

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

DESARROLLO EXPERIMENTAL DE UN INMUNOGENO CON  
LAS TOXINAS PURIFICADAS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
BAJO EL SISTEMA DE ACARREO Y PROTECCIÓN EN CERDOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS

PRESENTA

JORGE ALEJANDRO LÓPEZ BERMÚDEZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. SUSANA MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO  
DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES



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.

## INDICE

INDICE	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1.0 <b>INTRODUCCIÓN</b>	5
1.1 La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina	5
1.1.1 Agente etiológico	5
1.1.2 Factores de patogenicidad	6
1.1.3 Toxinas APX	7
1.1.4 El sistema inmune en las mucosas	12
1.1.4.1 Tejidos linfoides asociados a las mucosas	13
1.1.5 Epidemiología	14
1.1.6 Diagnostico de la enfermedad	15
1.1.7 Control de la Enfermedad	16
1.1.7.1 Quimioterapia	16
1.1.7.2 Inmunización	16
1.1.7.3 Manejo de los animales	17
1.2 <b>Producto farmacéutico con actividad de acarreador</b>	18
1.2.1 Acarreadores lipídicos	18
1.2.2 Monooleato de glicerilo	18
1.2.3 Lípidos polares y fases de transición	19
1.2.4 Fase cúbica de la monoleína	20
1.2.5 Luz polarizada y la fase cúbica de la monoleína	22
1.3 Justificación	25
1.4 Hipótesis	26
2.0 <b>Objetivo general</b>	27
2.1 <b>Objetivos particulares</b>	27
3.0 <b>Material y métodos</b>	28
3.1.1 Cepa bacteriana	28
3.1.2 Obtención de la semilla	28
3.1.3 Obtención de sobrenadantes ricos en toxinas Apx	28
3.2 Inactivación con formaldehído	29
3.3 Filtración	29
3.4 Cromatografía de exclusión de peso molecular	30
3.5 Concentración por liofilización	30
3.6 Determinación de proteínas por el método de Bradford	31
3.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	32
3.7.1 Preparación del gel de poliacrilamida	32
3.7.2 Preparación de las muestras para electroforesis	33
3.7.3 Electroforesis	33
3.7.4 Tinción de proteínas en el gel de poliacrilamida	34
3.7.5 Ensayo de western-Blot	34
3.7.6 Obtención de un antisuero específico	35
3.7.7 Isoelectroenfoque	36
3.8 Dosificación de la toxina	37
3.8.1 Ensayo de citotoxicidad en cultivos celulares	37
3.8.2 Prueba de actividad hemolítica	38
3.9 Preparación del gel de monoleína acarreador de las toxinas Apx	38
3.9.1 Preparación del antígeno	38
3.9.2 Obtención del gel	39
3.9.3 Evaluación para el gel de monoleína	39

3.9.4	Pruebas de disolución "in vitro"	39
3.10	Diseño experimental	40
3.11	Parámetros de evaluación	40
3.11.1	Prueba de ELISA	40
3.11.2	Examen histopatológico	41
3.11.3	Planimetría	42
<b>4.0</b>	<b>Resultados</b>	<b>44</b>
4.1	Determinación de proteínas por el método de Bradford	44
4.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	46
4.2.1	Ensayo de Western-blot	46
4.3	Titulación de las toxinas Apx	47
4.3.1	Efecto citotóxico en cultivos celulares	47
4.3.2	Ensayo de actividad hemolítica	49
4.4	Evaluación del gel de monooleato de glicérido	49
4.4.1	Propiedades físicas del gel	49
4.4.2	Microscopía de luz polarizada	50
4.4.3	Prueba de disolución "in vitro"	51
4.5	Isoelectroenfoque	53
4.6	Histopatología	54
4.7	Sintomatología	56
4.8	Planimetría	57
4.9	Prueba de ELISA	58
<b>5.0</b>	<b>Discusión</b>	<b>60</b>
<b>6.0</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>64</b>
<b>7.0</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>64</b>
<b>8.0</b>	<b>Referencias</b>	<b>65</b>
<b>9.0</b>	<b>Apéndice I</b>	<b>68</b>

## RESUMEN

Se desarrollo un inmunógeno utilizando las toxinas Apx I, II y III, que administrado por vía oral proteja de la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando como sistema de acarreo y protección el monooleato de glicerilo en fase cubica.

La monooleína, un lípido anfifílico, en presencia de altas concentraciones de agua y a la temperatura corporal da lugar a 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 incluyo a las toxinas Apx.

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

Se evaluó la capacidad del gel de monooleína 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 fue capaz de capturar 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.

La presencia de bandas cercanas al marcador de 100 KDa en una electroforesis en gel de poliacrilamida y el ensayo de Westernblot comprobaron la existencia de las toxinas Apx y mediante la prueba de isoelectroenfoque se demostró que cada serotipo bacteriano producía dos diferentes toxinas. Posterior al esquema de inmunización y al desafío de los animales con el agente etiológico, se recupero la bacteria a partir de los pulmones infectados y en algunos casos también de otros tejidos como tonsilas y bazo, los serotipos identificados fueron el 1 y el 3. Las lesiones características de la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* observadas mediante histopatología consistieron en: hiperemia con hemorragias de alvéolos, septos interlobulillares y pleura; presencia de trombos venosos y dilatación linfática en algunos casos con trombosis. Todos los animales inmunizados por vía oral permanecieron con vida después del desafío y mediante un ensayo de ELISA indirecto se identifico la presencia de anticuerpos contra las toxinas Apx en el suero de estos animales en cantidades similares a las producidas por las vacunas comerciales que utilizan la vía de administración intramuscular. Por lo tanto la preparación funciona como un inmunógeno cuya respuesta en el animal fue muy similar a la de dos preparaciones comerciales que utilizan la vía de administración intramuscular abriendo así una puerta al desarrollo de productos farmacéuticos de uso veterinario que podrían utilizar la vía de administración oral.

## ABSTRACT

An Immunogen was developed by using the Apx Toxins I, II and III, and the carrying and protection system, that orally administered protects against the infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Glyceryl monooleate is an adjuvant that forms a viscous gel known as cubic phase. This characteristic allows it to work as a carrier and protection system for protein molecules. In the present work, the capacity of the cubic phase of glyceryl monooleate was studied as a vehicle for Apx toxins, with the aim to obtain an orally administered immunogen for the protection of susceptible pigs to *A. pleuropneumoniae* infection.

Serotypes 1 and 3 from *A. pleuropneumoniae* field strains were used for this study. Supernatants were obtained from a 12 hour-growth in heart infusion broth supplemented with 20 % yeast extract which were inactivated with formaldehyde to a final concentration of 0.5 %. Cross-flow filtration, gel filtration and lyophilization were used to purify and concentrate the supernatants. The Bradford method was used for the determination of protein concentration, in order to indirectly evaluate the amount of toxins present in the supernatants. The SDS-PAGE and Western blot analysis were used to establish the presence of the toxins in the supernatants. The monoolein cubic phase formation and the effect of toxin inclusion in the system was determined by polarized light microscopy, the antigen release were determined using *in vitro* dissolution tests. After challenge with the bacterium, culture and serotyping of the microorganism were performed from the animals tissues, histopathology analysis establish the characteristic lesions and an indirect ELISA test will reveal the presence of antibodies against the Apx toxins in the animals sera.

SDS-PAGE and Western blot analysis establish the presence of the toxins. The glyceryl monooleate cubic phase showed to be a very good carrier and protective vehicle for Apx toxins, able to trap protein molecules in its water channels system and then release them.

The bacterium was recovered from all infected animals and the serotypes isolated were those used in the animals challenge. Through the histopathological studies it was demonstrated that the lesions observed on the animals tissues was the characteristic produced by this microorganism. An indirect ELISA test identify antibodies against the Apx toxins, that were used as an antigen in the experiment, in the animals sera. Suggesting a good stimulation of the animals immune systems. Planimetric studies establish the pneumonic lesion degree.

## **1.0 INTRODUCCION**

### **1.1 La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina**

La pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad altamente contagiosa que 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 esta 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, pleomorficos, de tamaño pequeño, anaerobios facultativos, no esporulados, encapsulados, que en los aislamientos iniciales requieren de una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Entre sus características bioquímicas esta 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 lipopolisacarido (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 citó adherentes que 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 sideróforos [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 citotóxina que afecta sólo células específicas [20]. En la tabla No.1 se indican las cuatro diferentes toxinas Apx así como la actividad biológica que presentan y los serotipos que las producen.

Toxina	Hemolítica	Citotóxica	Serotipo
Apx I	+++	---	1,5,9,10,11 y14
Apx II	+/-	+/-	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 11,12 y 13
Apx III	---	+++	2,3,4,6,8 y 15
Apx IV	+/-	---	1-15

Tabla No 1. Toxinas Apx actividad biológica y serotipo productor.

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 estas 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* que presenta una secuencia consenso característica de aminoácidos repetidos [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. Se han descrito cinco principales sistemas de secreción de exotoxinas. Del sistema general de secreción (*Sec*), que transporta polipéptidos del citoplasma al periplasma, dependen otros tres, denominados sistemas de secreción tipo (SST) II, IV y V.

En el SST V, los polipéptidos son transportados al periplasma por Sec y ahí, la proteína a secretar inserta su dominio C-terminal en la membrana externa (ME) formando un poro a través del cual el dominio pasajero de la proteína alcanza el espacio extracelular. Frecuentemente estas proteínas se cortan a sí mismas, liberando el dominio pasajero al medio. El SST II es más complejo y es responsable de la secreción de toxinas y enzimas hidrolíticas. Estas proteínas son secretadas al periplasma vía Sec, y posteriormente son secretadas a través de la ME gracias a una estructura compuesta de 12 a 16 proteínas que constituyen su *secretón*. Esta estructura se asocia a la membrana interna (MI) y forma en el periplasma una estructura tipo pili (pilus-like), el cual se considera que actúa como pistón para dirigir a las proteínas al exterior a través de un poro formado en la ME por una proteína de la familia de las secretinas.

