antígeno en el modelo experimental en ratones.

Ya establecida la cantidad de antígeno que sería utilizada en el modelo con animales era necesario observar el efecto que podría tener la inclusión de esa cantidad de proteínas en la fase cúbica del monoleato de glicerilo, lo cual se evaluó por exámenes visuales del gel así como mediante el uso de microscopía de luz polarizada. La fase cúbica del monoleato de glicerilo se caracteriza por ser un gel viscoso estable, la observación visual del gel obtenido, mostrado en la figura No.8 indica que la fase cúbica de monoleína no sufre cambios aparentes por la inclusión de las toxinas Apx. Una caracterización más contundente de la formación de la fase cúbica del monoleato de glicerilo se obtiene mediante la microscopía de luz polarizada, se sabe que, basados en su comportamiento óptico se puede agrupar a las sustancias cristalinas en 2 categorías: cristales anisótropos, aquellos que presentan diferente índice de refracción en diferentes direcciones cristalográficas y cristales isotrópicos, aquellos que presentan igual índice de refracción en todas las direcciones. La monoleína en fase cúbica es isotrópica por

lo que se observa como un campo visual en completa oscuridad en el microscopio de luz polarizada.

En la figura No.9 se observa el campo visual del microscopio de luz polarizada que contiene una muestra de la monoleína en fase cúbica conteniendo las toxinas Apx.

El campo visual en completa oscuridad nos confirma que la inclusión de las toxinas Apx en la monoleína no interfiere con la formación de la fase cúbica de esta. Como referencia se llevo a cabo también la observación de la monoleína en fase lamelar, el resultado fue la detección en el campo visual del microscopio de luz polarizada de estructuras de tipo cristalino.

Tanto el examen visual como la observación en el microscopio de luz polarizada indican que la formación de la fase cubica del monoleato de glicerilo no es afectada por la inclusión de las toxinas Apx a una concentración de 400 µg/ml.

El paso a continuación fue establecer si el antígeno atrapado en la fase cúbica de la monoleína sería liberado del gel. Para tal fin se llevaron a cabo las pruebas de disolución "*in vitro*". Para la realización de estas pruebas se utilizó una celda de disolución que permitía separar la muestra a probar del medio de disolución mediante una membrana. Inicialmente se trato de identificar que membrana podría ser utilizada en el experimento buscando que el material de esta interfiriera lo menos posible en los resultados. Se probaron 3 membranas diferentes (filtro Millipore de 0.22 µm, filtro Millipore de 0.45 µm y papel filtro Wathman no. 5) agregando solo el antígeno sin monoleína, se probo que membrana interfería menos con el paso del antígeno al medio de disolución. Esto se determino cuantificando la concentración de proteínas en el medio de disolución por el método de Bradford.

Los resultados en la tabla No.7 indican que el filtro Millipore de 0.22 µm no puede ser utilizado porque detiene de manera notable el flujo del antígeno. Tanto el filtro millipore de 0.45 µm como el papel filtro Wathman no. 5 permitieron un flujo similar del antígeno, sin embargo, se escogió llevar a cabo la prueba de disolución "*in vitro*" utilizando el papel filtro Wathman no. 5 pensando en eliminar la posibilidad de que las proteínas puedan pegarse en alguna medida al filtro de nitrocelulosa.

Otra posibilidad es bloquear el filtro de nitrocelulosa con una solución proteica como el medio Skim Milk antes de la realización del ensayo para eliminar así la posibilidad de que el antígeno proteico se pegara al filtro.

Una vez establecida la membrana se probó una muestra en monoleína en fase cúbica conteniendo 200 µg de antígeno. Los resultados en la figura No.8 reportan la concentración de proteínas en el medio de disolución a diferentes tiempos. Es posible observar que con el paso del tiempo la concentración de proteínas en el medio de disolución fue aumentando, lo que indica que el antígeno se estaría liberando del gel que lo contiene, aproximadamente a partir de las 4 horas la concentración de proteínas permaneció estable lo que nos indica que a este tiempo se liberó la mayor cantidad de antígeno posible, lo cual representó cerca del 70% del total probado. Cabe mencionar que el dispositivo de prueba no tenía la capacidad de agitar el gel de monoleína permitiendo así que este se disolviera por completo, situación que se espera suceda en las condiciones "*in vivo*" donde se presume que la monoleína se desintegrara por acción del peristaltismo intestinal así como de las enzimas que degradan lípidos en el intestino del animal. Sin embargo el porcentaje de liberación obtenido se considera como bueno y se piensa que permitirá al antígeno entrar en contacto con los centros de reconocimiento inmunológico en el intestino del animal.

