



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Estudio de un termogel a base de quitosán como adyuvante para
el desarrollo de la respuesta humoral hacia Bordetella
bronchiseptica**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARTINA IGNACIA CONTRERAS GIRÓN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN CAMPUS 1.

COMITÉ TUTOR

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN CAMPUS 1.

DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el otorgamiento de la beca para los estudios de posgrado.

Esta Investigación fue realizada gracias al programa financiado por el Comité Técnico de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**), UNAM, Proyecto con Clave: **IN220815**. Así como por el Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (**PIAPI**), FES-Cuautitlán, UNAM, con Claves: **PIAPI1642, PIAPI1811 y PIAPI2009**.

Externo un entrañable agradecimiento a la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** y a la **Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán (FESC)**, por brindarme su apoyo y otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

A todo el personal del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por su disposición y amable atención en todo momento.

A los magníficos **Profesores** que directa o indirectamente participaron en la culminación de este posgrado, por brindar su sabiduría, dedicación e interés en este proyecto ¡muchas gracias!

A los profesores que fueron miembros del **Comité tutor** para la elaboración de la tesis, a mi Tutora la Dra. Gabriela Barcenás Morales, a la Dra. Susana Mendoza Elvira y el Dr. José Guillermo Ávila Acevedo, gracias por su apoyo.

A los integrantes del **Jurado** que contribuyeron mediante sus aportaciones y sugerencias a mejorar, enriquecer y revisar este trabajo, **Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez** (presidente), **Dra. Gabriela Barcenás Morales** (secretaria), **Dra. Susana Patricia Miranda Castro** (vocal), **Dr. René Álvaro Segura Velázquez** (vocal), **Dr. Guillermo Ávila Acevedo** (vocal).

Especialmente a la **Dra. Gabriela Barcenás Morales** tutora de tesis por su responsabilidad, compromiso y confianza.

A la **Dra. Patricia Miranda Castro** por su apoyo técnico y de entrenamiento en la elaboración del termogel de quitosán, por su entrega, amabilidad y amistad, por ser un aliciente en momentos difíciles y sobre todo por siempre estar para mí.

A la **Dra. Virginia Lara Sagahón** por su asesoría en la planeación, manejo de datos y análisis estadístico del presente estudio, gracias por su profesionalismo y alegría que contribuyeron a hacer más ligero el trabajo.

A la **Dra. Susana Mendoza Elvira** por su apoyo en la realización de este trabajo, por su paciencia y confianza, muchas gracias Doctora Susy.

A la **Maestra Paulina Cortes Acevedo** por su apoyo técnico y de entrenamiento en las técnicas de determinación de anticuerpos, así como sus valiosas aportaciones durante la elaboración de la tesis al compartirme sus conocimientos, que fueron fundamentales para el desarrollo y conclusión del presente trabajo.

A la **Dra. Marcela Autrán Martínez** por su ánimo incondicional y asesoría en la utilización del programa Mendeley para escribir la Bibliografía y ante todo por su amistad.

Al **Doctor Crisóforo Mercado Márquez** responsable del bioterio de la **Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM)**, por su supervisión y asesoría en el cuidado y seguimiento de los distintos grupos de ratones requeridos para este estudio y a **Don Adolfo Gómez Villarreal** por su dirección en el uso de las instalaciones del bioterio.

¡MUCHAS GRACIAS a todos Ellos!

DEDICATORIAS

Gracias a Dios nuestro padre que permite que todo sea posible y entreteje nuestros caminos.

Dedico este trabajo con mucho cariño y admiración a todo el equipo de Doctores que integran el posgrado de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán campus 1, muchas gracias por su dedicación y entrega a la loable misión de la investigación y la enseñanza, especialmente a los Doctores.

Dra. Virginia Lárez Sagahón, Dra. Susana Patricia Miranda Castro, Dra. Susana Mendoza Elvira, Dra. Gabriela Barcenás Morales, Dr. Abel Ciprian Carrasco.

A mis compañeros en el camino, a Paulina Cortes Acevedo y Marcela Autrán Martínez, a Lilly y Vladimir quienes realizan su trabajo con entrega y profesionalismo.

A mi familia con quien comparto el día a día, Ellos son los cuatro hombres de mi vida, me acompañan y alientan a seguir, en verdad son luz en el camino y el más grande apoyo en mi vida. José Fernando, Paul Fernando, Martín Alejandro y Carlos Eduardo ¡Los Amo!

A mi familia de origen quienes son mi soporte y compañía espiritual, su presencia me fortalece gracias por su cariño en especial a María de la Luz y Pascual, mis queridos padres.

¡Un reconocimiento muy especial a aquellos que aún en el anonimato han contribuido a la elaboración de este trabajo, muchas gracias!!!

“La educación es la única posibilidad de una revolución sin sangre,
No violenta y en profundidad de nuestra cultura y nuestros valores”

Fernando Savater

“No somos libres de elegir lo que nos pasa, pero si libres para
responder a lo que nos pasa”

Fernando Savater

“Hay personas que hacen nacer flores donde nadie pensaba
Que fuese posible”

P. Freire

“Una palabra nos libera de todo el peso y el dolor de la vida:
Esa palabra es AMOR”

Sófocles

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Vacunas	2
1.3. Adyuvantes	3
1.3.1. Clasificación de los adyuvantes	12
1.4. Quitosán.....	16
1.4.1. Generalidades	16
1.4.2. Aplicaciones de quitosán.....	19
1.4.3. Bases inmunológicas de la acción de quitosán	22
1.4.4. Mecanismos de acción de quitosán	23
1.4.5. Hidrogeles de quitosán.....	25
1.5. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	28
1.6. Métodos de Detección de Anticuerpos	32
1.6.1. Prueba de Aglutinación	32
1.6.2. Ensayo Inmunoabsorbente Unido a una Enzima (ELISA)	34
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. HIPÓTESIS.....	39
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo General	40
4.2. Objetivos específicos	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. Grupos de animales.....	41

5.2 Adyuvantes	43
5.2.1. Adyuvante de Freund	43
5.2.2. Elaboración del termogel de quitosán	43
5.3. Preparación de los inmunógenos de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	44
5.3.1. Cepa de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	44
5.3.2. Suspensión bacteriana inactivada con formaldehído al 0.3 %	44
5.3.3. Obtención del extracto proteico de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	45
5.3.3.1. Preparación de la suspensión bacteriana	45
5.3.3.2. Lisado de las bacterias por congelación y sonicación	45
5.3.3.3. Determinación de la concentración de proteína del extracto bacteriano	45
5.3.3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	46
5.3.3.4.1. Preparación y corrimiento de las muestras	46
5.3.3.4.2. Tinción de geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio con azul de Coomassie R250 (A.C.)	47
5.3.3.4.3. Curva patrón de la movilidad relativa de proteínas	47
5.4. Inmunización de los ratones y toma de muestras sanguíneas.....	49
5.4.1. Protocolo de inmunización	49
5.4.2. Sangrado de los animales y colección de muestras sanguíneas	50
5.5. Pruebas serológicas para determinar los niveles de anticuerpos en sueros murinos	50
5.5.1. Estandarización de la técnica de aglutinación en microplaca.....	51
5.5.2. Estandarización de la técnica de ELISA.....	51

5.6. Evaluación de los niveles de anticuerpos contra <i>B. bronchiseptica</i> en muestras séricas murinas.....	53
5.6.1. Ensayo de aglutinación en microplaca para la determinación del título de anticuerpos.....	53
5.6.2. Determinación de los niveles de anticuerpos en sueros murinos mediante la técnica de ELISA	53
5.7. Análisis Estadístico	55
6. RESULTADOS	57
6.1. Morfología de las colonias de <i>B. bronchiseptica</i> y pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria.....	57
6.2. Obtención de los extractos bacterianos	57
6.2.1. Determinación de la concentración de proteínas del extracto proteico bacteriano.....	59
6.2.2. Electroforesis de los extractos bacterianos	63
6.3. Inmunización de los ratones y toma de muestras sanguíneas.....	68
6.4. Técnicas serológicas para determinar los niveles de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> en sueros murinos	68
6.4.1. Estandarización de la técnica de aglutinación en microplaca.....	68
6.4.2. Estandarización del Ensayo ELISA	70
6.4.3. Determinación de los niveles de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> en muestras séricas murinas.....	72
6.4.3.1. Ensayo de aglutinación en microplaca para la determinación del título de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i>	72
6.4.3.2. Análisis estadístico de resultados de la prueba de aglutinación en microplaca	76
6.4.3.3. Determinación de los niveles de anticuerpos en sueros murinos por la técnica de ELISA	84
6.4.3.4. Análisis estadístico de resultados prueba ELISA.....	91
7. DISCUSIÓN	100

7.1. Características del termogel de quitosán	102
7.2. Técnicas de aglutinación y de ELISA para determinar los niveles de títulos de anticuerpos contra <i>B. bronchiseptica</i> en sueros murinos cepa CD1.....	105
7.3. Efecto del termogel de quitosán como adyuvante	112
8. CONCLUSIONES	116
9. APÉNDICES	117
9.1. Apéndice 1. Preparación de Geles	117
9.2. Apéndice 2. Preparación de Soluciones	120
10. REFERENCIAS	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Uso de adyuvantes en vacunas.	7
Figura 2. Estructuras químicas de quitina y celulosa	16
Figura 3. Estructura de quitosán	18
Figura 4. Reacción de desacetilación de quitina	19
Figura 5. Curva estándar para la determinación de la concentración de proteínas	61
Figura 6. Patrón electroforético del extracto proteico de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	64
Figura 7. Curva patrón de proteínas elaborada con los estándares de peso molecular empleados en la técnica de electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS	66
Figura 8. Prueba de aglutinación en microplaca empleando la suspensión de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	69
Figura 9. Estandarización de la técnica de ELISA para la determinación de los niveles de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i>	71
Figura 10. Niveles graficados de títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> obtenidos en la prueba de aglutinación empleando los sueros de los ratones cepa CD1 correspondientes a los días 0, 38 y 105.....	75
Figura 11. Valores de medias con el 95 % de confianza, de Log del valor del título de anticuerpos aglutinantes contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> en sueros murinos y el tiempo (días) de sangrado.	77
Figura 12. Valores graficados de medias con el 95 % de confianza del Log del promedio de los valores de los títulos de anticuerpos aglutinantes contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> en sueros murinos en el día 0 y los días 38 y 105 postinmunización.	82
Figura 13. Valores de DO correspondientes a los niveles de títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> presentados por los sueros murinos del día 0 (basal) en la prueba de ELISA	85