El SST IV se encuentra relacionado evolutivamente con el SST II. El sistema tipo IV es uno de los más diversos y está relacionado también con los sistemas de conjugación. Estos últimos son relevantes en la transferencia de DNA de una célula a otra, muchas veces sin importar la especie e inclusive de una bacteria a una célula eucarionte. En el SST IV las proteínas pueden ser secretadas al medio o transferidas mediante un pili hacia la célula blanco, y en algunos casos es utilizado por bacterias intra-celulares que secretan al citoplasma de la célula huésped proteínas que inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma. Asimismo, una forma de desplazamiento celular conocida como “twitching” es dependiente de la presencia de un pili tipo IV en la superficie de la bacteria. Entre los sustratos secretados por este sistema se encuentra la toxina pertussis causante de la tosferina la cual requiere ser exportada al periplasma por el sistema Sec, para después ser dirigida al complejo de secreción tipo IV, mientras que otros sustratos son independientes de Sec.

Los SST I y III son independientes del sistema Sec. El SSTI es utilizado para secretar toxinas, proteasas y lipasas y depende de un complejo de tres proteínas: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés *ATP binding cassette*) en la membrana interna y una proteína periplásmica que también está anclada a la

MI y que se denomina PF (proteína de fusión) (Fig. 1). A través de este complejo las proteínas son secretadas directamente del citoplasma al espacio extracelular.

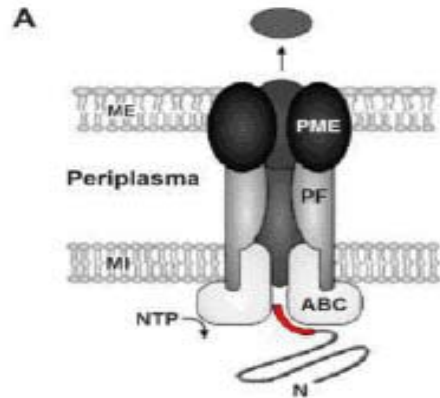


Figura 1. El sustrato se reconoce a través de una secuencia señal en el extremo carboxilo terminal (marcado en rojo). En este modelo de secreción, la proteína periplásmica de fusión (PF) interactúa con el transportador ABC (ATP binding casete) en la membrana interna (MI) y con la proteína de membrana externa (PME) que forma un canal en la membrana externa (ME).

El SST III está involucrado en la formación del flagelo y en el transporte de factores de virulencia desde el citoplasma de bacterias patógenas, hasta el citoplasma de las células huésped, a través de una estructura conocida como *inyectisoma*. El flagelo está constituido en su base por tres anillos que se forman en la MI, en la pared del péptidoglicano y en la ME. Una estructura conocida como eje atraviesa estos anillos y en la superficie celular se polimeriza la estructura conocida como gancho (55 nm de longitud) y posteriormente el filamento (5-10 nm de longitud). El sistema de exportación de las proteínas flagelares se ubica en la base del anillo que se localiza en la MI y está formado por aproximadamente 10 proteínas cuya función es transportar las subunidades de las proteínas flagelares desde el citosol hasta el extremo distal del flagelo, a través de un canal central que corre a lo largo de la estructura.

El sistema de exportación incluye una ATPasa que brinda la energía para la secreción de los sustratos. Por otro lado, el *inyectisoma* está formado por una estructura de dos anillos localizados en la MI y en la ME, y una extensión extracelular en forma de aguja (80 nm de longitud). La exportación de las

subunidades del *inyectisoma*, así como de los factores de virulencia, es dependiente de un complejo multiproteico localizado en la base del *inyectisoma*, el cual incluye una ATPasa.

Los factores de virulencia exportados por este sistema son translocados a la célula blanco mediante un poro que se forma en la membrana de la célula eucarionte. Las proteínas que conforman el poro o *translocón*, forman parte de los efectores que son exportados por la bacteria. Las proteínas que conforman el flagelo y el *inyectisoma* muestran diversos grados de similitud y en muchos casos cumplen funciones equivalentes. La clara relación evolutiva entre estos sistemas ha llevado a proponer que el *inyectisoma* proviene de una duplicación ancestral de los genes flagelares, la cual se especializó posteriormente en funciones de virulencia. 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 está 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 producen al menos un tipo de toxina y en ocasiones varios, siendo los 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 *Mannheimia hemolítica*. 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 [23].

#### **1.1.4 El sistema inmune en las mucosas**

Las mucosas constituyen la puerta de entrada para muchos agentes patógenos y el lugar de contacto con diferentes antígenos (ambientales, alimentos...). Así como la piel constituye una barrera físicamente difícil de atravesar por los microorganismos, las mucosas son desde este punto de vista, más frágiles. Sin embargo, están dotadas de un sistema de protección local, ya que en ellas tiene lugar una respuesta inmune con características especiales que se desarrolla a partir del tejido linfoide asociado a las mucosas (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*: MALT).

#### **1.1.4.1 Tejidos linfoides asociados a las mucosas.**

Se encuentran agrupaciones de tejido linfoide no encapsulado situadas en la lámina propia y las áreas submucosas de aparatos digestivo, respiratorio y genitourinarios. Las células linfoides se hallan presentes, ya sea como cúmulos difusos u organizados en nódulos, solitarios o agrupados, que contienen centros germinales (folículos secundarios). El epitelio intestinal que cubre dichas placas se especializa en el transporte de los antígenos hacia el tejido linfoide. Esta función particular es realizada por unas células denominadas M (micropliegues - *microfolds*), que son capaces de absorber y transportar los antígenos, para que sean procesados y presentados a las células linfoides subepiteliales por las células presentadoras de antígenos. La respuesta inmune humoral a nivel de la mucosa esta dada principalmente por el isotipo IgA. La IgA secretora es un anticuerpo que puede atravesar las membranas mucosas y ayuda a impedir la entrada de los microorganismos infecciosos. Además del sistema MALT, se encuentran un gran número de linfocitos en el tejido conjuntivo de la lámina propia y dentro de la capa epitelial. Los linfocitos de la lámina propia son predominantemente células T activadas, aunque también pueden detectarse numerosas células B activas y células plasmáticas. Estas secretan sobre todo IgA, que se transporta a través de las células epiteliales y se libera en el interior de la luz.

Las células linfoides asociadas a la mucosa recirculan principalmente dentro del sistema linfoide mucoso. Así, las células linfoides estimuladas en las placas de Peyer por un antígeno, viajan por la linfa hacia los linfáticos regionales y luego por el conducto torácico a la circulación, para de nuevo ir a asentarse en las mucosas, donde van a secretar IgA. La recirculación específica (tropismo por las mucosas) se basa en las moléculas de adhesión que éstas células expresan. Basándose en este mecanismo, la estimulación antigénica en un área de la mucosa provoca una respuesta de anticuerpos (IgA) en otras zonas mucosas [32].

### 1.1.5. 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 que presenten 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 aparición de los signos clínicos. Esto trae principalmente dos problemas: 1) pueden aparecer de forma explosiva casos agudos de la enfermedad frente a cambios que favorecen a los factores pre disponentes; 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 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 grados de morbilidad y mortalidad, en caso de presentarse la enfermedad [24].

#### **1.1.6. 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 signos 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 de ELISA y aglutinación en placa (neumotest) [26].

### **1.1.7 Control de la enfermedad**

#### **1.1.7.1 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, ceftriofur y a últimas fechas la kitasamicina, 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].

#### **1.1.7.2 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 cuál 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 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].

### **1.1.7.3 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, etílcélulosa, metílcélulosa, 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. Monooleato de glicérilo**

El monooleato de glicérilo o monooleína, 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].

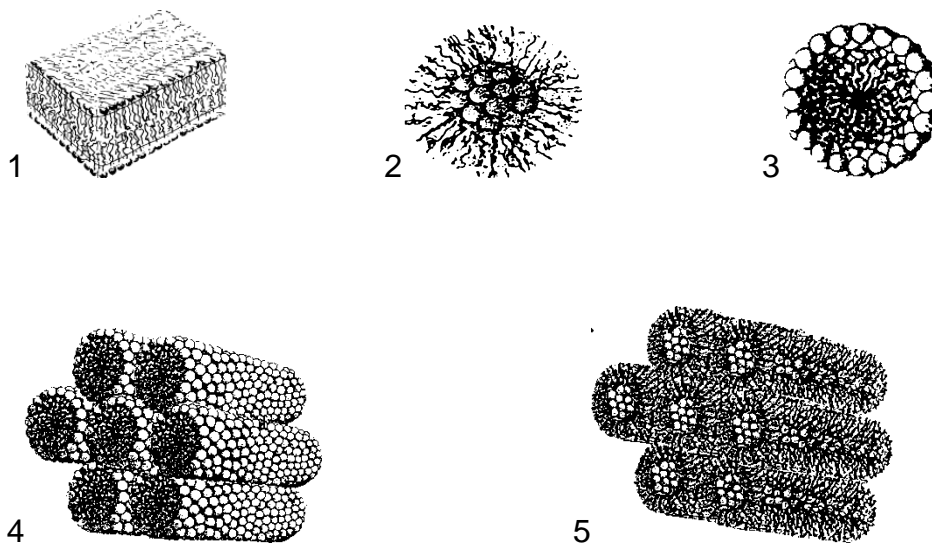


Figura 2. Estructuras de agregación de moléculas anfifílicas. 1) Bicapas lineares (lamelar,  $L\alpha$ ) 2) Micelas esféricas ( $L1$ ), 3) Micelas inversas ( $L2$ ), 4) Micelas cilíndricas (hexagonal,  $H1$ ) y 5) Micelas cilíndricas inversas.

Los lípidos anfifílicos al contacto con el agua forman fases de transición que resulta en la existencia de estados intermedios 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 monooleína

Si se agrega una pequeña cantidad de agua a la monooleína a 37° centígrados se observa la fase de cristal líquido micelar inversa. Conforme el contenido de agua aumenta se forman diferentes fases. Figura (3).