Para evaluar la respuesta inmune celular y humoral de los ratones al antígeno probado se utilizó la citometría de flujo y el ensayo de ELISA. Los marcadores utilizados en la citometría de flujo fueron:

anticuerpos anti-CD 3, anticuerpos anti-CD 4, anticuerpos anti-CD 8 y anticuerpos anti-CD 19.

Es importante señalar que aunque las mínimas diferencias observadas en las poblaciones de linfocitos T y B en los diferentes grupos de animales probados en el experimento no son estadísticamente significativas bajo el análisis de varianza de un factor (ANOVA) si podrían ser un indicativo de que la vacuna oral de alguna forma provoca una respuesta inmune en su contra pero que se requiere de un estudio más completo para demostrar de manera contundente su capacidad

antigénica. Probablemente tratándose de una inmunización por vía oral y tomando en cuenta que una parte del antígeno podría perderse durante su recorrido hasta los sitios de reconocimiento inmunológico la dosis utilizada tendría que aumentarse o bien podría probarse el uso de adyuvantes, Jackson et al (1993) demostraron que el uso de la toxina colérica utilizada como adyuvante administrado por vía oral junto con un antígeno proteico (toxina tetánica) aumentaba notablemente el título de anticuerpos producidos contra el antígeno.

Así, sin ser estadísticamente significativos los resultados presentados en la figura No.11 nos indicarían un aumento en la población de células que presentan el marcador CD3 en los animales vacunados por vía oral cuya identificación se relaciona con la presencia de linfocitos T lo cual sería una evidencia de que el antígeno incluido en el gel de monoleína fue reconocido por el sistema inmune de los animales provocando una respuesta inmunológica en su contra aumentado así la población de células T.

De forma similar, en la figura No.12 se observa un aumento en la población de células con el marcador CD4 . El aumento de su población observado confirmaría que el antígeno probado por vía oral está estimulando una respuesta inmunitaria en su contra. Identificar subpoblaciones de linfocitos CD4 (+) Th1 y Th2 a través de sus patrones de producción de linfocinas podría ser una evidencia más clara del tipo de respuesta inmune que el antígeno producido con las toxinas Apx podría provocar.

El hecho de que la población de linfocitos T CD 8 (+) no haya aumentado, como se observa en la figura No.13, en los animales inmunizados con la vacuna oral habla de que la respuesta contra el antígeno podría ser más de tipo humoral que de tipo citotóxica ya que el antígeno CD 8 es un marcador de linfocitos T citotóxicos

El aumento en la población de linfocitos CD 19 (+) tras el estímulo de la vacuna oral (figura No.14) confirmaría de alguna manera que el antígeno es capaz de montar una respuesta inmune en su contra y que esta es de tipo humoral.

Los resultados observados en la figura No.15 indican que los sueros de los grupos control positivo y vacuna oral presentan anticuerpos contra el antígeno probado. El identificar anticuerpos contra el antígeno en el suero de los animales inmunizados con la vacuna oral indica que esta fue capaz de inducir una respuesta inmune comprobando la capacidad antigénica del producto.

En base a las pruebas realizadas el monoleato de glicerilo en fase cubica demostró ser un buen vehículo acarreador y protector de las toxinas Apx, capaz de atrapar en su sistema de canales acuosos moléculas proteicas sin que esto afecte la formación de la fase cúbica y liberarlas posteriormente por un intercambio disfuncional de agua del medio externo con la matriz. A diferencia de otras preparaciones que utilizan como matriz polímeros, como las utilizadas por Montero et al (2000) quienes utilizaron el polímero SPf66 como vehículo para la administración oral de una vacuna contra la malaria necesitando para ello de el uso de solventes y altas temperaturas, la preparación del gel de monoleína es muy sencilla y no requiere del uso de altas temperaturas ni solventes orgánicos lo que evita la destrucción del antígeno así como la producción de efectos adversos por la presencia de residuos tóxicos contaminantes en el sistema.

No fue posible demostrar de manera contundente la capacidad antigénica del producto preparado, sin embargo, los resultados son alentadores ya que aunque no estadísticamente significativos, fue posible identificar algunos cambios en las poblaciones de células del sistema inmune que podrían indicar la aparición de una respuesta inmune en contra del antígeno utilizado.