Figura 14. Valores graficados del promedio de DO en la prueba ELISA de las diluciones efectuadas a los sueros de ratones cepa CD1 correspondientes al día 105 postinmunización.	86
Figura 15. Obtención del valor de título de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por la técnica ELISA en sueros murinos colectados el día 105.	88
Figura 16. Valores de DO resultado de la prueba ELISA y del Log del recíproco de la dilución dividido por 100, correspondientes a todos los sueros de ratones cepa CD1 inmunizados con <i>Bordetella bronchiseptica</i> del día 105 postinmunización ...	92
Figura 17. Ajuste del modelo log-logístico a los valores graficados de DO correspondientes a la presencia de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> obtenidos en las diferentes diluciones (graficadas como el Log del recíproco de la dilución/100) de los sueros murinos del día 105 postinmunización.	93
Figura 18. Ajuste del modelo log-logístico a los valores graficados de DO correspondientes a la presencia de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> obtenidos en las distintas diluciones (graficadas como el Log del recíproco de la dilución/100) de los sueros murinos del día 105 postinmunización.	94
Figura 19. Representación gráfica de los logaritmos de los valores de los títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> obtenidos de los sueros murinos en el día 105 postinmunización, agrupados de acuerdo al tipo de adyuvante y de antígeno utilizado.....	96
Figura 20. Comparativa de medias de los valores de los logaritmos de los títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> en sueros murinos, entre los dos tipos de antígenos, los dos tipos de adyuvantes y la SSF en los sueros murinos del día 105.....	98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación entre las aplicaciones de los adyuvantes y la relación eficiencia/seguridad en animales y humanos.	9
Tabla 2. Clasificación de adyuvantes y ejemplos.....	14
Tabla 3. Grupos de ratones cepa CD1 inmunizados con <i>Bordetella bronchiseptica</i> , número de animales por grupo, adyuvante empleado y tipo de inmunógeno.....	42
Tabla 4. Pruebas bioquímicas realizadas a <i>Bordetella bronchiseptica</i> cepa LBF.....	58
Tabla 5. Concentraciones de albúmina sérica bovina y valores promedio de densidad óptica (DO) correspondientes a la curva estándar de proteínas.	60
Tabla 6. Determinación de la concentración de proteínas en el extracto proteico de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	62
Tabla 7. Proteínas contenidas en el estándar de pesos moleculares.	65
Tabla 8. Pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto proteico de <i>Bordetella bronchiseptica</i> cepa LBF obtenidas en el corrimiento electroforético del gel de poliacrilamida-SDS.	67
Tabla 9. Valores de los títulos de anticuerpos aglutinantes de las muestras sérica murinas obtenidos en la prueba de aglutinación en microplaca correspondientes a los días 0, 38 y 105.	74
Tabla 10. Valores obtenidos en la prueba estadística ANOVA de los niveles de títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i>	79
Tabla 11. Comparaciones múltiples de las medias de los valores de los títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por la técnica de aglutinación obtenidas en el día 38.	81
Tabla 12. Comparaciones múltiples de las medias de los valores de los títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por la técnica de aglutinación obtenidas el día 105.	83
Tabla 13. Valores de títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> de las muestras sérica murinas obtenidos en la prueba ELISA correspondientes al día 105 postinmunización.....	89
Tabla 14. Valores de la prueba estadística ANOVA de los niveles de títulos de anticuerpos contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> en sueros murinos determinados por la prueba ELISA en el día 105 postinoculación.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

1 IFN	Interferon tipo 1
3M	3 Molar
Ac/HLY	Adenilato ciclasa
ACF	Adyuvante completo de Freund
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
ANOVA	Anàlisis de Varianza
APC	Célula Presentadora de Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
BSA-PVA-PVP	Albúmina sérica bovina-PVA-PVP
CPA	Células presentadoras de antígenos
CpG	Oligonucleótidos
Da	Daltons
DDA	Bromuro de dimetil dioctadecil amonio
DL	Dosis letal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
EMEA	European Agency for Evaluation of Medicinal Products
Ex	Extracto proteico
F	Adyuvante de Freund
FDA	Food and Drugs Administration
FHA	Hemaglutininas filamentosas
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GDA	Grado de Desacetilación
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HPV	Virus del papiloma humano
HSV	Virus del herpes simple
IP	Intraperitoneal
kDa	kilo Dalton
Log	Logaritmo
LPS	Endotoxina lipopolisacárida
M	Molar
MAT	microaglutinación
MDP	Muramil dipéptido
min	minuto
ml	mililitros

MM	Masa molecular
MPL	Monofosforil lípido A
NBP	Polímeros no iónicos en bloque
NK	Natural killer
OPD	Orto-fenilendiamina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-BSA	PBS-Albúmina sérica bovina
PBS-T	PBS-Tween-20
pHs	Potenciales de hidrógeno
PM	Peso Molecular
PRN	Pertactinas
PVA	Poly (vinyl alcohol)
PVP	Poly(vinylpyrrolidinone)
Q	Quitosán
RAP	Rinitis atrófica porcina
Rf	Coefficiente de movilidad relativa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SS	Solución salina
SSF	Solución salina fisiológica
STING	Proteína adaptadora de estimulador de genes de interferón
Su	Suspensión bacteriana
TBIC	Traqueobronquitis Infecciosa Canina Aguda
ug	Microgramos
ul	Microlitros
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLP	Partículas tipo virus

RESUMEN

El proceso de inmunización ha favorecido de una manera sorprendente la calidad de vida de los organismos realizándose avances inimaginables en el área de la salud, con la finalidad de optimizar este proceso la industria farmacéutica incluye actualmente el uso de biopolímeros para la elaboración de vacunas; investigaciones recientes han mostrado que el uso de un polisacárido denominado quitosán, en forma de termogel permite una gran retención de fármacos, así como una liberación prolongada de éstos en un nivel adecuado dentro de un organismo, resultando interesante analizar su efecto como adyuvante, sustancia que posee la propiedad de acelerar, prolongar o potenciar la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados (Prabaharan y Mano, 2005).

Objetivo: Determinar la función del termogel a base de quitosán como adyuvante en el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral contra *Bordetella bronchiseptica* y su comparación con el adyuvante de Freund, empleando un modelo murino.

Métodos: Se realizó la comparación entre el uso de un termogel a base de quitosán como adyuvante y el adyuvante de Freund, cada uno de ellos se mezcló con suspensión bacteriana o con extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica* para analizar el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica **inducida en contra de *B. bronchiseptica***. Para ello se trabajaron nueve grupos de 10 ratones cepa CD1 por tratamiento, los animales se inocularon por vía intraperitoneal los días 0, 28 y 97, incluyendo los grupos controles necesarios; las obtenciones de las muestras sanguíneas se efectuaron los días 0, 38 y 105 del experimento. Posteriormente se estandarizaron los ensayos serológicos de aglutinación en microplaca y de ELISA, después se llevó a cabo la determinación de los niveles de anticuerpos específicos a *B. bronchiseptica* presentes en las muestras séricas por medio de ambas técnicas.

Resultados: Los niveles de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* **obtenidos en** los sueros de todos los grupos de ratones en el día cero (basales) resultaron ser negativos. Los resultados registrados mediante la técnica de aglutinación en microplaca en los días 38 y 105 revelaron que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos tratados con distinto antígeno (suspensión y extracto proteico) pero si entre los dos tipos de adyuvantes utilizados (quitosán y Freund) ($p < 0.05$). Mientras que los valores promedio de los títulos de anticuerpos determinados con la técnica ELISA muestran que en el día 105 fueron equivalentes en los grupos tratados con quitosán que en los tratados con adyuvante de Freund ($p > 0.05$), independientemente del tipo de antígeno utilizado, además se describió que el valor del título promedio de anticuerpos es mayor en aquellos grupos que utilizaron extracto bacteriano que los que utilizaron suspensión bacteriana ($p < 0.001$), no influyendo el tipo de adyuvante.

Conclusiones: El termogel de quitosán actuó como un adyuvante en el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral contra *Bordetella bronchiseptica* en un modelo murino, al ser comparado con el adyuvante de Freund en la prueba de aglutinación en microplaca se encontró que los niveles de anticuerpos aglutinantes contra la bacteria fueron mayores en los animales que fueron tratados con el termogel de quitosán que en aquellos tratados con

el adyuvante de Freund sin influir el tipo de antígeno utilizado; sin embargo, cuando se empleó como método de medición de los niveles de anticuerpos la prueba ELISA, tanto el termogel de quitosán como el adyuvante de Freund presentaron una capacidad similar en la estimulación de la producción de anticuerpos, obteniéndose valores equivalentes con ambos adyuvantes, se destaca que los niveles de anticuerpos fueron mayores en los ratones inoculados con extracto proteico que en aquellos que fueron tratados con suspensión bacteriana independientemente del adyuvante utilizado.

Palabras clave: Inmunización, vacunas, anticuerpos, polisacáridos, biopolímeros, termogel, quitosán, adyuvante, adyuvante de Freund, respuesta inmune, *Bordetella bronchiseptica*.

ABSTRACT

The immunization process has favored in a surprising way the quality of life of organisms making unimaginable advances in the health area, with the aim of optimizing this process, the pharmaceutical industry currently includes the use of biopolymers in the vaccines production. Recent research has shown that the use of the chitosan polysaccharide in the form of a thermogel, allows a large retention of drugs, as well as a prolonged release of these at a high level within an organism, turning out interesting to analyze its effect as an adjuvant, a substance that has the property of accelerating, prolonging or enhancing the specific immune response against inoculated antigens (Prabaharan y Mano, 2005).

Objective: Determine the function of the chitosan-based thermogel as an adjuvant in the development of a humoral immune response against *Bordetella bronchiseptica* and its comparison with Freund's adjuvant, using a murine model.