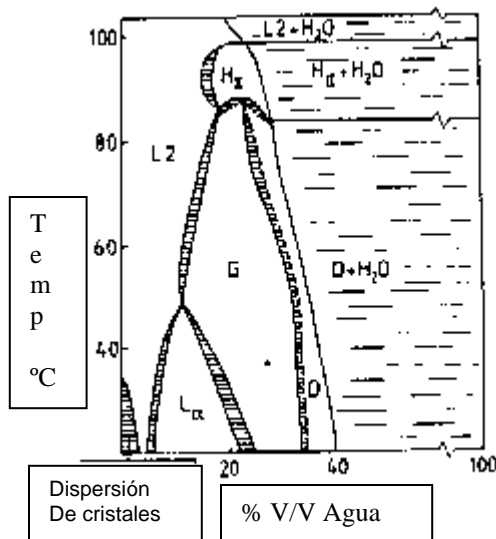


Figura 3. Diagrama de fases de la monooleína con respecto a la temperatura y el contenido de agua. A 37 °C y una cantidad de agua pequeña, la monooleína forma la fase micelar inversa ( L2 ) caracterizada por una textura aceitosa. Agregando más agua, se forma un sistema tipo mucoide que corresponde a la fase lamelar ( L  $\alpha$  ). 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 (4).

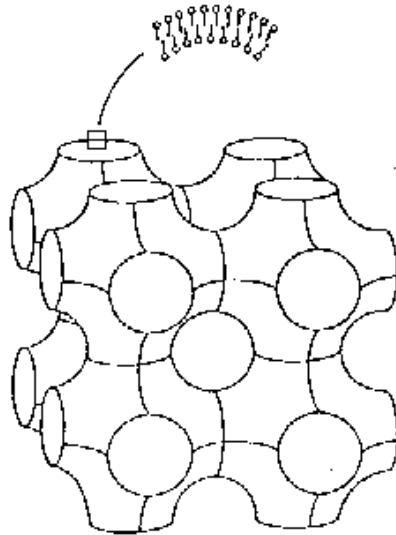


Figura 4. Forma esquemática de la fase cúbica del monooleato de glicérido. Bicapa curvada que se extiende en tres dimensiones formando un sistema congruente de canales acuosos.

Estas características permitirían a la monoleína 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 monooleina

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. 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. 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 distintas 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 anisótropicos desviarán el rayo de luz polarizada permitiendo ver 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 monooleína 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 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. (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 en 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 otro tipo de vacunas en el mercado que combinan bacterinas y toxoides como la Ingelvac APPX o la vacuna subunitaria producida por Intervet, sin embargo, éstas 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 las vacunas elaboradas con cápsulas o bacterinas, la infección natural o experimental con cepas virulentas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* generalmente confiere protección contra la re infección 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 inmunógenos 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**

Si el monooleato de glicérido en fase cúbica es capaz de transportar y proteger moléculas proteicas Toxinas (Apx), administradas por vía oral y posteriormente liberarlas en los sitios de reconocimiento inmunológico del animal en el intestino, entonces la preparación funcionará como un inmunógeno que generará en los cerdos susceptibles protección contra la pleuroneumonía contagiosa porcina.

## 2.0 OBJETIVO GENERAL

Estudiar un gel a base de monooleato de glicérilo 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 los serotipos 1 y 3 *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- Enriquecer los sobrenadantes que contienen las toxinas Apx I, II y III mediante filtración tangencial, cromatografía de exclusión de peso molecular y liofilización
- Optimizar una técnica de atrapamiento de toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizando monooleína en fase cúbica como acarreador y protector.
- Evaluar la eficiencia “*in vitro*” e “*in vivo*” del sistema propuesto en relación con otras preparaciones.

## **3.0 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1.1 Cepa Bacteriana**

Se utilizaron los serotipos 1 y 3 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de cepas de campo para la producción de sobrenadantes enriquecidos con exotoxinas Apx que fueron inactivados con formaldehído a una concentración final de 0.5 %.

### **3.1.2 Obtención de la semilla**

Cultivo de serotipos 1 y 3 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Para su conservación las cepas bacterianas se mantienen en viales con caldo infusión cerebro corazón (Becton Dickinson USA), adicionado de leche descremada al 15 %, en un criocontenedor con nitrógeno líquido a -196 °C, después de descongelar a temperatura ambiente, las bacterias se sembraron en agar infusión cerebro corazón con una estría de una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, que proporcionó 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 cultivo inicial se tomaron varias colonias que se sembraron para su desarrollo masivo en agar PPLO (Becton Dickinson USA), adicionado de extracto de levadura al 20 %. Este crecimiento se utilizó para inocular 250 ml de caldo BHI adicionado de extracto de levadura al 20 %. Se incubó a 37 °C, con agitación en un baño de agua durante 24 hrs. Con este se inoculo un garrafón con 10 litros de caldo BHI con extracto de levadura al 20 % el cuál se incubó 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 (Merck México) hasta obtener una concentración final de 0.5 % se llevó a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación durante 6 Hrs. [33]. El formaldehído es un agente químico con alto poder microbicida. Actúa por alquilación de proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos.

### 3.3 Filtración

- a) Se eliminó la biomasa por centrifugación a 5000 RPM durante 30 minutos, conservando el sobrenadante.
- b) La filtración del sobrenadante se realizó con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para tratar de eliminar los restos de cuerpo bacteriano.
- c) 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 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).

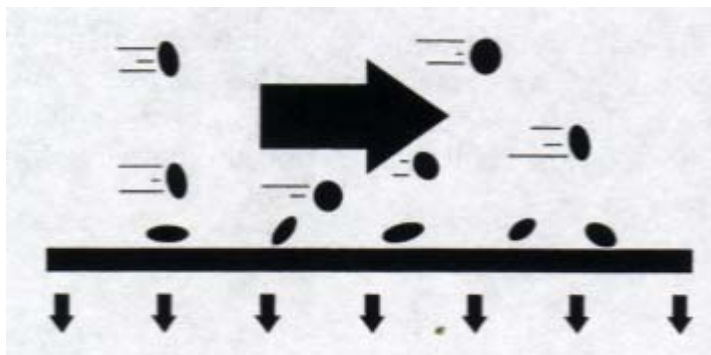


Figura 5 Filtración de flujo tangencial. La flecha más grande indica la dirección del flujo del fluido, esto evita la saturación de la membrana ya que las partículas de mayor tamaño son arrastradas por

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 quedó dividido en dos fracciones, un sobrenadante retenido que contiene las moléculas de un peso mayor a 100 kDa en donde se encuentran las toxinas Apx, sus 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 Cromatografía de exclusión de peso molecular**

La cromatografía de exclusión molecular, también llamada de filtración en gel, separa las proteínas en función de su tamaño.

La matriz de la columna esta formada por un polímero entrecruzado con poros de tamaños determinados. Las proteínas de mayor tamaño migran a lo largo de la columna más deprisa que las de pequeño tamaño, ya que son demasiado grandes para introducirse en los poros de las bolas de polímero y por tanto siguen una ruta más corta y directa a lo largo de la longitud de la columna. Las proteínas de menor tamaño, entran en los poros y su marcha a lo largo de la columna se retrasa, ya que tienen que atravesar los laberintos que se encuentran en el interior de las bolas de polímero en su marcha a lo largo de la columna.

### **3.5 Concentración por liofilización**

El sobrenadante obtenido se sometió a liofilización para concentrar las toxinas Apx.

Se liofilizaron 100 ml de sobrenadante de cada serotipo bacteriano resuspendiendo el polvo obtenido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).



### 3.6 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 ( SIGMA CHEMICAL, USA). 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 2.

Tubo	0	1	2	3	4	5	6
Solución estándar Albumina 0.01% ( $\mu\text{l}$ )	0	10	20	40	60	80	100
Agua desionizada ( $\mu\text{l}$ )	100	90	80	60	40	20	0
Reactivo de Bradford ( $\mu\text{l}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
[Proteínas] $\mu\text{g/ml}$	0	1	2	4	6	8	10

Tabla 2 Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

Para los problemas se utilizaron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se le adicionaron 1000  $\mu\text{l}$  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.

### **3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

La electroforesis es un método analítico-semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores por su carga y peso molecular 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 y estructura tridimensional. La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible.

#### **3.7.1 Preparación del gel de poliacrilamida**

- Preparación de un gel tapón
- Preparación del gel de separación (la mezcla se vertió rápidamente a la cámara de electroforesis 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 del 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 3.

	Gel tapón	Gel de separación	Gel de condensación
Agua destilada (ml)	0.00	4.05	6.10
Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	1.00	2.50	0.00
Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	0.00	0.00	2.50
SDS 10 % ( $\mu$ l)	100.00	100.00	100.00
Acrilamida-Bis (ml)	2.00	3.30	1.30
Per sulfato de amonio 10 % ( $\mu$ l)	50	50	50
TEMED ( $\mu$ l)	5	5	5

Tabla No.3 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 %.

### 3.7.2 Preparación de las muestras para electroforesis

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

### 3.7.3 Electroforesis

Se colocaron 10  $\mu$ 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 bromo fenol) llegó al extremo final del gel de corrimiento.

### **3.7.4 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 24 hrs.

Después del tiempo requerido para la tinción de las proteínas, el gel se sumergió en la solución desteñidora I, 2 horas con agitación ligera, por último el gel se transfirió a la solución desteñidora II donde se mantuvo durante 60 minutos.