Es ya del conocimiento general que la ruta de administración de un inmunógeno influencia como y donde se expresa una respuesta inmune. El concepto de un sistema inmune integral de las mucosas ha sido ya establecido por diversos

estudios utilizando la vía de administración oral (16). Algunos autores como Hensel et al (1995) utilizando una suspensión de bacterias inactivadas administradas por vía oral demostraron la producción de elevados títulos de anticuerpos en los sueros de los animales (cerdos) probados. Esto hace posible pensar que la inmunización por vía oral podría producir una buena protección contra la enfermedad. Por otro lado Wei Liao et al (2002) utilizando un sistema de microesferas mediante el cual protegían y acarreaban células de *A. pleuropneumoniae* inactivadas con formaldehído demostraron la efectividad de sistemas de inmunización por vía oral para prevenir la infección por *A. pleuropneumoniae* al encontrar no sólo elevados títulos de anticuerpos contra el antígeno, sino un buen porcentaje de protección contra la enfermedad después del desafío.

La identificación de anticuerpos en el suero de los animales inmunizados con la monoleína en fase cúbica conteniendo las toxinas Apx abre la posibilidad de desarrollar un inmunógeno de fácil preparación y administración, que utilizado por vía oral proteja contra la Pleuroneumonia Porcina, por lo tanto el estudio de sistemas de acarreo y protección de antígenos proteicos que se administrarían oralmente es de gran importancia.

6.0 Apendice I

Preparación de soluciones utilizadas en la electroforésis:

1) Amortiguador TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8 (4X)

Tris base 6.0 g.

Agua desionizada 60 ml.

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N.

Llevar a 100 ml. Con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C.

2) Amortiguador TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8 (4X)

Tris base 18.75 g.

Agua desionizada 80 ml.

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N.

Llevar a 150 ml. Con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C.

3) Acrilamida-Bis 30 %

Acrilamida 29.2 g.

Bis-Acrilamida 0.8 g.

Llevar a 100 ml. con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C. En oscuridad (máximo 30 días).

4) Persulfato de amonio 10 %

Persulfato de amonio 0.1 g

Disolver en 1 ml. de agua desionizada

5) SDS 10 %

Dodecil sulfato de sodio 1.0 g.

Llevar a 10 ml. Con agua desionizada

6) Solución amortiguadora de corrida pH 8.3 (5X)

Tris-base 4.5 g.

Glicina 21.6 g.

SDS 1.5 g.

Disolver en 300 ml. De agua desionizada, almacenar a 4°C. Calentar a 37°C.

Antes de usar si es que ocurre precipitación. Diluir 60 ml. De esta solución en 240 ml. De agua desionizada para un corrimiento.

7) Solución digestora (4X)

Tris 0.5 M pH 8.6 1.0 ml.

Glicerol 0.8 ml.

SDS 10 % 1.6 ml.

2-b-mercaptoetanol 0.4 ml.

Azul de bromofenol 0.2 ml

Agua desionizada 4.0 ml.

8) Solución teñidora

Azul de Coomasie 2.0 g.

Agua desionizada 200 ml.

9) Solución desteñidora I

Metanol 50 ml

Ácido acético 10 ml

Aforar a 100 ml. Con agua desionizada

10) Solución desteñidora II

Ácido acético 7 ml.

Metanol 5 ml.

Aforar a 100 ml con agua desionizada

7.0 Referencias

- 1) Bagdasarian, M., Nagai, M., Frey, J., Bagdasarian, M., 1998. Immunogenicity of *Actinobacillus* ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. *Vaccine* 17:441-447.
- 2) Bauer, M., Welch, R., 1996. Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infection and Immunity*. 64:4665-4672.
- 3) Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254
- 4) Chang, Ch., Bodmeier, R., 1997. Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. *Journal of controlled release*. 46:215-222.
- 5) Chang, Ch., Bodmeier, R., 1997. Binding of drugs to monoglyceride-based drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*. 147:135-142.
- 6) Davies, R., Campbell, S., Whittam, T., 2002. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (*lktCABD*) in *Mannheimia (Pasteurella) Haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *Journal of Bacteriology*. 184:266-277
- 7) Engström, S., Fontell, K., Krog, N., 1980. Structural relationships between lamellar, cubic, and hexagonal phases in monoglyceride-water systems possibility of cubic structures in biological systems. *Chemistry and physics of lipids*. 27:321-328
- 8) Engström, S., Linddahl, L., Wallin, R., Engblom, J., 1992. A study of polar lipid drug carrier systems undergoing a thermoreversible lamellar-to-cubic phase transition. *International journal of pharmaceutics*. 86:137-145
- 9) Ericksson, B., Larsson, K., Fontell, K., 1983. A cubic protein-monoolein-water phase. *Biochimica et biophysica acta*. 729:23-27.
- 10) Fuller, T., Thacker, B., Duran, O., Mulks, M., 2000. A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine. *Vaccine*. 18:2867-2877.
- 11) Ganem-Quintanar, A., Quintanar, D., Buri, P., 2000. Monoolein: A review of the pharmaceutical applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 26:809-820.
- 12) Goethe, R., Flores, O., Lindner, T., Gerlach, G., 2000. A novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine*. 19:966-975
- 13) Habrun, B., Bilic, V., Cvetnic, Z., Humski, a., Benic, M., 2002. Porcine pleuropneumonia: the first evaluation of field efficacy of a subunit vaccine in Croatia. *Vet. Med. Czech*. 47:213-218.
- 14) Halsberger, A., Kohl, G., Felnerova, D., Mayr, U., Fürst-Ladani, S., Lubitz, W., 2000. Activation, stimulation and uptake of bacterial ghosts in antigen presenting cells. *Journal of Biotechnology*. 83:57-66.
- 15) Hardee, G., Baggot, J., 1990. Development and formulation of veterinary dosage forms. Ed. Marcel Dekker, Inc. United States. 283-286.
- 16) Hensel, A., Stockhofe-zurwieden, N., Petzoldt, K., Lubitz, W., 1995. Oral immunization of pigs with viable or inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae*