Methods: The comparison between the use of a chitosan-based thermogel as an adjuvant and Freund's adjuvant was made, each one mixed with bacterial suspension or the protein extract of *Bordetella bronchiseptica* to analyze the development of a specific immune response to *B. bronchiseptica*, for it nine groups of 10 CD1 strain mice were tested per treatment, then the inoculation of the animals was carried out intraperitoneally on days 0, 28 and 97, including the necessary control groups; The blood samples were obtained on days 0, 38 and 105 of the experiment. Subsequently, the serological tests of agglutination in microplate and ELISA were standardized to carried out the determination of the levels of specific antibodies against *B. bronchiseptica* presented in the serum samples, through both techniques.

Results: Antibody levels against *B. bronchiseptica* from sera obtained in all groups of mice on day zero (basal) were found to be negative. The results obtained by the microplate agglutination technique in the days 38 and 105 reveal that there is no significant difference ($p > 0.05$) between the groups treated with different antigen (suspension and protein extract) but there is a difference between the two types of adjuvants (Freund and chitosan) ($p < 0.05$). Meanwhile the average values of the antibody titers obtained with the ELISA technique showed that on day 105 were equivalents in the groups treated with chitosan and those treated with Freund's adjuvant ($p > 0.05$), regardless of the type of antigen used, in addition it was described that the average antibody titer value is higher in those groups that used bacterial extract than those that used bacterial suspension ($p < 0.001$), not influencing the type of adjuvant.

Conclusions: The chitosan thermogel acted as an adjuvant in the development of a humoral immune response against *Bordetella bronchiseptica* in a murine model, when compared to Freund's adjuvant, in the microplate agglutination test, it was found that the levels of agglutinating antibodies against the bacteria were higher in the animals that were treated with the chitosan thermogel than in those treated with Freund's adjuvant without influencing the type of antigen used; However, when the ELISA test was used as a method for measuring antibody levels, both the chitosan thermogel and Freund's adjuvant had a similar capacity in stimulating antibody production, obtaining equivalent values in both

methods. Highlights that antibody levels were higher in mice inoculated with protein extract than in those that were treated with bacterial suspension regardless of the adjuvant used.

Keywords: Immunization, vaccines, antibodies, polysaccharides, biopolymers, thermogel, chitosan, adjuvant, Freund's adjuvant, immune response, *Bordetella bronchiseptica*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El ser humano busca continuamente una solución a los problemas de salud que se le presentan, orientado a incrementar su calidad de vida y asegurar la supervivencia. Sin duda uno de los más afortunados descubrimientos en tema de salud fue realizado gracias al médico Inglés Edward Jenner en 1796, quien es considerado padre de la inmunología y benefactor de la humanidad al demostrar que los seres vivos poseen la sorprendente capacidad de desarrollar una respuesta inmune en presencia de algunos antígenos causantes de enfermedades, hecho que suscitó la inmunoprofilaxis a través de la vacunación permitiendo el control de un sinnúmero de enfermedades infecciosas algunas aún no controladas o reemergentes (Mejía-Martínez *et al.*, 2010; Batista-Duharte *et al.*, 2014; Arshud *et al.*, 2015).

Las vacunas tienen el propósito de inducir una respuesta inmunológica específica, llevándose a cabo el reconocimiento de una parte del antígeno para iniciar el desarrollo de una respuesta inmune efectora y de memoria, logrando así una protección contra los agentes patógenos. Inicialmente las vacunas fueron elaboradas solamente a partir de microorganismos completos ya sea muertos o vivos atenuados, sin embargo, se corría el riesgo potencial de que se presentara una reactividad a sus componentes, o una reversión de la virulencia de la bacteria; en la actualidad y con la finalidad de prevenir estos problemas, se han desarrollado vacunas formuladas a base de subunidades de microorganismos, que contienen antígenos purificados o recombinantes, haciéndolas más específicas y seguras por la baja virulencia que poseen no obstante, se ha documentado que presentan una menor inmunogenicidad que las obtenidas de microorganismos completos, haciendo patente la necesidad de sustancias adyuvantes, las cuales poseen propiedades biológicas adecuadas dirigidas a potenciar la efectividad de las vacunas y a inducir una vigorosa respuesta inmune a los antígenos administrados

(Morris *et al.*, 1999; Abbas *et al.*, 2000; Schijns VE., 2000; Vogel, 2000; Franco *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 2018).

1.2. Vacunas

Una vacuna es una preparación biológica destinada a generar inmunidad contra una enfermedad mediante la producción de anticuerpos, para eliminar, prevenir o controlar estados patológicos, las primeras vacunas fueron preparadas a partir de microorganismos vivos atenuados, utilizando organismos debilitados que han perdido la virulencia después de ser sometidos a prolongados crecimientos en cultivos, conservando la antigenicidad y la capacidad para causar una infección e inducir una respuesta inmunitaria vigorosa que genera protección de larga duración en el huésped, para ello se requieren pocas dosis sin embargo, presentan algunas desventajas puesto que estas vacunas deben permanecer a bajas temperaturas y no pueden ser administradas a personas con sistemas inmunitarios débiles, ni a pacientes con transplantes de órganos, algunos ejemplos son la vacuna de sarampión, la vacuna de paperas, la vacuna de rubéola, la vacuna de rotavirus, la vacuna de viruela, la vacuna de varicela, la vacuna de la fiebre amarilla (Salud, 2008; Megía González, 2020).

Las vacunas se pueden clasificar de acuerdo a su composición, a la tecnología de fabricación y a su utilización, tomando en consideración estos puntos se dividen principalmente en cuatro tipos de vacunas (Megía González, 2020).

- a) Las vacunas inactivas se preparan con los microorganismos muertos que no ofrecen una protección tan potente como las vacunas elaboradas con microorganismos vivos, por lo que se requiere de la administración de varias dosis (vacunas de refuerzo) para obtener una respuesta inmunológica eficaz, algunas vacunas de este tipo son hepatitis tipo A, rabia, gripe, poliomielitis.
- b) Por otra parte, las vacunas de subunidades, recombinantes, polisacáridas y combinadas, se elaboran con determinadas fracciones del microorganismo como proteínas, azúcares o cápsulas y son capaces de generar una respuesta

inmunológica que va dirigida solo a las fracciones utilizadas para la preparación de la vacuna, presentan la ventaja de ser utilizadas por cualquier persona que las requiera independientemente de su condición de salud o de presentar un sistema inmunitario debilitado, proporcionan protección contra la tosferina, el virus del papiloma humano (HPV), enfermedades neumocócica, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo b.

- c) En lo que respecta a las vacunas con toxoides utilizan la toxina proveniente del microorganismo que provoca la enfermedad, para inducir una respuesta inmunitaria dirigida hacia ella y no hacia el microorganismo, se requieren dosis de refuerzo para asegurar una continua protección contra las enfermedades, algunas vacunas de este tipo son la de tétanos y la de difteria.
- d) Recientemente han surgido vacunas de tercera generación que son muy eficaces en la inducción de respuestas inmunológicas potentes, están basadas en moléculas de ácidos nucleicos por lo que se les denomina vacunas de ADN y de ARN (Tang *et al.*, 1992; Rivers *et al.*, 2006).

1.3. Adyuvantes

A través del tiempo se han evaluado las propiedades adyuvantes de diversas sustancias tanto naturales como sintéticas que conforman un grupo de compuestos estructuralmente diverso, sin embargo, algunas de ellas provocan efectos tóxicos y reacciones alérgicas e inflamatorias al ser administradas en los organismos. Los adyuvantes son elementos clave para lograr una generación de vacunas direccionadas a solucionar los problemas de prevención de enfermedades (González y Santos, 2011). Dentro de las ventajas que se persiguen al utilizar un adyuvante es que además de ser un inmunopotenciador, se reduzca la cantidad de antígeno requerida, así como el número de aplicaciones necesarias para lograr la inmunización adecuada, favoreciendo de esta forma a los grupos más vulnerables de la población, específicamente a los recién nacidos, ancianos y a las personas

inmunocomprometidas (Breyer, 1998; Vogel, 2000; O'Hagan *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2018).

Adyuvante es un término que deriva de la palabra latina *adyuvare* verbo que significa auxiliar o ayudar, para que una sustancia sea considerada adyuvante se requiere que reúna varias características, entre las cuales se encuentran que sea biodegradable, de fácil fabricación, de bajo costo, que no sea tóxica, no debe inducir autoinmunidad, ni ser mutagénica, carcinogénica o teratogénica, debe ser químicamente bien definida y estable por largo tiempo en diferentes condiciones de temperatura y pH, además de que su administración debe ser sencilla y segura para lograr combinarse simultáneamente con una amplia gama de vacunas, estimulando el desarrollo de una respuesta inmune efectiva y específica hacia el antígeno de interés. Concretamente los adyuvantes pueden actuar incrementando la inmunogenicidad de los antígenos así como la velocidad y la duración de la respuesta, induciendo la inmunidad en los organismos tanto en mucosas como potenciando la defensa celular y la elevación de los títulos de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) (Singh y O'Hagan, 1999; Schijns, 2000; O'Hagan *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004; Mejía-Martínez *et al.*, 2010; Arshud, 2015).

Cuando un adyuvante es administrado simultáneamente con un antígeno, se tiene el objetivo de proteger al individuo estimulando el sistema inmune para responder contra un microorganismo dañino (Batista-Duarte y col., 2011; Bellanti, 2016). La presencia de adyuvantes en las vacunas se remonta hacia 1920, cuando un médico veterinario de nombre Gastón Ramon del Instituto Pasteur de Francia (1886-1963) desarrolló el toxoide de la difteria; así mismo, de forma independiente en 1926 en Londres, Alexander Thomas Glenny y sus colaboradores probaron la actividad adyuvante de los compuestos que contienen aluminio, utilizando precisamente una vacuna de toxoide diftérico precipitado en óxido de aluminio, a través de estas investigaciones se concluyó que los compuestos de aluminio presentan una capacidad limitada, para inducir respuestas inmunológicas potentes con antígenos de un alto grado de purificación. Más adelante Thibault y Richou en 1936 utilizaron

como adyuvante Quil A, una saponina obtenida de la corteza de *Quillaja saponaria* un árbol Sudamericano (Straw *et al.*, 1985; Del Giudice, 2005; Uberos, 2013).