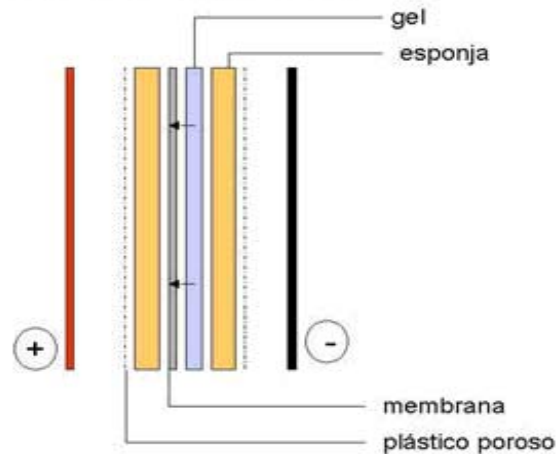
### **3.7.5. Ensayo de WESTERN BLOT**

La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de 'blots'. El método más potente es el denominado 'Western blot' en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel a una membrana. El procedimiento es análogo al desarrollado por el Prof. E. Southern ('Southern blotting') y por ello se le denominó 'Western'.

Una vez realizada la electroforesis se cortaron fragmentos de igual tamaño que el gel de papel filtro y membrana de nitrocelulosa que se humedecieron en solución amortiguadora y se ensamblaron en el siguiente orden:

Acrílico—Fibra—Papel filtro—Gel—Membrana—Papel filtro—Fibra—Acrílico.

### TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA DESDE GEL DE POLIACRILAMIDA A MEMBRANAS



El paquete completo se colocó en la cámara de transferencia cuidando que la membrana de nitrocelulosa quedara del lado del electrodo positivo (ánodo). Se corrió la transferencia a 20V durante 12 horas con flujo continuo de agua para evitar un calentamiento excesivo. Terminada la transferencia la membrana se sumergió en solución bloqueadora (leche descremada en polvo al 5 %) durante 2 horas a temperatura ambiente y luego 4 horas en presencia de los sueros positivos para el antígeno. Se lavó tres veces durante 10 minutos con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Después del último lavado la membrana se sumergió en una solución que contenía proteína A peroxidada durante 2 horas con agitación leve. Una vez más se lavó 3 veces con PBS y se reveló la membrana usando como sustrato 1-4-Cl-naftol.

#### **3.7.6 Obtención de un antisuero específico.**

Para obtener anticuerpos contra las toxinas Apx se inmunizaron gallinas ( Rhode Island) en un esquema de tres inmunizaciones cada 7 días con 400 µg de proteína en 1 ml de PBS (Sobrenadantes de los cultivos de App 1 y App 3) y 1 ml del adyuvante Rehidragel por vía intramuscular.

Las gallinas producen buenos anticuerpos y su respuesta inmunitaria es comparable a la de los mamíferos pero presenta la ventaja de ser mas rápida. Los anticuerpos son extraídos de la yema de los huevos sin que una extracción de suero sea necesaria. Las gallinas ponen cada día un huevo teniendo 50 a 100 mg de anticuerpos (IgY) de masa molecular 180 kDa. Entre las principales ventajas del uso de anticuerpos IgY se encuentra el hecho de que no reconocen el receptor Fc de los mamíferos y no fijan las proteínas del complemento.

Siete días después de la última inmunización se obtuvieron los huevos de los cuales se extrajo la yema la que se rompió cuidadosamente y se hizo pasar a través de una malla de nylon. 15 ml de HCl 3 mM se añadieron a 3 ml de yema y se ajusto el pH a 5 adicionando una solución de ácido acético al 10 %. La suspensión se incubó 4 horas a 3°C. El sobrenadante conteniendo las IgY se recolectó por centrifugación a temperatura ambiente a 5000 RPM durante 20 minutos. Un volumen igual de cloroformo se añadió al sobrenadante con ligera agitación y la mezcla se incubó a 4°C durante 12 horas. El sobrenadante se recolectó por centrifugación a temperatura ambiente 5000 RPM durante 15 minutos y se utilizo para el siguiente paso. Se añadió gota a gota durante 15 minutos una solución saturada de sulfato de amonio con agitación en frío y luego se mantuvo la mezcla con agitación a 4°C durante 12 horas. Se centrifugó a 5000 RPM durante 15 minutos y el precipitado se resuspendió en 2 ml de solución salina, a continuación se dializó contra solución salina hasta que salió toda la sal, lo cual se comprobó utilizando cloruro de bario. Después de la diálisis el antisuero se conservó en congelación a – 20 °C.

### **3.7.7 Isoelectroenfoque**

Esta técnica, se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Las moléculas anfotéricas, como los aminoácidos, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH . La región del ánodo es ácida y la del cátodo es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH tal que las moléculas que se han de separar tengan su punto isoeléctrico dentro del rango. Las sustancias que inicialmente se encuentran en regiones de

pH inferior a su punto isoeléctrico estarán cargadas positivamente y migrarán hacia el cátodo, mientras aquellas que se encuentran en medios con pH más bajos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo. La migración les conducirá a una región donde el pH coincidirá con su punto isoeléctrico, tendrán una carga neta nula y se detendrán. De esta forma las moléculas anfotéricas se sitúan en estrechas bandas donde coincide su punto isoeléctrico con el pH.

Para la realización de este ensayo se utilizó un gel de poliacrilamida al 10 % el cual se preparó en cuatro fracciones con pH diferentes para generar así un gradiente de pH desde 6 hasta 9 utilizando para ello las soluciones amortiguadoras apropiadas. Se corrieron muestras de 10 µl durante 120 minutos.

### **3.8. Dosificación de la toxina**

Para establecer la concentración adecuada de toxinas que se utilizó 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.

#### **3.8.1 Ensayo de citotoxicidad en cultivos celulares.**

Los cultivos celulares utilizados fueron las líneas celulares PK-15 y Vero. Se utilizó una micro placa de 96 pozos para cada tipo de línea celular con una confluencia del 90 % en medio RPMI (GIBCO, USA), 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

será atrapada en el gel de monooleato de glicérido. La lectura se realizó a los 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 24 horas posterior a la inoculación.

### **3.8.2 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 CaCl<sub>2</sub> 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 hemólisis 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 hemólisis.

### **3.9. Preparación del gel de monooleina acarreador de la toxinas Apx.**

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

#### **3.9.1 Preparación del antígeno**

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



Serotipo 1 ( Apx I y II)	50 %
Serotipo 3 (Apx II y III )	50 %

### **3.9.2 Obtención del gel**

Una solución acuosa conteniendo 400 µg de toxinas Apx en un volumen de 300 µl se agrego 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.

### **3.9.3 Evaluación para el gel de monooleina**

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.

### **3.9.4 Pruebas de disolución "*in vitro*"**

Para poder establecer si las toxinas son liberadas por el gel de monoleína se efectuaron pruebas de disolución "*in vitro*". Para tal fin se utilizaron celdas de Franz que separan la muestra de la solución de disolución mediante una membrana. Se colocaron entonces 200 µg del antígeno en las celdas de disolución utilizando como membrana de separación papel 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.

### 3.10. Diseño experimental

Grupos	Inmunización IM 1 c/15 días total 2	Inmunización Oral 1 c/3 días total 6	Desafío 1 x10 <sup>5</sup> ufc/ml
Vacuna subunitaria Cerdos 1-2-3-4-5	+	---	+
Bacterina-toxoide Cerdos 6-7-8-9	+	---	+
Vacuna Oral Cerdos 10-11-12-13-14	---	+	+
Control + Cerdos 15-16-17-18-19	---	---	+
Control - Cerdos 20-21-22-23-24	---	---	---

Se utilizaron 24 cerdos recién destetados, los cuales fueron desafiados en el día 37 del experimento y sacrificados dos días después del desafío.

### 3.11. Parámetros de evaluación

Signología y cuadro clínico del cerdo. Durante todo el experimento se midió la temperatura corporal de los animales. Se puso especial atención en la identificación de los signos presentes en la enfermedad como: disnea, secreción nasal, tos, boqueo, respiración abdominal, secreción ocular, conjuntivitis, estornudos y estertores húmedos.

#### 3.11.1 Prueba de ELISA

La técnica de ELISA es una prueba inmunoenzimática que forma parte de aquellos ensayos serológicos que utilizan conjugados para poder visualizar una reacción antígeno-anticuerpo. La ELISA utilizada en este estudio fue 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 éste a una concentración de 10 µg/ml utilizando solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.5. Se colocaran 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 leche descremada al 5 %. Después de lavar se agregaron los sueros problema diluidos 1:10 y se incubaron durante una hora. Se lavó 3 veces con solución amortiguadora PBS/Tween-20 y se agregaron 100 µl de anti-IgG de cerdo peroxidada diluido 1:10,000 ( SIGMA CHEMICAL, USA). Se incubó una 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 durante 10 minutos y 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].

### **3.11.2 Examen histopatológico**

Después de terminado el experimento todos los animales fueron sacrificados por electrochoque y se obtuvieron muestras de diferentes tejidos ( pulmón, tonsilas, nódulos linfáticos, bazo e hígado) para establecer el grado de lesión neumónica, los órganos que son afectados por el microorganismo, la presencia de lesiones características de la enfermedad así como para aislar el agente etiológico.

A la necropsia los pulmones de animales que presenten la forma hiperaguda de la enfermedad aparecerán con áreas de consolidación delimitadas o difusas, y de color rojo oscuro, características de una neumonía hemorrágica necrosante que se acompaña con una pleuritis fibrinosa. La cavidad torácica contiene un fluido sanguinolento.

Si la enfermedad se presenta subaguda y crónica, las lesiones macroscópicas se harán evidentes por áreas de consolidación pulmonar de apariencia nodular, tamaño variable y localizadas principalmente, en los lóbulos caudales. Al corte se

podrá observar que dichos nódulos están compuestos de tejido necrosado. A nivel de la pleura esta aparecerá con una inflamación adhesiva focal, que muchas veces puede ser la única lesión detectable.

Para el estudio microscópico de los tejidos se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina.

El aislamiento bacteriológico se realizó sembrando en medio de agar sangre y agar BHI con una estría de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, posteriormente, para obtener colonias aisladas se sembró en agar BHI suplementado con extracto de levaduras al 20 %. Las colonias individuales se serotipificaron utilizando los antisueros específicos.