- serotype 9 induces pulmonary and systemic antibodies and protects against homologous aerosol challenge. *Infection and Immunity*.63:3048-3053.
- 17) Hensel, A., Huter, V., Katinger, A., Raza, P., Strnitsch, C., Roesler, U., Brand, E., Lubitz, W., 2000. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. *Vaccine*.18:2945-2955.
 - 18) Huter, V., Hensel, A., Brand, E., Lubitz, W., 2000. Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine. *Journal of Biotechnology*.83:161-172.
 - 19) Ladant, D., Ullman, A., 1999. *Bordetella pertusis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology*.7:172-176.
 - 20) Lally, E., Blake, R., Kieba, I., Korostoff, J., 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends in Microbiology*.7:356-361.
 - 21) Lindblom, G., Rilfors, L. 1988. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids possible biological relevance. *Biochimica et biophysica acta*. 988: 221-256.
 - 22) Longer, M., Tyle, P., Mauger, J., W:1996. A cubic-phase oral drug delivery system for controlled release of AG337. *Drug development and industrial pharmacy*.22:603-608.
 - 23) Maier, E., Reinhard, N., Benz, R., Frey, J., 1996. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*.64:4415-4423.
 - 24) Magnusson, U., Bosse, J., Mallard, B., A: Rosendal, S. 1997. Antibody response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens after vaccination of pigs bred for high and low immune response. *Vaccine*.15:997-1000.
 - 25) Margni, R. 1989. *Inmunobiología e inmunoquímica*. Ed. Panamericana. Argentina. 571-578.
 - 26) Mendoza, S., Ciprian, A. 2001. Tercer ciclo nacional "Enfermedades respiratorias del cerdo". Ed. UNAM. México DF.75-84, 100-111.
 - 27) Oswald, W., Konine, D., Rohde, J., Gerlach, G. 1999. First chromosomal restriction map of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and localization of putative virulence associated genes. *Journal of bacteriology*.181:4161-4169.
 - 28) Potter, A., Gerlach, G., Willson, Ph., Rossi-Campos, A., 1996. Vaccines for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.20:63-74.
 - 29) Pound, J. 1999. *Inmunochemical protocols*. Ed. Humana press. United States. 337-345.
 - 30) Seah, J., Frey, J., Kwang, J., 2002. The N-Terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice. *Infection and Immunity*.70:6464-6467.
 - 31) Sears, Zemansky, Youbg, Freedman. 1999. *Física Universitaria*. Vol. 2. Ed. Pearson educación. México DF.1064-1069.
 - 32) Tamayo, F. 1997. *Fundamentos de inmunobiología*. Ed. UNAM. México DF.400-403.
 - 33) Wei Liao, Ch., Chiou, H., Yeh, K., Chen, J., Weng, Ch., 2002. Oral immunization using formalin-inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens entrapped in

- microspheres with aqueous dispersion polymers prepared using a co-spray drying process. *Preventive Veterinary Medicine*.61:1-15.
- 34) Wongnarkpet,S.,Morris,R.,Pfeiffer,D.,1999.Field efficacy of a combined use of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines in growing pigs. *Preventive Veterinary Medicine*.39:13-24.
- 35) Wyatt,D.,Dorschel,D.,1992.A cubic-phase delivery system composed of glyceryl monooleate and water for sustained release of water-soluble drugs. *Pharmaceutical Technology*.October:116-122.
- 36) www.sanidadanimal.info/curso/6/etiologia.htm