En coincidencia en 1937, Freund y colaboradores elaboraron una emulsión formulada a base de agua en aceite mineral que contenía la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* muerta, conocida como adyuvante completo de Freund (ACF), este es uno de los adyuvantes más potentes y reactogénico que se utilizan en la preparación de vacunas, ha sido empleado desde hace aproximadamente 50 años para producir antiseros de animales y en estudios de investigación cuando se poseen pequeñas cantidades de antígenos o bien cuando éstos presentan una baja inmunogenicidad, sin embargo es altamente tóxico para los seres vivos, posiblemente se debe a su limitada biocompatibilidad y biodegradabilidad; hasta hoy no se cuenta con adyuvantes que posean las cualidades de ACF (Freund *et al.*, 1937; Straw *et al.*, 1985; Franco *et al.*, 2004; Batista-Duarte *et al.*, 2011).

En 1947 Greenberg y Fleming agregaron el toxoide diftérico a la vacuna de tosferina con el propósito de incrementar la protección que brinda (Johnson y col., 1956). Posteriormente, en 1956, Johnson y colaboradores utilizaron la endotoxina lipopolisacárida (LPS) de *Salmonella typhi* como adyuvante (Greenberg y Fleming, 1947; Sierra y Tamargo, 2011; Uberos, 2013; Batista-Duarte *et al.*, 2014).

Por otra parte, Stuart- Harris en 1969, trabajó con el adyuvante completo de Freund eliminando la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* de la emulsión, permaneciendo el aceite mineral con un dispersante para formular el adyuvante incompleto de Freund (AIF), este adyuvante ha sido utilizado para la elaboración de vacunas, cabe mencionar que el aceite mineral empleado en estos adyuvantes (ACF y AIF) tiene dos funciones, una es aumentar la respuesta inmune y la otra es favorecer la liberación lenta del antígeno (Freund, 1937; Stuart-Harris, 1969; Batista-Duarte *et al.*, 2011).

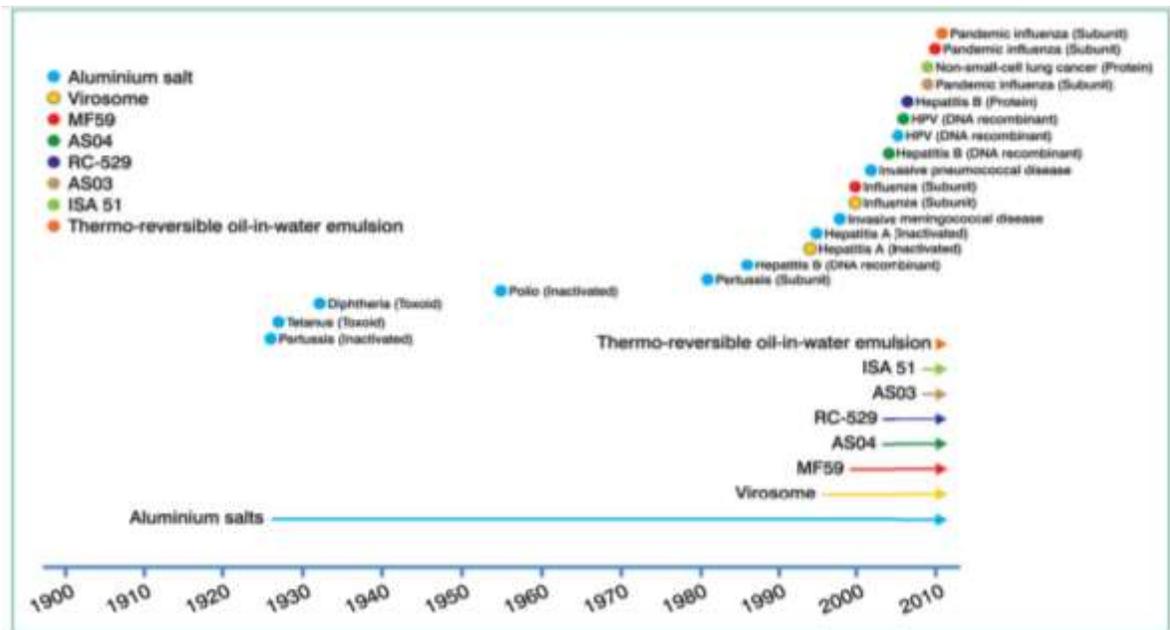
Tanto el ACF como AIF, ocasionan que el estímulo permanezca por un lapso mayor de tiempo, aunque el ACF posee una mayor eficacia debido a la presencia de

muramil-dipéptido de la pared celular de la micobacteria capaz de provocar la activación de macrófagos e inducir la formación de granulomas (Freund *et al.*, 1937; Straw *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1999; Cortés Hinojosa, 2009).

Tiempo después se realizaron investigaciones acerca de la actividad adyuvante de los componentes bacterianos y fue hasta 1974 que Lederer y colaboradores reportaron que *Mycobacterium tuberculosis*, presente en ACF, contiene muramildipéptido (MDP), compuesto considerado adyuvante por sí mismo (Stuart-Harris, 1969; Greenberg y Fleming, 1947; Sierra y Tamargo, 2011; Batista-Duharte *et al.*, 2014).

En los 25 años posteriores varios adyuvantes se incluyeron en las vacunas autorizadas con licencia, los más comunes consistieron en emulsiones de aceite en agua capaces de inducir el desarrollo de robustas respuestas inmunes humorales y celulares, con el potencial para ayudar a prevenir enfermedades infecciosas de significancia global, incluso se llevaron a cabo estudios con fines militares conduciendo a la elaboración de adyuvantes a base de escualeno tales como el MF59, que recibió la licencia de autorización para ingresar en el mercado europeo en 1997 junto con los virosomas (vesículas diminutas de forma esférica con proteínas virales en la membrana de fosfolípidos) (Seubert y col., 2008). Más recientemente se han desarrollado diferentes mezclas de adyuvantes con el propósito de potenciar la respuesta inmunológica provocada por cada una de las sustancias utilizadas, algunas de esas formulaciones se denominaron sistemas adyuvantes (AS), tales como el AS04 (monofosforil lípido A (MPL) mezclado con sales de aluminio), que fue aprobado para su uso como adyuvante en 2005, el AS03 (emulsión de aceite en agua con escualeno, vitamina E (DL- α -tocoferol) y polisorbato), recibió su licencia como adyuvante en 2008 por la FDA en los Estados Unidos, en la **Figura 1** se muestra una línea del tiempo que agrupa a los diferentes adyuvantes de vacunas utilizados hasta el año 2010, seguidos de otros empleados más recientemente (O'Hagan *et al.*, 2007).

Figura 1. Uso de adyuvantes en vacunas.



Línea de tiempo que marca la aparición de los diferentes adyuvantes utilizados en vacunas empleadas en humanos, los adyuvantes usados para cada tipo de vacuna citada están interrelacionados de acuerdo al color correspondiente, las sales de aluminio fueron los únicos adyuvantes con licencia en las formulaciones de vacunas humanas hasta 1990, desde entonces varios adyuvantes nuevos han sido descubiertos y aprobados. (Garçon *et al.*, 2011).

También se propuso como alternativa el uso de adyuvantes poliméricos no biodegradables en organismos superiores, encontrando que presentan una elevada toxicidad y tienden a acumularse en los tejidos, entre ellos se encuentran la poliacrilamida y el polimetil metacrilato que están prohibidos actualmente, más adelante se utilizaron polímeros sintéticos como polialquilmecanoacrilatos, poliésteres (copolímeros del ácido láctico y glicólico), así como moléculas naturales a base de proteínas como la albúmina, el colágeno y la gelatina; recientemente, se ha recurrido al empleo de moléculas de polisacáridos naturales entre ellos el ácido algínico, ácido hialurónico y el quitosán (Murillo *et al.*, 2001).

Varias sustancias naturales y derivados sintéticos con propiedades adyuvantes son utilizados en formulaciones de vacunas veterinarias y humanas, en la **Tabla 1** se encuentra una relación entre las aplicaciones de los adyuvantes en vacunas para animales de laboratorio, animales para la alimentación, animales de compañía y en humanos, así como la relación eficiencia/seguridad para cada uno de estos grupos.

Tabla 1. Relación entre las aplicaciones de los adyuvantes y la relación eficiencia/seguridad en animales y humanos.

Adyuvantes	La eficiencia es más importante que la seguridad		La seguridad es más importante que la eficiencia	
	Animales de laboratorio	Animales para la alimentación	Animales de compañía	Humanos
FCA	+	-	-	-
Emulsiones (aceite/agua)	+	+	(-)	-
Emulsiones (agua/aceite)	+	+	-	-
Materiales inertes	+	(+)	(+)	(-)
Compuestos de aluminio	+	+	+	+
Liposomas	+	+	(+)	(-)
saponinas	+	(+)	(+)	(-)
DDA	+	(+)	(+)	(-)
NBP	+	(+)	(+)	(-)

Relación de diferentes adyuvantes y su uso en animales y humanos, se muestran los significados de las siglas y símbolos incluidos en la tabla, FCA (Adyuvante completo de Freund), DDA (Bromuro de dimetil dioctadecil amonio), NBP (Polímeros no iónicos en bloque). Leyenda +: aplicado de rutina en productos comerciales; (+): no aplicados, pero se considera aplicable en función de su seguridad; -: no aplicado y considerado no aplicable por problemas de seguridad; (-): no aplicado y considerado no aplicable, excepto para fines muy específicos (Morris *et al.*, 1999).