### 3.11.3 Planimetría

Mediante la planimetría es posible representar sobre un plano los cuadrantes en donde se observan las lesiones producidas por la bacteria con la finalidad de establecer el porcentaje de puntos que se encuentran dañados por efecto del microorganismo. Para tal fin, al término de la necropsia se preparó un esquema para los pulmones de cada animal utilizando el formato representado en la figura 6

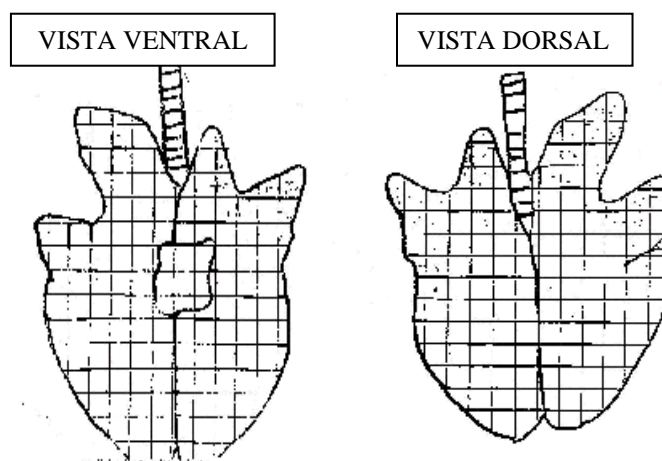


Figura 6. Formatos para la realización de la planimetría

Las zonas que presentan tejidos dañados se marcan y se recortan para finalmente medir el peso de cada una de ellas. El porcentaje de lesión se calcula entonces tomando como 100 % el peso del esquema completo.

## 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 y 3 de *A. pleuropneumoniae*. Las muestras se diluyeron 1:160 para que los valores de sus absorbancias quedaran dentro de la curva de calibración

Los resultados de las absorbancias de la curva de calibración y las muestras problema se incluyen en la tabla 4.

	A	B	C	Promedio	D. Estándar
1	0.0090	0.0099	0.0097	0.0095	0.0004
2	0.0189	0.0198	0.0199	0.0195	0.0005
3	0.0370	0.0430	0.0410	0.0403	0.0030
4	0.0800	0.0750	0.0810	0.0786	0.0032
5	0.1290	0.1360	0.1340	0.1330	0.0036
6	0.1440	0.1530	0.1500	0.1490	0.0045
App1	0.188	0.196	0.195	0.193	0.004
App3	0.126	0.148	0.137	0.137	0.011

Tabla No.4 Resultados de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. A, B y C son repeticiones de las lecturas de absorbancia. App1 y App3 son los serotipos probados. La absorbancia de las muestras se midió a 595 nm.

Para establecer la relación entre las variables probadas se preparó un gráfico (figura 6) y se obtuvo el coeficiente de correlación. El valor obtenido de 0.986 para el coeficiente de correlación permitió utilizar esta curva para la cuantificación de proteínas.

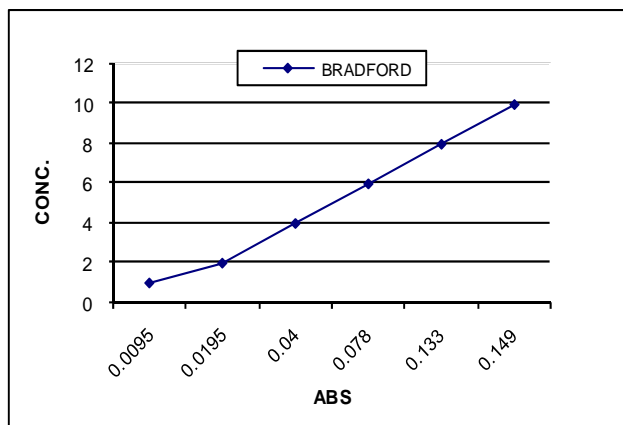


Figura 6 Gráfico para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. El coeficiente de correlación fue de 0.986. En el eje X se graficó la concentración de proteínas en el eje Y la absorbancia medida a 595 nm.

Con los datos y el gráfico obtenidos fue posible establecer la concentración de proteínas en los sobrenadantes de las muestras de App 1 y 3. Los resultados se muestran en la tabla 5.

SOBRENADANTE	CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS
App1	3.92 mg/ml
App3	2.87 mg/ml

Tabla 5 Concentración de proteínas para los sobrenadantes de App 1 y 3.

## 4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Se realizó un corrimiento electroforético para los sobrenadantes de App 1 y 3 el cual fue teñido posteriormente con azul de Coomasie. El gel obtenido se muestra en la figura 7.

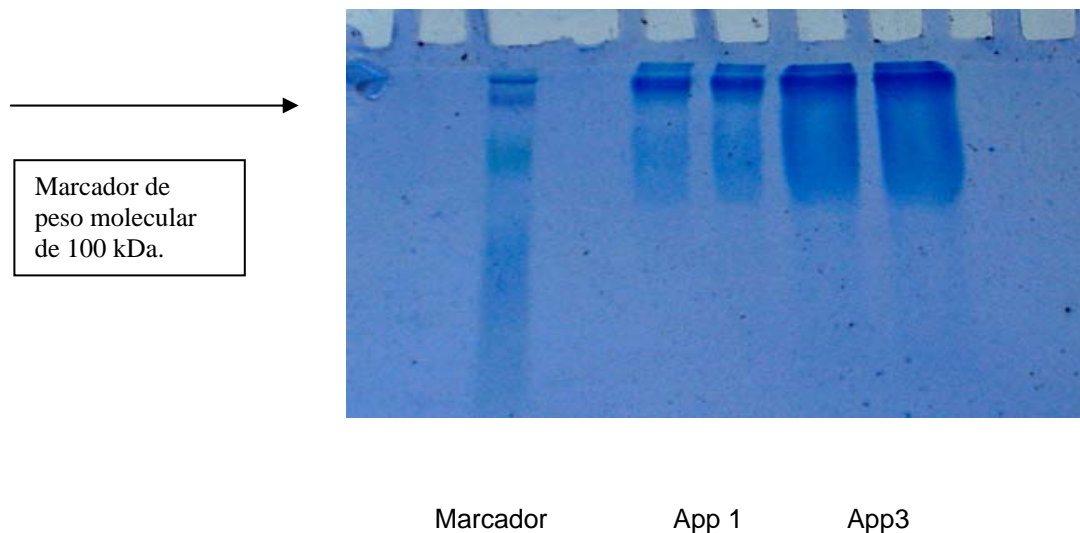


Figura 7 Gel de poliacrilamida-SDS 10 % con bandas cerca del marcador de peso molecular de 100 kDa. en los carriles con sobrenadantes de App 1y 3 ambos sobrenadantes se corrieron por duplicado.

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.

### 4.2.1 Ensayo de Westernblot

Una identificación mas contundente de las toxinas Apx se logró utilizando la prueba de Inmunotransferencia (Westernblott). En la figura 8 se muestran las bandas en papel de nitrocelulosa obtenidas tras la reacción antígeno-anticuerpo que fue revelada por la adición del sustrato de la enzima peroxidasa (alfa-cloro-naftol).



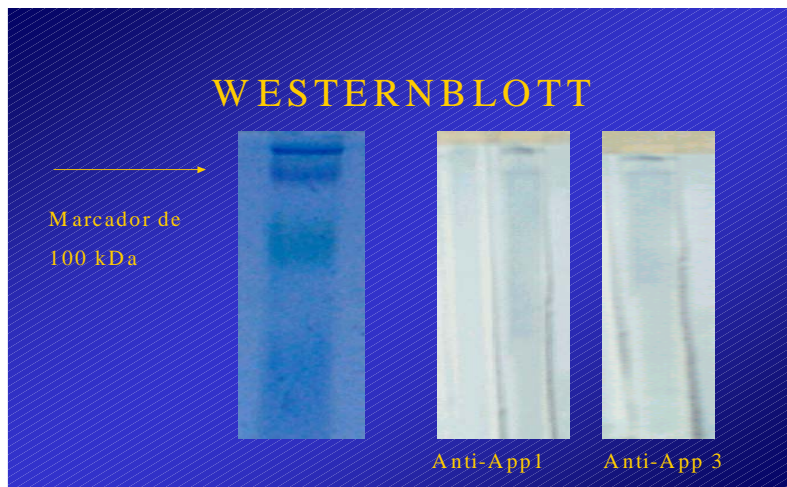


Figura 8 Izquierda gel de poliacrilamida con un marcador de peso molecular. Derecha papel de nitrocelulosa con bandas en la misma posición

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

### 4.3 Titulación de las toxinas Apx.

Para titular la cantidad de toxina que se utilizará 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 6. 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 mono capa.

Los sobrenadantes con los serotipos 1 y 3 resultaron positivos a una concentración de 300 µg/ml.

En la figura 9 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		-	+/-	+	+	+	+	-
[Proteínas] µg/ml		100	200	300	400	500	600	0

Tabla 6. Efecto citotóxico 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.

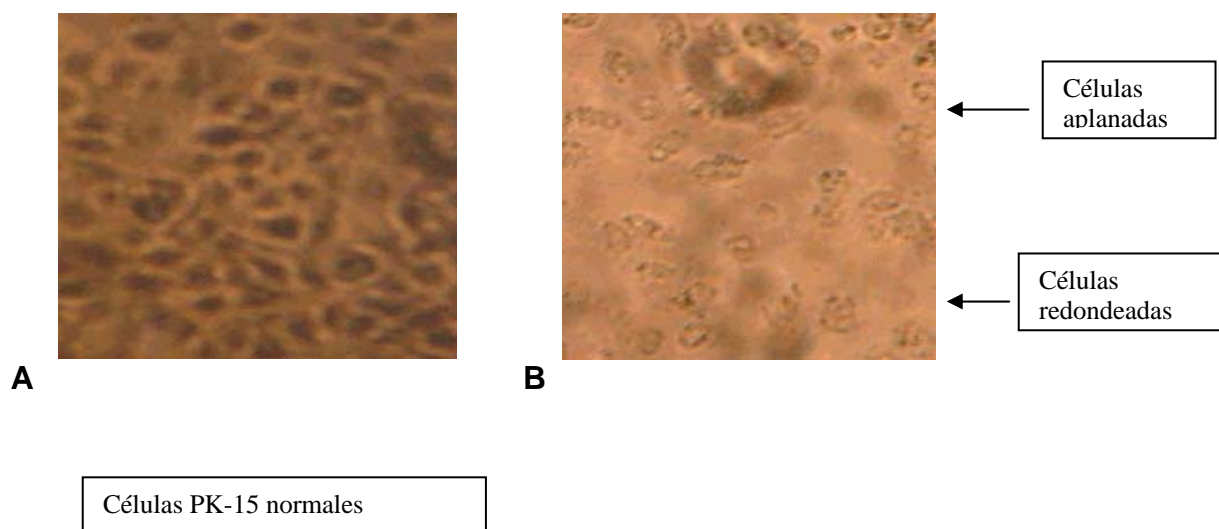


Figura 9. Efecto citotóxico sobre cultivo de células PK-15 por los sobrenadantes de App. **A**, monocapa celular normal. **B**, monocapa celular con células aplanadas y redondeadas por el efecto de las toxinas Apx.

### 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 7.

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
[Proteínas] $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	0	0
% de hemólisis	90	60.9	25.8	12.6	2.10	2.40	1.90	2.10	2.40	2.10	100

Tabla 7 Ensayo de actividad hemolítica. Absorbancias medidas a 540 nm de los tubos con eritrocitos y diferentes concentraciones de proteínas. El porcentaje de hemólisis se obtuvo utilizando el tubo 11 como 100 %.

### 4.4 Evaluación del gel de monooleato de glicérido

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 10 se muestra el gel que se obtuvo tras la adición de las toxinas Apx a la preparación.



El gel obtenido con las toxinas Apx in control preparado con monoleína y PBS.

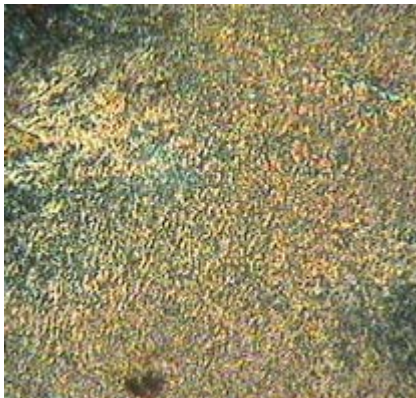
#### 4.4.2 Microscopia de luz polarizada

Figura 10. 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.

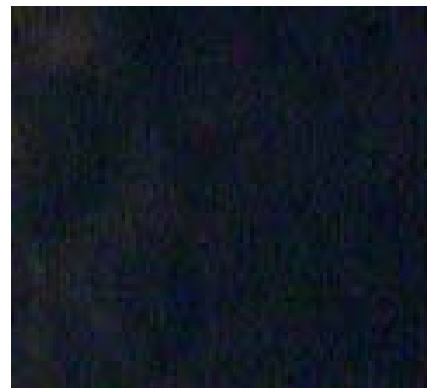
al gel

La fase cúbica del monooleato de glicérilo 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 11 se observó la fase lamelar y cúbica de la monoleína observadas en el microscopio de luz polarizada.



A



B

Figura 11 **A**, fase lamelar de la monoleína. Al no ser isotrópica la desviación de los rayos de luz polarizada permite observar una serie de formaciones cristalinas. **B**, fase cúbica de la monoleína. El campo en completa oscuridad demuestra la existencia de una fase isotrópica.

El gel de monoleína obtenido utilizando el antígeno (solución acuosa de toxinas Apx) resultó 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 8, en donde se observan las absorbancias y las concentraciones respectivas para cada membrana probada. El papel Whatman fue la membrana que interfirió menos con los resultados del ensayo.

T. (minutos)	Filtro Millipore 22 µm		Filtro Millipore 45 µm		Whatman No. 5	
	Abs. (nm)	Conc. (µg/ml)	Abs. (nm)	Conc. (µg/ml)	Abs.(nm)	Conc. (µg/ml)
15	0.0020	0.22	0.0065	0.61	0.0125	1.13
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 8 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.

Con base en 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 9

T. (minutos)	Absorbancia (nm)	[Proteínas] µg/ml
30	0.0023	0.24
60	0.0110	1.00
90	0.0335	2.94
120	0.0522	4.56
240	0.0728	6.34
480	0.0736	6.41
1440	0.0732	6.37

Tabla 9. 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 9 se construyó un gráfico para establecer en que momento la concentración de proteínas permanecía constante en el medio de disolución, indicando que no se liberaba más antígeno (figura 12).

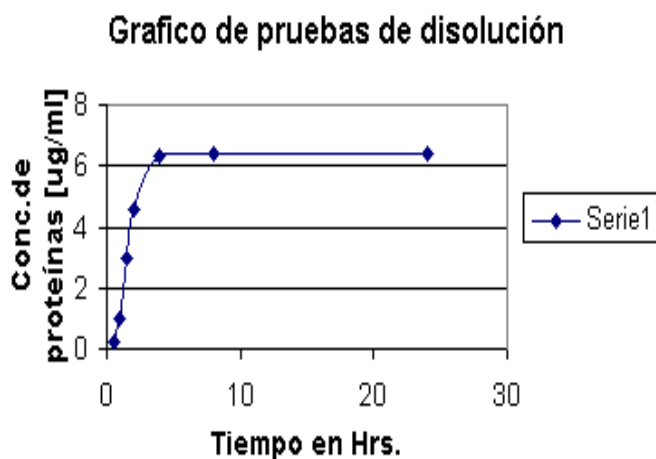


Figura 12. Pruebas de disolución "in vitro". Gráfico de liberación de proteínas cuantificadas por el método de Bradford a diferentes tiempos.

#### 4.5 ISOELECTROENFOQUE

La separación de las diferentes toxinas Apx producidas por los serotipos utilizados en el estudio no es posible mediante una electroforesis ya que estas tienen pesos moleculares muy similares, en los tres casos cercanos a 100 kDa por esto se utilizó un método diferente de separación como el isoelectroenfoque, en el cual las proteínas son separadas de acuerdo a su punto isoelectrico, esto es el pH en el cual su carga neta es cero. Los resultados en la figura 13 demuestran la aparición de dos bandas para cada serotipo, una donde el pH del gel es cercano a 6 correspondiente a la toxina Apx II y la otra en la región del gel donde el pH es cercano a 9 correspondiente tanto a la toxina Apx I como a la toxina Apx III.

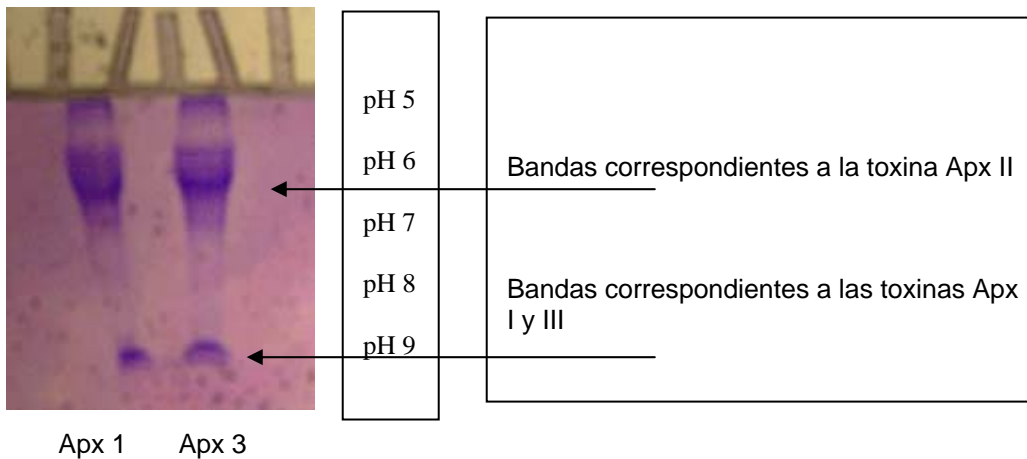


Figura 13. Dos diferentes bandas que corresponderían a las dos diferentes toxinas Apx que producen "in vitro" los serotipos 1 y 3 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

## 4.6 HISTOPATOLOGIA

Pulmones:

Los cerdos que integraron el control negativo, no presentaron cambios patológicos atribuibles a la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en todos los casos solo se presentó ligera proliferación del BALT, hiperplasia de epitelio bronquiolar en algunos lobulillos, hiperemia y escasa hemorragia así como engrosamiento pleural.

Todos los demás animales presentaron las lesiones características de la pleuroneumonía contagiosa con algunas particularidades que se señalarán a continuación.

Las lesiones características y comunes a todos estos cerdos consistieron en: hiperemia con hemorragias en alvéolos, septos interlobulillares y pleura; presencia de trombos venosos y dilatación linfática en algunos casos con trombosis, en particular en linfáticos de septos interlobulillares y pleura. La pleura y los septos interlobulillares se presentaron engrosados, principalmente por la presencia de exudado fibrinoso y en algunos casos con hemorragia, las células exudadas eran principalmente de tipo macrófago y se constataron imágenes de su transformación a células en sema. Perivascularitis mononuclear, que en la mayoría de los casos evolucionó a la presencia de células en sema. Las zonas de lesión vascular más grave se presentaron circunscriptas, demarcadas, por células en sema. Los septos alveolares se presentaron engrosados con aumento de células mononucleares de tipo monocito-macrófago en proceso de activación, en las luces alveolares fue evidente la presencia de macrófagos alveolares, que en muchos casos cubaban todo el espacio alveolar y comenzaban a transformarse en células en sema. En los mismos cortes coexistían lobulillos gravemente afectados y demarcados por las células en sema, con lobulillos poco afectados.