Se han realizado investigaciones para evaluar las sustancias adyuvantes y su aplicación en seres humanos, valorando los posibles efectos reactogénicos, las posibilidades de desarrollar reacciones alérgicas y de inflamación crónica para delimitar el margen de seguridad en su administración, concluyéndose que solo algunos adyuvantes cuentan con licencia de uso en humanos. Algunos de los adyuvantes que fueron aprobados recibieron una licencia sanitaria a través de agencias regulatorias y son utilizados en una gran diversidad de vacunas como son las sales minerales de aluminio, MF59, MPL, AS03 y AS04 así como los virosomas y las partículas tipo virus, caracterizados por presentar un perfil de seguridad bueno y una capacidad adyuvante adecuada para ser administrados con varios antígenos, algunas de sus principales características se describen a continuación (Cárdenas *et al.*, 2016).

a) Sales Minerales de Aluminio. Dentro de este grupo se encuentran el hidróxido y el fosfato de aluminio o hidroxifosfato también llamados Alum, que han sido utilizados como adyuvantes en vacunas desde hace casi 100 años, son considerados adyuvantes débiles por su baja inducción de anticuerpos y de inmunidad mediada por células. Originalmente se creyó que se depositaban en el sitio de administración ahora se sabe que no es así, desafortunadamente, estos compuestos inducen la producción de inmunoglobulina E (IgE) relacionada con reacciones alérgicas en seres humanos, a pesar de ello y considerando su bajo costo, su capacidad adyuvante y su seguridad, en la actualidad son uno de los adyuvantes aprobados para uso en vacunas humanas por la Food & Drug Administration (FDA) (Gupta, 1998; Relyveld *et al.*, 1998; Ulanova *et al.*, 2001; Levesque, 2005; Torrellas, 2012).

b) MF 59. Este adyuvante es una nanoemulsión elaborada a partir de aceite biodegradable de escualeno estabilizada por dos surfactantes no iónicos el Span 85 (trioleato de sorbitán 85) y el polisorbato 80, además utiliza una solución de citrato como fase amortiguadora. MF 59 es una sustancia biodegradable, biocompatible, segura y bien tolerada por niños recién nacidos, niños y adultos mayores; posee

una actividad adyuvante potente que estimula la respuesta de anticuerpos frente a una gama amplia de antígenos, requiriéndose una menor cantidad de dosis. Actualmente es utilizado en 30 países de todo el mundo en estudios de citomegalovirus, virus del herpes simple (HSV), Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), influenza estacional y H1N1, así como en vacunas contra la influenza H5N1 y H5N3 (O'Hagan *et al.*, 2001; Podda, 2001; Stephenson *et al.*, 2005; Schultze *et al.*, 2008; Banzhoff *et al.*, 2009; O'Hagan *et al.*, 2013).

c) MPL. Para obtener esta sustancia se realiza una hidrólisis y una purificación a partir de LPS (derivado de la bacteria *Salmonella Minnesota* RC-595), como primer producto de la reacción se genera el denominado lípido A, continuando con la hidrolisis en condiciones ácidas se produce el MPL, compuesto que presenta una actividad adyuvante semejante, pero con una menor toxicidad que el lípido A. (Baldrige *et al.*, 2006; O'Hagan, 2007).

d) Sistema adyuvante 03 (AS03). Este adyuvante se prepara con una emulsión de aceite en agua con escualeno, vitamina E (DL- α -tocoferol) y polisorbato. La vitamina E contribuye a mejorar la inmunidad mediada por células en personas ancianas, además disminuye la cantidad de antígeno requerido para inducir una respuesta y un alto nivel de inmunidad. Entre los efectos secundarios se encuentran las reacciones inflamatorias sostenidas, la aparición de granulomas y de úlceras en el lugar de inoculación, el AS03 es utilizado en Estados Unidos contra la influenza pandémica H5N1 (Didierlaurent *et al.*, 2009; Georgiev, 2009; McKee *et al.*, 2010; Garçon *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2011; Center for Diseases Control and Prevention. Vaccine Adjuvants., 2016).

e) Sistema adyuvante 04 (AS04). Este sistema se ha elaborado con la combinación de dos adyuvantes, las sales de aluminio y el MPL, induciendo una respuesta inmunológica consistente en una alta producción de anticuerpos de larga duración, resultando en una acción conjunta de ambos adyuvantes que mejora la respuesta de la vacuna contra un antígeno dado. Se le considera un adyuvante seguro aprobado para su uso en humanos por la FDA en 2005 y por la Unión Europea en

2007, ha sido utilizado en la vacuna del virus de la hepatitis B y en la vacuna VPH (Didierlaurent *et al.*, 2009; Israeli *et al.*, 2009; De Carvalho *et al.*, 2010; Nicholls y Madera, 2010; Brunner *et al.*, 2010; Lawson *et al.*, 2011; Romanowski *et al.*, 2011; Lehtinen *et al.*, 2012).

f) Virosomas. Son vesículas diminutas de forma esférica que poseen una o varias proteínas virales incluidas en su membrana de fosfolípidos facilitando la fusión con las células del sistema inmune, con la finalidad de liberar antígenos específicos en sus sitios diana, los virosomas son degradados en el interior de las células después de la liberación de los antígenos (O'Hagan y Valiante, 2003; Singh *et al.*, 2006; Khoshnejad *et al.*, 2007).

g) Partículas Tipo Virus. Las partículas VLP, son complejos proteicos multiméricos parecidos a la organización externa del virus nativo, pero no poseen genoma viral por lo que son inofensivas. Las VLP se utilizan con varios antígenos como dengue, VIH y hepatitis B, así como en las vacunas del papiloma humano y de la hepatitis B. (Paavonen *et al.*, 2007; Roldão *et al.*, 2010; Guillén *et al.*, 2010).

1.3.1. Clasificación de los adyuvantes

Los adyuvantes han sido clasificados de diversas formas a través del tiempo considerando tres principales características, sus propiedades fisicoquímicas, sus mecanismos de acción y la fuente de los diferentes constituyentes que los integran. Cox y Coulter en 1992 realizaron una clasificación de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas en donde dividieron a los adyuvantes en particulados y no particulados, también en 1992 Edelman los clasificó de acuerdo a su mecanismo de acción dentro de tres grandes grupos denominados, inmunoestimulantes activos (agentes que aumentan la respuesta inmune específica contra el antígeno), proteínas portadoras (proteínas inmunogénicas que proporcionan ayuda de células T) y adyuvantes tipo vehículo (como las emulsiones oleosas y liposomas que sirven como matriz para el antígeno y la inmunoestimulación) (Edelman, 1992; Cox y Coulter, 1997; Sun *et al.*, 2018).

Otra clasificación más amplia de acuerdo a Jennings y col., en 1998, dividió a los adyuvantes de la siguiente manera, a base de gel, agentes tensoactivos, productos bacterianos, productos basados en aceites y emulsiones, adyuvantes particulados, proteínas de fusión y lipopéptidos, además de los inmunomoduladores e inmunoestimulantes como las citocinas, considerando las propiedades fisicoquímicas de las sustancias (Jennings *et al.*, 1998).

Posteriormente, Singh y O'Hagan en 2002, elaboraron una clasificación en donde dividieron a los adyuvantes de acuerdo a su composición en sales minerales, adyuvantes inmunoestimulantes, partículas lipídicas y partículas adyuvantes, en la **Tabla 2** se pueden observar las diferentes clases de adyuvantes con las agrupaciones correspondientes según estos autores (Singh y O'Hagan, 2002).

Tabla 2. Clasificación de adyuvantes y ejemplos.

Clases de adyuvantes	
Sales minerales	Fosfato de Aluminio*
	Fosfato de Calcio*
	Hidróxido de aluminio*
Adyuvantes inmunoestimuladores	Saponinas (QS21)
	DNA bacteriano (oligonucleótidos CpG)
	Lipopolisacáridos (LPS)
	Monofosforil lípido A (MLP)
	Citocinas (IL-2, IL-12, GM-CSF)
Partículas lipídicas	Liposomas
	Virosomas*
	ISCOMS
	Emulsiones (Adyuvante de Freund, SAF, MF59*)
	Cocleatos
Partículas adyuvantes	Partículas de Polaxámero
	Partículas semejantes a los virus
	Micropartículas
	Polilactida-co-glicósidos

Se muestran cuatro clases de adyuvantes con diversos ejemplos de cada uno de ellos. A excepción de los Cocleatos todos estos adyuvantes han sido evaluados en ensayos clínicos, sin embargo, sólo los señalados * son continuamente incluidos en vacunas aprobadas para su uso en humanos (Singh y O'Hagan, 2002).

Schijns en 2006, ha documentado una clasificación funcional basada en el mecanismo de acción de los adyuvantes agrupándolos de la forma siguiente,

- a) Facilitadores de la señal 1 (presentación de antígenos):** Son aquellos adyuvantes que se administran simultáneamente con el antígeno, se depositan, reclutando Células Presentadoras de Antígeno (CPA) en el lugar de la inmunización, y los antígenos se liberan de forma lenta y prolongada.
- b) Facilitadores de la señal 2 (coestimulación):** Este tipo de adyuvantes realizan una activación por medio de citocinas solubles o de moléculas coestimuladoras de membrana en las CPA, para mejorar la respuesta inmune específica.
- c) Facilitadores de la señal 3 (polarización a Th1/Th2):** Los adyuvantes clasificados dentro de este grupo actúan sobre las células de la inmunidad innata que a su vez pueden activar a los linfocitos T cooperadores (Th0), de forma que se polariza la respuesta inmune hacia Th1, Th2, Th9, Tfh, Th17, Th 22 y Treg (células T reguladoras), esto se ve presente en el perfil de citocinas y otros factores. Dicha polarización depende de diversas condiciones tales como la vía de inoculación, el tipo de antígeno y sobre todo el adyuvante empleado (Schijns, 2006; González y Santos, 2011; Batista-Duharte *et al.*, 2014).

Otra clasificación realizada por la European Agency for Evaluation of Medicinal Products (EMA), divide a los adyuvantes de acuerdo con su composición en Sales minerales, Emulsiones lipídicas, Derivados microbiológicos, Inmunomoduladores humanos endógenos y Vehículos inertes (Cortés Hinojosa, 2009).

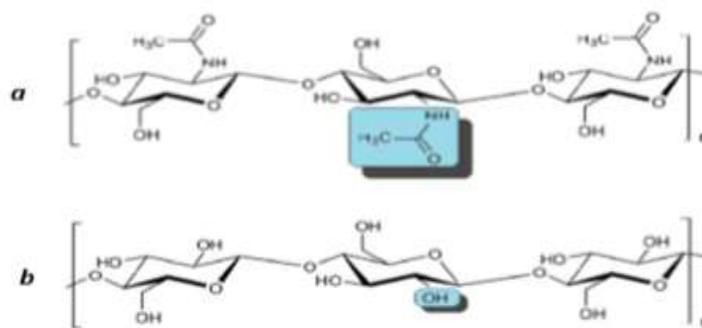
Una clasificación de adyuvantes propuesta por González y Santos en 2011, los agrupa en Sales minerales, Emulsiones aceite-agua, Sustancias tensoactivas y desestabilizantes de membrana, Adyuvantes particulados, Adyuvantes de origen microbiano, Adyuvantes sintéticos, Citoquinas como adyuvantes, Adyuvantes genéticos, Adyuvantes de origen natural y Adyuvantes combinados (González y Santos, 2011).