La presencia de PMN, activación del BALT y la hiperplasia de epitelios bronquiolares fue variable y se enumera a continuación:

Los mayoría de los cerdos inmunizados con la vacuna subunitaria no presentaron BALT activo y la presencia de PMN fue escasa, solo uno de ellos presentó abundantes PMN en bronquiolos y alveolos. Uno de los animales del grupo inmunizado con la bacterina toxoide, presentó proliferación del BALT, hiperplasia de epitelio bronquiolar, abundantes PMN, engrosamiento de pleura y septos interlobulillares con fibrina y hemorragia pero sin celulas en sema. Otro animal de este mismo grupo y la mayoría de los animales del grupo vacunado por via oral presentaron un cuadro más leve que el resto de los animales, con exudado seroso en alveolos, los cambios vasculares fueron discretos, se presentaron PMN, pero no se observaron celulas en sema, aunque se se observa activación de macrofagos alveolares. Los animales del grupo control positivo presentaron cuadro tipico de App, con hiperplasia de epitelio bronquiolar y proliferación del BALT, PMN en luces bronquiolares, alveolos y septos interlobulillares.

Tonsilas:

En tonsilas de todos los cerdos con excepción del grupo control negativo, se presentó como cambio destacable la presencia de celulas en sema, estas se presentaron inmediatamente por debajo de las criptas, en ocasiones infiltrando el epitelio, en las luces de las criptas el epitelio se desprendio y la superficie se observa tapizada por celulas en sema.

Nodulos linfaticos:

De igual forma en la mayoría de los animales sin incluir el grupo de control negativo se presentaron celulas en sema asociadas al ileo del nodulos, en el seno linfatico subcapsular y en los senos linfaticos que transcurren entre los centros germinativos. En dos animales del grupo control positivo, el linfatico aferente se observó repleto de celulas en sema.

Bazo e Hgado:

En ambos tejidos no se observaron cambios de interes. En algunos higados se oservaron lesiones sugestivas de aflatoxicosis.

#### 4.7 SIGNOLOGIA

En la tabla 10 se incluyen los resultados de las constantes fisiologicas y los signos evaluados en los animales a lo largo del estudio.

Cerdo	Temp 1	Temp 2	Dis 1	Dis 2	S.Nas.	Tos	R.Abdo.	Conjun.	Estorn.	Grupo
1	39.0	40.0	---	---	---	---	---	---	---	V.Sub.
2	38.9	37.0	---	+	---	+	---	---	+	V.Sub.
3	39.3	39.7	---	---	---	---	---	---	---	V.Sub.
4	39.3	39.9	---	---	---	---	---	---	---	V.Sub.
5	39.1	39.0	---	---	---	---	---	---	---	V.Sub.
6	39.0	38.9	---	---	---	---	---	---	---	Bac./Tox.
8	39.0	39.9	---	---	---	---	---	---	---	Bac./Tox.
9	39.2	38.3	---	+	---	---	---	---	+	Bac./Tox.
11	39.0	38.0	---	---	---	---	---	---	---	V.Oral
12	39.0	39.5	---	---	---	---	---	---	---	V.Oral
13	39.1	39.6	+	+	+	+	+	---	+	V.Oral
14	39.2	40.5	---	---	---	---	---	---	---	V.Oral
15	39.2	39.1	---	+	+	+	---	---	+	Control +
16	39.3	39.2	+	+	+	+	---	---	+	Control +
17	39.0	39.9	+	+	---	+	---	---	+	Control +
18	39.2	38.8	+	+	+	+	---	---	+	Control +
19	39.2	40.2	+	+	+	+	+	---	+	Control +
20	39.1	38.8	---	---	---	---	---	---	---	Control -
21	39.0	39.0	---	---	---	---	---	---	---	Control -
22	39.2	39.1	---	---	---	---	---	---	---	Control -
23	39.3	38.9	---	---	---	---	---	---	---	Control -
24	39.2	38.8	---	---	---	---	---	---	---	Control -

Temp 1: Media de temperaturas previas al desafio

Temp 2: Media de temperaturas posteriores al desafio

Dis 1: Disnea en reposo

Dis 2: Disnea en esfuerzo

Los animales 7 y 10 murieron antes del desafio por lo que no fueron tomados en cuenta dentro de los resultados.

#### 4.8 PLANIMETRIA

Mediante estudios de planimetría se calcularon los porcentajes de lesión observados en los pulmones de los animales sujetos a estudio. Los resultados se incluyen en la tabla 11 y un ejemplo de cómo llenar el formato en la figura 14.

CERDO	Lectura	Porcentaje de lesión	Media del grupo	Grupo
1	54	33.1	32.7	V.Sub.
2	125	42.3	32.7	V.Sub.
3	84	29.6	32.7	V.Sub.
4	112	43.1	32.7	V.Sub.
5	40	15.4	32.7	V.Sub.
6	20	7.6	15.6	Bac./Tox.
8	33	12.7	15.6	Bac./Tox.
9	69	26.5	15.6	Bac./Tox.
11	73	28.0	21.4	V.Oral
12	32	12.3	21.4	V.Oral
13	70	26.9	21.4	V.Oral
14	48	18.4	21.4	V.Oral
15	86	33.1	33.6	Control +
16	88	33.8	33.6	Control +
17	72	27.7	33.6	Control +
18	60	43.1	33.6	Control +
19	79	30.4	33.6	Control +

Tabla 11. Planimetría de los pulmones de 19 cerdos desafiados con los serotipos 1 y 3 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Los animales 7 y 10 murieron antes del desafío por lo que no fueron tomados en cuenta dentro de los resultados.

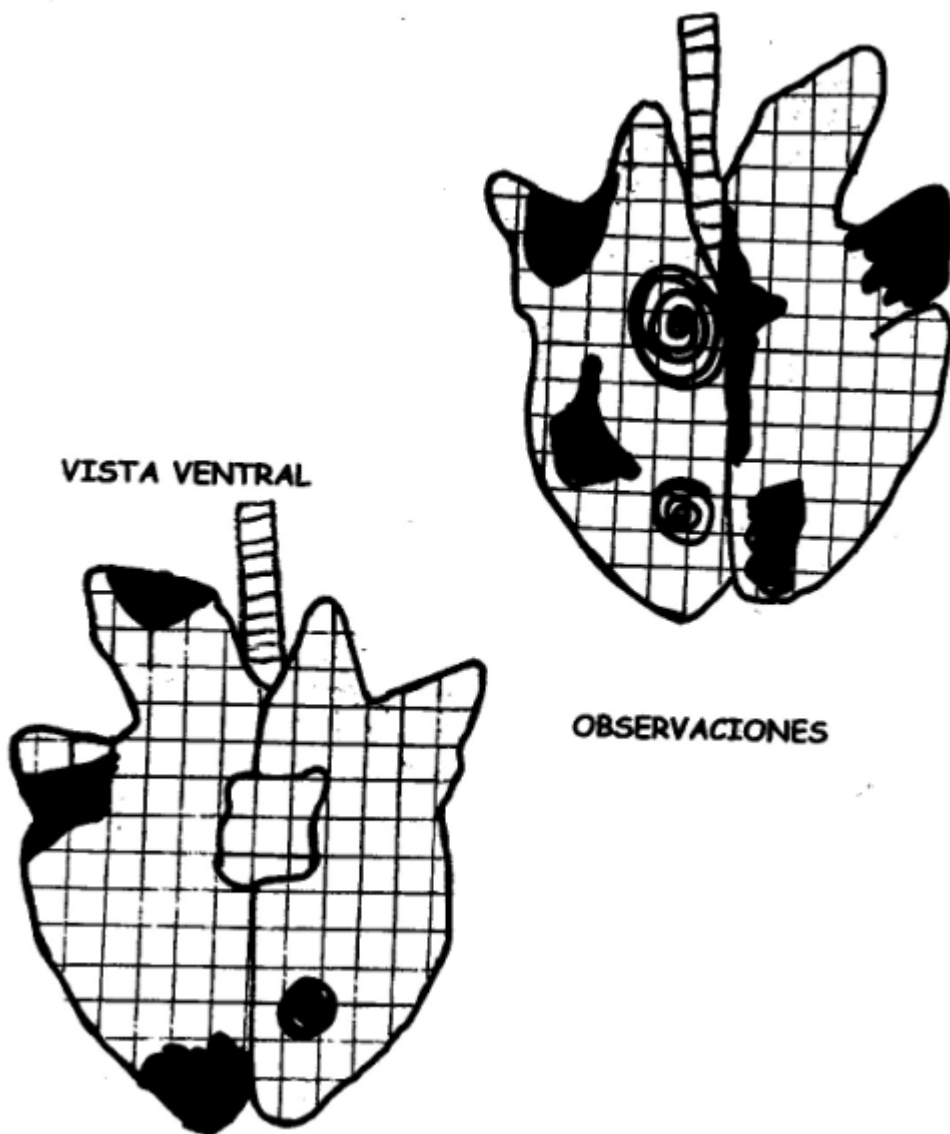


Figura 14. Ejemplo de planimetría con lesiones asociadas a infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Sobre el formato se marcan las zonas dañadas en el pulmón tomando como patrón el pulmón del animal. Se recortan las zonas marcadas y se pesan, se establece el porcentaje de lesión tomando como 100 % el peso del formato completo.

#### 4.9 PRUEBA DE ELISA

Mediante una prueba de ELISA indirecta se identificó la presencia de anticuerpos en el suero de los animales contra las toxinas Apx, utilizadas como antígeno en el ensayo. En la tabla 12 se reportan los resultados obtenidos.