1.4. Quitosán

1.4.1. Generalidades

El quitosán es un polisacárido natural que deriva de la quitina, sustancia que se encuentra en gran abundancia en la naturaleza, químicamente la quitina se denomina poli (β -1,4-N-acetilglucosamina). En la **Figura 2** se muestran las estructuras químicas de la celulosa y la quitina destacando su similitud y el grupo funcional que caracteriza a cada una de ellas. Cuando la quitina se somete a una reacción de desacetilación (eliminación del grupo funcional acetilo) y se elimina al menos un 50 % de sus grupos acetilo se obtiene una sustancia denominada quitosán, si la desacetilación continúa es posible eliminar el 100 % de los grupos acetilo obteniéndose un polímero llamado quitano; en estudios de difracción de rayos x se han encontrado numerosas formas polimórficas hidratadas de la molécula de quitosán (Jang *et al.*, 2004).

Figura 2. Estructuras químicas de quitina y celulosa



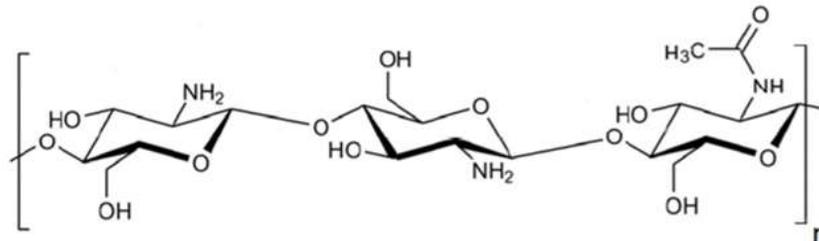
Estructuras químicas donde se pueden observar los grupos funcionales de cada estructura, el grupo acetil de la quitina (a) y el grupo hidroxilo de la celulosa (b) (Berghoff, 2011).

Se han identificado tres estructuras diferentes de quitina: α , β , y γ quitina; la α -quitina se obtiene a partir de caparazones de camarón y de cangrejo, ésta presenta una estructura cristalográfica, donde las cadenas principales están agrupadas de forma antiparalela, favoreciendo las fuerzas electrostáticas intermoleculares fuertes por puente de hidrógeno, es la forma de quitina más abundante y se encuentra en hongos, y paredes celulares de levaduras, krill, langosta, cáscara de camarón y cutícula de insectos. La β -quitina se obtiene a partir de plumas de calamar, de tubos sintetizados por gusanos, de algunas algas y protozoos, su estructura se encuentra organizada en arreglos paralelos propiciando fuerzas intermoleculares débiles, finalmente la γ quitina, se encuentra en hongos y está formada por dos cadenas paralelas alternando con una cadena antiparalela (Rinaudo, 2006; Velásquez, 2008).

Quitosán es un biopolímero lineal encontrado como constituyente de fósiles acuáticos como los trilobites que datan de la era paleozoica, considerando estas bases paleontológicas se le calcula una edad aproximada de 570 millones de años. Quitosán fue descubierto por Rouget en 1859 cuando obtuvo una sustancia a la que llamó quitina modificada, al someter al biopolímero a un tratamiento termoalcalino provocándole una desacetilación que le confirió propiedades particulares. En 1894 Hoppe-Seyler lo nombró quitosán, pero fue hasta 1950 que se obtuvo la estructura química mostrada en la **Figura 3**.

Este polímero se caracteriza por ser un sólido en forma de escamas, de color blanco-crema, hidrofílico, es soluble en soluciones ácidas diluidas (pKa aproximadamente 6.3 en ácidos fórmico, cítrico, láctico, acético), químicamente las unidades de glucosamina NH_2 se transforman en iones con carga positiva NH_3^+ , que le confieren a las moléculas de quitosán las propiedades de solubilidad (Miranda *et al.*, 2003; Lárez Velázquez, 2006; Romero, 2011; Santos-López, 2013; Molina Zerpa *et al.*, 2017; Mohamed *et al.*, 2018; Dabaghian *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2018).

Figura 3. Estructura de quitosán

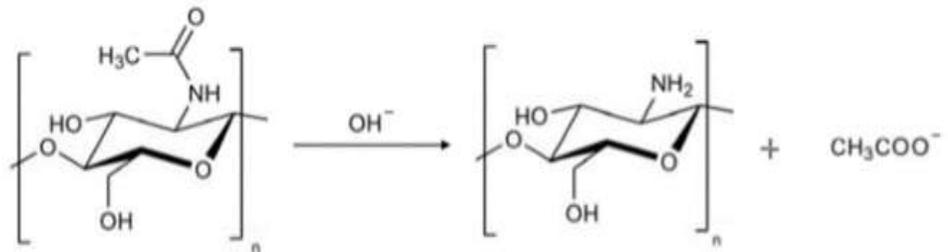


Estructura química de quitosán que posee el grupo funcional NH_2 sustituto de los grupos acetilo de la quitina (Berghoff, 2011).

La fuente de extracción tanto como la masa molecular y el grado de desacetilación de quitosán son factores decisivos en las propiedades fisicoquímicas de viscosidad, solubilidad y actividad biológica, que determinan sus características funcionales, su calidad y el destino de aplicación del polímero (De La Paz *et al.*, 2013).

Frecuentemente este biopolímero posee un grado de desacetilación comprendido en un rango entre 60-98%, en su presentación comercial posee un grado de desacetilación $\text{GDA} > 85\%$ y una masa molecular (MM) que fluctúa entre 100 y 1000 kDa (**Figura 4**) (Muzzarelli, A., 1977; Nwe y Stevens, 2002; Harish Prashanth y Tharanathan, 2007; Kasaai, 2008; Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009; Sonia y Sharma, 2011; Costa *et al.*, 2015; Molina Zerpa *et al.*, 2017).

Figura 4. Reacción de desacetilación de quitina



Reacción de desacetilación de la quitina tratada con métodos alcalinos para obtener quitosán (Berghoff, 2011).

1.4.2. Aplicaciones de quitosán

El quitosán presenta propiedades funcionales y fisicoquímicas que le permiten ser utilizado en diversas áreas, es una sustancia biodegradable, biocompatible y mucoadhesiva, es fitoestimulante, coagulante para tratamiento de aguas, antifúngica, bacteriostática, además es el único biopolímero con características policationicas (Suzuki *et al.*, 1982; Nishimura *et al.*, 1984; Goycoolea *et al.*, 2004; Senel y McClure, 2004; Muzzarelli y Muzzarelli, 2005).

Quitosán es un polímero hemostático (Klokkevold y col., 1999), capaz de adsorber moléculas orgánicas (Ikeda y col., 1993) y metales por sus propiedades quelantes, característica utilizada por Miranda-Castro en 2016 en la elaboración de esferas a base de quitosán para el tratamiento de aguas contaminadas, en donde fue posible eliminar hasta el 99.95 % de mercurio (Miranda Castro, 2016). Se ha calculado la dosis letal del 50% (LD50) de quitosán en ratones, determinando una cantidad mayor a 16 g/Kg de peso (Arai *et al.*, 1968; Salas *et al.*, 2008).

Este biopolímero es utilizado para formar materiales como películas semipermeables, fibras, geles o estructuras porosa (Rathke (SM), 1994) que pueden emplearse para la absorción de lípidos (Razdan & Pettersson, 1994), proteínas, pigmentos o materiales metálicos (Hallab *et al.*, 1995; Kean T y Thanou M, 2009), para la formación de sistemas de liberación controlada de fármacos (Ruardy *et al.*, 1997; Romero, 2011; Dabaghian *et al.*, 2018), también se ha empleado como material de andamio para soporte de células y de huesos en animales, (en la inmoviliación de catalizadores o células, en la regeneración de quemaduras y úlceras obteniendo piel artificial a partir de quitosán) (Brandl 2007; Tsiptsias *et al.*, 2009; Berghoff, 2011; Suárez *et al.*, 2017; Parvez *et al.*, 2012).

Quitosán ha sido caracterizado como una sustancia hipotóxica e hipoalergénica, que esta presente en la industria alimenticia en productos como pan (Park *et al.*, 2002), huevo (Bhale *et al.*, 2003; Stadelman, 1986), frutas y vegetales (Salvador y Miranda, 1999; El Ghaouth *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2005), jugos (Roller S, 1999), carnes (Darmadji y Izumimoto, 1994; Sagoo *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2002), leche (Ha y Lee, 2001), salchichas (Park *et al.*, 1999), además es activador de varios mecanismos de resistencia sistémica adquirida que favorecen a la industria agrícola, en el recubrimiento de semillas (Guadalupe *et al.*, 2013; Hirano y Nagao, 1989; Photchanacha *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 1999) y es capaz de incrementar la vida de anaquel de productos frescos por sus propiedades de barrera al oxígeno, formando películas de recubrimientos comestibles para frutas y verduras así como para carnes (Fernandez-Saiz *et al.*, 2010). Este polisacárido ha sido utilizado en la elaboración de alimentos como galletas de avena mezclada con quitosán para disminuir los niveles de colesterol (Gallaher *et al.*, 2000; Maezaki *et al.*, 1993), en la planta de frijol (Bourtoom, 2008; Díaz Castellanos, 2011) para desarrollar mecanismos de defensa contra plagas.

El método más empleado para caracterizar a quitosán es el de Espectroscopia de Infrarrojo, (Brugnerotto *et al.*, 2001). Su estructura lineal libre de ramificaciones y su elevado peso molecular, lo constituyen en una potente sustancia generadora de alta

viscosidad cuando se encuentra en un medio ácido (Romero, 2011; Santos-López, 2013; Guadalupe *et al.*, 2013; Salcedo Bellido, 2013; Miranda-Castro, 2016; Mohamed *et al.*, 2018; Dabaghian *et al.*, 2018).