CERDO	Sangrado 1	Sangrado 2	Sangrado 3	Sangrado 4	Sangrado 5	Sangrado 6	Grupo
1	0.0312	0.0685	0.0702	0.1389	0.3242	0.3123	V.Sub.
2	0.0380	0.0620	0.0633	0.1445	0.3568	0.3578	V.Sub.
3	0.0320	0.0603	0.0678	0.1789	0.3885	0.3888	V.Sub.
4	0.0376	0.0630	0.0654	0.1267	0.3789	0.3899	V.Sub.
5	0.0400	0.0716	0.0680	0.1340	0.3675	0.3708	V.Sub.
6	0.0314	0.0691	0.0711	0.1789	0.4456	0.4534	Bac./Tox.
8	0.0352	0.0617	0.0687	0.1889	0.4809	0.4789	Bac./Tox.
9	0.0301	0.0665	0.0701	0.1920	0.4765	0.4854	Bac./Tox.
11	0.0280	0.0881	0.1345	0.3185	0.3889	0.4020	V.Oral
12	0.0356	0.0543	0.1009	0.3010	0.3998	0.3999	V.Oral
13	0.0378	0.0945	0.1720	0.3997	0.4001	0.4230	V.Oral
14	0.0330	0.1341	0.1890	0.4122	0.4339	0.4486	V.Oral
15	0.0345	0.0332	0.0348	0.0333	0.0346	0.0689	Control +
16	0.0358	0.0376	0.0380	0.0375	0.0378	0.0703	Control +
17	0.0397	0.0389	0.0367	0.0388	0.0388	0.0690	Control +
18	0.0399	0.0400	0.0388	0.0394	0.0376	0.0588	Control +
19	0.0339	0.0320	0.0346	0.0366	0.0384	0.0832	Control +
20	0.0389	0.0366	0.0398	0.0400	0.0399	0.0365	Control -
21	0.0378	0.0348	0.0343	0.0356	0.0378	0.0366	Control -
22	0.0344	0.0387	0.0399	0.0388	0.0392	0.0401	Control -
23	0.0397	0.0402	0.0395	0.0403	0.0376	0.0386	Control -
24	0.0388	0.0377	0.0400	0.0388	0.0377	0.0383	Control -

Tabla 12. Lecturas de las absorbancias medidas a 492 nm de sueros de cerdos tomadas a diferentes tiempos en una prueba de ELISA indirecta. Los animales 7 y 10 murieron antes del desafío por lo que no fueron tomados en cuenta dentro de los resultados.

En la figura 15 se presenta un grafico que representa el aumento en la cantidad de anticuerpos presentes en el suero de los animales de los diferentes grupos experimentales contra las toxinas Apx con respecto al numero de dias que transcurrieron durante el experimento.

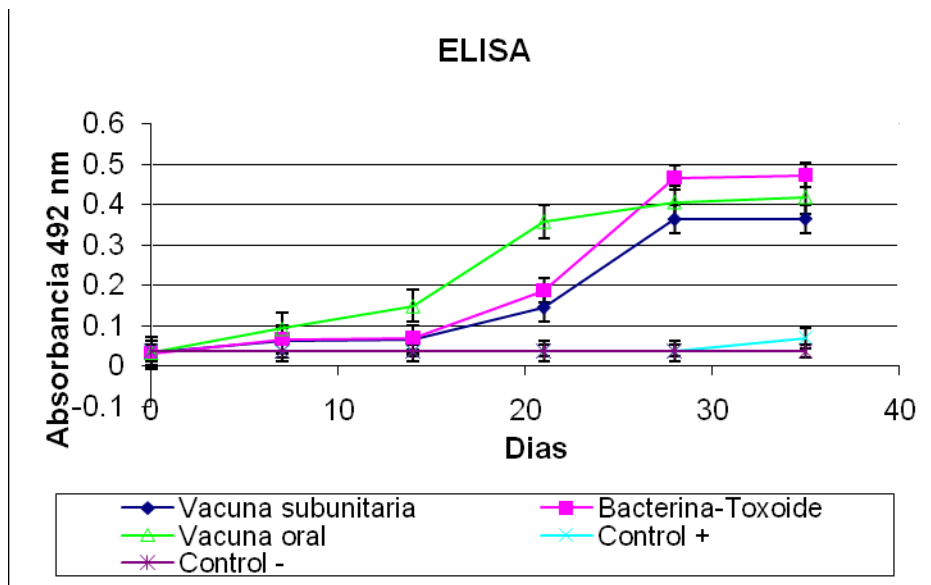


Figura 15. Identificación de anticuerpos contra las toxinas Apx. Media de las absorbancias de cada grupo experimental contra dias transcurridos en el estudio.

## 5.0 Discusión

El monooleato de glicérido demostró ser capaz de atrapar dentro de su estructura las toxinas Apx sin que esto afectara la formación de la fase cúbica. De acuerdo con Ericsson et al.[9] la fase cúbica de la monooleína puede identificarse a simple vista ya que a diferencia de otras meso fases es completamente transparente y muy viscosa lo cual coincide con los resultados observados en este estudio. Estos mismos autores postulan que una caracterización mas contundente de la formación de la fase cúbica del se obtiene mediante la microscopia 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 isótropos, aquellos que presentan igual índice de refracción en todas las direcciones. La monooleína en fase cúbica es isotrópica por lo que no desvía la luz polarizada lo cual se comprobó en este estudio al colocar una muestra del gel conteniendo 400 µg de toxinas Apx entre dos lentes polarizados en donde el segundo lente detenía el rayo polarizado por el primero, lo que da lugar a la observación de un campo visual en completa oscuridad en el microscopio de luz polarizada. El campo visual en completa oscuridad nos confirma que la inclusión de las toxinas Apx en la monooleína a la concentración probada no interfiere con la formación de la fase cúbica de esta, pudiendo funcionar así como un sistema de protección y acarreo.

Este sistema logro liberar posteriormente el antígeno. Longer et al. [22] indican que al contacto con un medio ambiente acuoso, la monooleína se hincha y forma un gel que libera un fármaco disuelto o dispersado en ella por difusión simple lenta. Esto se probó mediante las pruebas de disolución *in vitro*. Los resultados en la figura 12 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

implica 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 lo que coincide con los resultados de Longer et al [22] quienes obtuvieron un porcentaje y tiempo de liberación muy similar en sus estudios de liberación del fármaco AG 337 [22]. Otros autores como Chang et al.[4] encontraron que los fármacos incluidos dentro de la fase cúbica del monooleato de glicérido eran liberados de manera constante hasta alcanzar un porcentaje de liberación del 60 % a partir de este momento no se obtenía una liberación mayor del fármaco aunque se cambiaran las condiciones del medio de disolución, ellos argumentan que esta situación se debe a que algunas moléculas del fármaco pueden unirse a la monooleína evitando así su disolución en el medio. Sin embargo cabe mencionar que el dispositivo de prueba en este estudio no tenía la capacidad de agitar el gel permitiendo así que este pudiera disolverse por completo, situación que se espera suceda en las condiciones *"in vivo"* donde se presume que la monooleína se desintegrara por acción del peristaltismo intestinal además, tal como señalan estos mismos autores las sales biliares que degradan lípidos en el intestino del animal podrían también favorecer un mayor porcentaje de liberación [4].

Los signos medidos en los animales de diferentes grupos fueron muy similares de manera que utilizando el análisis de varianza de un factor (ANOVA) no pudo encontrarse una diferencia significativa entre ellos. De igual forma los tres esquemas de inmunización evitaron la muerte de los animales.

La planimetría permitió observar que el grupo de la bacterina-toxoide tuvo el menor porcentaje de lesión seguido del grupo inmunizado por vía oral lo cual nos habla también de la eficacia de la preparación oral. En cuanto al número de inmunizaciones utilizado, la curva de anticuerpos parece estar más en función del tiempo de exposición al antígeno que del número de inmunizaciones, sin embargo, el grupo inmunizado con el gel oral presentó una respuesta más rápida en comparación con los otros grupos experimentales. 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) [16] 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) [33] utilizando un sistema de micro esferas 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 monooleína en fase cúbica conteniendo las toxinas Apx en títulos semejantes a los de preparaciones comerciales ya existentes abre la posibilidad de desarrollar un inmunógeno de fácil preparación y administración, que utilizado por vía oral proteja contra la Pleuroneumonía Porcina,

El haber utilizado en el caso del gel oral un esquema de inmunización que incluyó varias inmunizaciones consecutivas, probablemente dio lugar a que se haya alcanzado un título de anticuerpos en el suero de los cerdos mas rápido en comparación con las preparaciones intramusculares, sin embargo el mayor título se obtuvo para el grupo que utilizo la bacterina-toxoide.

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 modificarse 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 titulo de anticuerpos producidos contra el antígeno.

## 6.0 Conclusiones

El monooleato de glicérido en fase cúbica demostró ser un buen vehículo acarreador y protector para las toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Fue capaz de incluir dentro de su estructura 400 µg/ml de toxinas Apx que posteriormente en un porcentaje cercano al 70 % fueron liberadas “*in vitro*”.

La preparación funcionó como un inmunógeno protegiendo a cerdos susceptibles de la muerte tras el desafío experimental con la bacteria y produciendo títulos de anticuerpos contra las toxinas, similares a los de dos preparaciones comerciales.

Con este estudio se abre una puerta al desarrollo de productos farmacéuticos veterinarios que utilicen la vía de administración oral mediante el sistema de acarreo y protección, los cuales pueden tener un gran impacto económico por su fácil administración y bajo costo de producción así como un manejo más práctico de las preparaciones.

## 7.0 Perspectivas

Ajustar el número de inmunizaciones orales y la concentración de proteína utilizada como antígeno.

Incluir dentro de la preparación alguna otra estructura antigénica como por ejemplo proteínas de membrana externa, en el caso de App aquellas relacionadas con la captación de hierro de las cuales se ha demostrado ya su capacidad antigénica, o bien utilizar un adyuvante que potencializara la respuesta producida por el producto.

## 8.0 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. *Veterinary Medicine. 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., Strnistschie, 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 pertussis* 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 inmuoquímica*. 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. *Inmuochemical 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, Young, 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](http://www.sanidadanimal.info/curso/6/etiologia.htm)

## 9.0 Apéndice I

### Preparación de soluciones utilizadas en la electroforesis:

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

Disover 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