Quitósán forma parte de algunos sistemas liberadores de fertilizantes, fungicidas, bactericidas además es un promotor del crecimiento de plantas (Lárez Velásquez, 2006), puede actuar como biocida, controlando la cantidad de nemátodos en el suelo, como bioinsecticida y biopesticida, por otra parte quitósán es utilizado en la cosmética y en la industria textil, así como en investigaciones científicas en farmacéutica, medicina, veterinaria e ingeniería ambiental (Anon, 1989; Lárez Velásquez, 2006; Muzzarelli, 2010; Lizárraga-Paulín *et al.*, 2011; Santos-López, 2013; Molina Zerpa *et al.*, 2017).

Las propiedades antimicrobianas tanto de la quitina como de quitósán se conocen desde la antigüedad, puesto que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de un amplio espectro de patógenos (Helander *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Ganan *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2008; Sudarshan *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2001) e inducir una resistencia sistémica a diversas infecciones (Lárez *et al.*, 2019), así mismo, estas sustancias impiden el crecimiento de hongos y virus fitopatógenos (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; Roller y Covill, 1999; Kochkina y Chirkov, 2000), también se ha observado que presentan propiedades cicatrizantes, hemostáticas y curativas en lesiones, en heridas e incluso tienen actividad antitumoral (Qin *et al.*, 2002; Maeda, 2004; Tharanathan y Prashanth, 2005).

Se considera a quitósán una promesa como adyuvante inmunológico en el campo de las vacunas, sin embargo, presenta el inconveniente de que a potenciales de hidrógeno (pHs) neutros o alcalinos puede cambiar su estructura y solubilidad, dificultando su absorción y compatibilidad en los tejidos subepiteliales (Lárez Velásquez, 2006; Rinaudo, 2006; Velásquez, 2008; Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009; Dabaghian *et al.*, 2018).

1.4.3. Bases inmunológicas de la acción de quitosán

Quitosán es una poderosa herramienta de salud pública, puesto que posee la capacidad de estimular el sistema inmune provocando la creación de anticuerpos (inmunoglobulinas) (Dev *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2018). El polímero tiene la capacidad de mejorar la respuesta inmune celular y humoral, de manera que activa a los macrófagos y provoca la síntesis de citocinas, también estimula a las células dendríticas uniéndose a los receptores Toll Like (TLR 4), así como a los receptores de manosa; la molécula de quitosán activa a las células presentadoras de antígeno (APC), por la interacción iónica de su carga positiva con las membranas de las células cargadas negativamente (Velásquez, 2008; Mohamed *et al.*, 2018).

Considerando que quitosán forma parte de la pared celular de hongos y de parásitos, presenta la posibilidad de atraer a los receptores de la inmunidad innata, lo que explica su acción adyuvante y el hecho de que antígenos que son administrados o recubiertos con quitosán, sean capaces de provocar un aumento en los niveles de anticuerpos (Porporatto y Correa, 2007; Romero, 2011).

1.4.4. Mecanismos de acción de quitosán

Uno de los grandes desafíos en Inmunología, es tener una propuesta confiable de nuevas vacunas que estimulen una respuesta inmune celular adecuada contra los microorganismos patógenos que causan problemas de salud, en este sentido es de trascendental importancia, optimizar las condiciones del adyuvante elegido para ser administrado con las vacunas, considerando que su efecto es determinante en la respuesta inmune, es relevante conocer cual es el mecanismo de acción de los adyuvantes. O'Hagan y Valiante, en 2003, propusieron dos mecanismos principales de acción que aquí se describen: (O'Hagan y Valiante, 2003; Moran *et al.*, 2018).

a) Sistemas de Liberación (SL): En este mecanismo el sistema de liberación aumenta la disponibilidad del antígeno por las células presentadoras, de forma que se retarda el reconocimiento antigénico, y se provoca una mayor respuesta inmune, algunos ejemplos de adyuvantes que actúan a través de este mecanismo son las sales insolubles de aluminio, las micropartículas, los virosomas, las emulsiones y partículas virus-Like.

b) Inmunopotenciadores (IP): Los adyuvantes que actúan a través de este mecanismo, son aquellos que estimulan la activación de receptores celulares y la liberación de citocinas, dentro de este grupo se encuentran el Monofosforil lípido A (MPL) y sus derivados, quilos, oligonucleótidos (CpG), Muramil dipéptido (MDP) y sus derivados.

La naturaleza, modo de acción y capacidad reactogénica de los adyuvantes es ampliamente variada. En general, el modo de acción consiste en la liberación lenta del antígeno en el sitio de aplicación, el reclutamiento y activación de macrófagos y células dendríticas, la presentación del antígeno al sistema inmune y la producción de diferentes citocinas, modulando de esta manera la respuesta inmunológica. Se ha documentado que el consumo de quitosán por vía oral, colabora en la homeostasis intestinal e interviene en la intensidad de la respuesta inmune hacia un determinado antígeno, los macrófagos expresan quitinasas que lo degradan. Se

considera que las quitinasas de las células del GALT (*Gut associated lymphoid tissue*) podrían contribuir a dirigir condiciones hacia citocinas antiinflamatorias (Boot *et al.*, 2001; Cortés Hinojosa, 2009).

Se ha concluido en algunas investigaciones que la tolerancia de un polímero está íntimamente relacionada con el grado de desacetilación que posee, quitosán cuenta con una buena aceptación por parte del huésped (Moran *et al.*, 2018). En estudios iniciales sobre el mecanismo de acción de quitosán se demostró que es capaz de activar macrófagos, así como de inducir la secreción de citocinas por las células natural killer (NK), estos efectos contribuyen al mecanismo de fagocitosis. Más recientemente, Carroll y colaboradores identificaron un mecanismo distinto de acción de quitosán que involucra al Interferón tipo 1 (IFN), dependiente de la activación de las células dendríticas, obteniéndose una respuesta inmune celular influenciada por Th1. Este biopolímero induce un estrés mitocondrial, que provoca la generación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de DNA (Nishimura *et al.*, 1984; Shibata *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2013; Carroll *et al.*, 2016).

Se señala que la proteína adaptadora de estimulador de genes de interferón (STING) es una sustancia clave para la producción de interferón de Tipo 1 a través del DNA citosólico; este mecanismo conlleva a la activación de la vía GMP-AMP sintasa cíclica (cGAS-STING), en respuesta al denominado DNA bicatenario (dsDNA), por el cual el cGAS se une a los ácidos nucleicos del huésped y esta unión provoca la generación de dinucleótidos cíclicos que se unen a STING en el retículo endoplásmico. STING se asocia con IKK o TBK-1 y se reubica en el área perinuclear del Golgi, conduciendo finalmente a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y IRF-3, respectivamente (Barber, 2015). Se ha documentado que quitosán activa la vía final, caracterizada porque no existe presencia de citocinas proinflamatorias y en su lugar se produce el interferón Tipo 1 (IFN) (Carroll *et al.*, 2016), esta nueva propuesta constituye un avance significativo en el conocimiento del mecanismo de acción de quitosán como adyuvante (Barber, 2015; Carroll *et al.*, 2016).

Por otra parte, ha sido demostrado que quitosán estimula la activación del inflamasoma NLRP3, que es un complejo de multi-proteína citosólica compuesto de NLRP3, la proteína adaptadora ASC y caspase-1. Para la activación del inflamasoma de NLRP3 se requiere de dos pasos, en uno de ellos se realiza el ensamble del complejo NLRP3, así como la regulación positiva de la expresión de pro-IL-1B y el segundo implica la división de pro-IL-1B por la caspasa-1 en su forma bioactiva. En lo que respecta al mecanismo por el cual los polímeros derivados de quitina interactúan con las células inmunes, en particular las células dendríticas, es de gran importancia comprender de que manera se promueve la inmunidad adaptativa. Se ha dado a conocer que la absorción de quitosán por las células depende de la fagocitosis, aún no se ha dilucidado si este proceso requiere de receptores específicos en la superficie celular; sin embargo, existen algunas proteínas que presentan afinidad por los oligosacáridos de quitosán y también por la quitina, algunas de ellas son, CLR RegIIIy, la lectina galectina-3 y la proteína transmembrana tipo II FIBCD1. En estudios recientes se investiga cuál es el papel potencial de la Dectina 1 como facilitadora de la absorción de quitosán por las CD y como interviene en el reconocimiento de la quitina (Seetharaman *et al.*, 1998; Cash *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; DaSilva *et al.*, 2009; Schlosser *et al.*, 2009; Mora-Montes *et al.*, 2011; Bueter *et al.*, 2013; Bueter *et al.*, 2014).

1.4.5. Hidrogeles de quitosán

En la búsqueda de mejorar las propiedades mecánicas de los polímeros naturales, se utilizan diversos procesos como la funcionalización, el entrecruzamiento químico y la copolimerización que dan origen a sustancias más funcionales como los hidrogeles. Los hidrogeles son polímeros de origen natural o sintético con estructuras entrecruzadas unidas covalentemente formando redes tridimensionales, en estado natural se les denomina xerogeles, estos compuestos son sólidos amorfos y en algunos casos semicristalinos, poseen la capacidad de mantenerse estables en una amplia diversidad de formas como micropartículas, nanopartículas,

recubrimientos y películas. Para que un material pueda clasificarse como hidrogel debe reunir algunas características como, equilibrio de hinchamiento, transición de fase y sensibilidad a las condiciones del medio que lo rodea, presentando una respuesta selectiva al pH, a la temperatura, a la luz ultravioleta, por lo que se les ha denominado hidrogeles inteligentes. Estas propiedades son aprovechadas en la liberación de péptidos y de válvulas para dispositivos de microfluidos; además, poseen la sorprendente capacidad de retener agua y otros fluidos hasta miles de veces su peso seco sin perder su forma original ni llegar a disolverse, al permanecer las uniones entre las cadenas poliméricas que los estructuran. Los hidrogeles integran en sus redes tridimensionales diversas sustancias entrecruzantes que se encuentran unidas a ellos de forma química o física (Beebe *et al.*, 2000; Robinson y Peppas, 2002).

Las uniones químicas se realizan a través de enlaces covalentes en las cadenas del polímero, son irreversibles con adecuadas propiedades mecánicas, pero tienen el inconveniente de que los agentes entrecruzantes (moléculas de bajo peso molecular) que se utilizan (aldehídos, cianatos, epoxi) son citotóxicos, un ejemplo son los hidrogeles denominados covalentes en donde se utilizan dialdehídos. Cuando las redes tridimensionales entre los hidrogeles y las sustancias entrecruzantes presentan uniones físicas los enlaces son reversibles y se derivan de interacciones moleculares como enlaces por puente de hidrógeno, y/o complejación iónica incluso por interacciones hidrófobas, de esta manera se producen hidrogeles con una menor resistencia sin utilizar sustancias tóxicas (Romero, 2011; Gómez-Mascaraque *et al.*, 2014).

Las sustancias que presentan grupos funcionales OH, COOH, CONH₂, NH₂ y HSO₃, tienen la capacidad de absorber diversos fluidos y son utilizados ampliamente en medicina, cultivo de células, geles para electroforesis, membranas para hemodiálisis, lentes de contacto, implantes, sistemas terapéuticos biodegradables, sistemas de liberación controlada (Zaldívar *et al.*, 1993).

En estos sistemas el proceso de absorción de fluidos varía de acuerdo con la temperatura, pH y las distintas concentraciones de los electrolitos presentes, el fenómeno continúa hasta que se alcanza el equilibrio de las fuerzas cohesivas intermoleculares y las fuerzas dispersivas, que se presentan en las cadenas del hidrogel (Sáenz *et al.*, 2003; Hoffman, 2012; Ahmed, 2013).

Quitósán es considerado un hidrogel inteligente, puesto que al variar el pH absorbe fluidos de forma selectiva, a través de los grupos funcionales amino en las cadenas que lo integran; este biopolímero regularmente presenta un entrecruzamiento covalente, pero también puede formar un entrecruzamiento iónico. Dentro de los entrecruzantes más utilizados están los dialdehídos, que ocasionan que la reacción se efectúe a través del grupo aldehído con los grupos amina de quitósán formando un enlace imina covalente (reacción de Schiff) (Wang *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2004).

En la reticulación de quitósán se han utilizado diferentes agentes como el glutaraldehído considerado bastante tóxico, otras sustancias propuestas para este fin son, butanodiol diglicidil éter, dimetacrilato de etilenglicol, genipina, β -glicerofosfato o glicerofosfato disódico (Wang, 2011; Troyano, 2013).

Para elaborar un hidrogel de este polímero, una vez que el gel de quitósán está preparado, se agrega el β -glicerofosfato y se disuelve para obtener una solución amortiguadora capaz de regular el pH, provocando que se inhiba la precipitación de quitósán a un pH fisiológico de 7.4 aproximadamente. (Chenite *et al.*, 2001; Szymańska, 2014).

1.5. *Bordetella bronchiseptica*

Hacia 1910 Ferry identificó a *Bordetella bronchiseptica* con el nombre de *Bacillus bronchicanis*, por su aislamiento a partir de tractos respiratorios de perros que padecían distemper canino, después se obtuvo también de cerdos de guinea, de monos y de humanos. Posteriormente, en el período comprendido 1912 y 1913, se le denominó *Bacterium bronchiseptica*, finalmente fue nombrada por Moreno-López quien clasificó al microorganismo dentro del género *Bordetella*, haciendo alusión a Jules Bordet, quien junto a Gengou lograron aislar la bacteria en 1906 (Goodnow, 1980; Molina López *et al.*, 2015; Muhammad *et al.*, 2019).

Bordetella sp. es un género integrado por bacterias patógenas aeróbicas estrictas, Gram negativas, las distintas especies del género *Bordetella* presentan diferencias en sus propiedades antigénicas, requerimientos de crecimiento y reactividad bioquímica, producen las enzimas citocromo oxidasa, lisina descarboxilasa, ureasa y catalasa, son no fermentativas, no producen sulfuro de hidrógeno ni indol y no licúan la gelatina, su temperatura óptima de crecimiento es entre 35 a 37 °C (Valladares-Carranza *et al.*, 2011; Olivera, 2014; Muhammad *et al.*, 2019).

Actualmente se han descrito nueve especies del género *Bordetella*, siendo las siguientes: *B. pertussis*, *B. parapertussis* (en seres humanos), *B. bronchiseptica*, *B. avium*, *B. holmesei*, *B. trematum*, *B. Petrii*, *B. ansorpii* y *B. hinzi*; estos microorganismos poseen un tamaño aproximado de 0.2 um por 0.7 a 1 um, solamente tres de estas especies han sido documentadas como los principales agentes causales de enfermedades respiratorias *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, las dos primeras causan tosferina en humanos provocando infecciones graves en personas inmunocomprometidas y la tercera causa problemas de salud en mamíferos; en gatos, conejos, mapaches, ovejas, roedores, lobos, koalas, leopardos, zorrillos, zarigüeyas, caballos, osos, especialmente en perros, en cerdos e incluso en seres humanos inmunocomprometidos; la bacteria *B. bronchiseptica* provoca en los perros Traqueobronquitis Infecciosa Canina Aguda (TBIC), comúnmente llamada “tos de las perreras”, mientras que en cerdos causa

rinitis atrófica, desviación del cornete nasal y reducción del crecimiento (Valladares-Carranza *et al.*, 2011; Olivera, 2014; Muhammad *et al.*, 2019).

De forma regular la TBIC se ha diagnosticado en animales que padecen infecciones con adenovirus tipo-2, virus de la Parainfluenza canina o virus de Distemper canino, y puede estar asociada a otras bacterias como *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi zooepidemicus* y *mycoplasma sp.*, complicando la enfermedad y poniendo en riesgo la vida de los animales o bien produciendo cuadros crónicos. (Bemis *et al.*, 1977; Mannering *et al.*, 2009; Mochizuki *et al.*, 2008; Roycroft *et al.*, 2007; Ueland, 1990; Weese y Fulford, 2011; Nelson y Cuoto, 2014).

Bordetella bronchiseptica es una bacteria patógena causal de enfermedades zoonóticas que se encuentra bastante difundida en la naturaleza y no tiene una presentación estacional en particular, ha sido localizada en lagos, pero puede aislarse a partir del tracto respiratorio de animales por exudado traqueal o nasal, la transmisión de animal a animal es por medio del contacto directo a través de secreciones de vías respiratorias. Este microorganismo presenta un crecimiento óptimo alrededor de 48 horas después de la siembra, en condiciones de aerobiosis a 37°C y un pH que fluctúa entre 7 y 7.2. Una forma de identificar y diferenciar a *Bordetella bronchiseptica* de otras especies de su mismo género, es la prueba bioquímica de reducción de nitratos a nitritos, además de otras pruebas características como la no fermentación de carbohidratos, la no producción de indol, ni de hidrógeno sulfurado (Goodnow, 1980; Woolfrey y Moody, 1991; Ner, 2003; Mattoo y Cherry, 2005; Molina López *et al.*, 2015; Echeverri-Toro *et al.*, 2015).

Esta bacteria posee características pleomórficas y es posible observarla como un cocobacilo Gram (-), es aeróbica, presenta motilidad derivada de flagelos peritricos en forma de triple hélice con dirección a la izquierda, se desarrolla en agar Mac Conkey en forma de colonias pequeñas pardas con el centro de color violeta, este microorganismo requiere nicotinamida y aminoácidos para su crecimiento; se ha observado que aglutina los eritrocitos de varios mamíferos provocando una

hemólisis de tipo Beta, la capacidad de *B. bronchiseptica* para colonizar y establecerse en el tracto respiratorio superior como una infección depende de los factores de virulencia, tales como la síntesis de adhesinas y de pertactinas (PRN), además presenta 14 aglutinógenos (fimbrias), pilis y es capaz de producir toxinas, como la toxina dermonecrótica, citotoxina traqueal, hemolisina adenilato ciclasa. Todos estos factores alteran a la célula y pueden provocar su destrucción (Mattoo y Cherry, 2005; Valladares-Carranza *et al.*, 2011; Molina López *et al.*, 2015; Muhammad *et al.*, 2019).

La Taxonomía de *Bordetella bronchiseptica* se enlista enseguida

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Alcaligenacea

Género: *Bordetella*

Especie: *Bronchiseptica* (Vasanthakumari, 2007), (Molina González *et al.*, 2014).

Se han identificado en *B. bronchiseptica* tres antígenos principales, los lipopolisacáridos de superficie y un antígeno proteico purificado que posee actividad de adenil ciclasa, el microorganismo posee lipopolisacáridos A y X (LPS A y LPS X), denominados antígenos somáticos "O" de la bacteria que son capaces de activar el sistema del complemento por la vía alterna estimulando la liberación de citocinas, la síntesis de exotoxinas como la toxina pertussis (producida por *Bordetella pertussis*), la toxina adenil ciclasa/hemolisina, la toxina dermonecrótica que es termolábil y la citotoxina traqueal que destruye el tejido epitelial. (Montaraz Crespo, 1987).

Es realmente poco conocida la epidemiología de la infección en la naturaleza ocasionada por *Bordetella bronchiseptica* (Duncan *et al.*, 1966; Ngom *et al.*, 2006), en un reporte conjunto de la OMS, la FAO y la OIE del año 2004 las infecciones provocadas por la bacteria fueron incluidas en la lista de las zoonosis de interés para la región de las Américas (WHO, 2014), al observarse un incremento de los reportes de seres humanos diagnosticados con la presencia del microorganismo (Rath *et al.*, 2008).

Bordetella bronchiseptica ha sido detectada en Estados Unidos, Inglaterra, Canadá, Noruega, Francia, Alemania y México (Meyer y Beamer, 1973), permaneciendo como un problema mundial importante, se considera que el 0.1% de los casos de tosferina en seres humanos han sido consecuencia de una infección por *B. bronchiseptica*, regularmente relacionada con un manejo inadecuado de los animales infectados sobre todo en el caso de médicos veterinarios, propietarios de mascotas o bien de las personas que están a cargo de animales de laboratorio o de granjas de animales (Burns *et al.*, 2003; Pioline y Harvill, 2006; Zeligs *et al.*, 1986).

Diversas investigaciones de casos de infección por *B. bronchiseptica* han sido realizadas en Japón (Mochizuki *et al.*, 2008), en Ginebra (Wernli *et al.*, 2011), en España (Llombart *et al.*, 2006), en Estados Unidos (Lo Re III V *et al.*, 2001) en Ecuador (Rodríguez y Martínez, 2016), es de suma importancia mencionar que no existen trabajos realizados en México sobre *B. bronchiseptica* y la relación con TBIC (Molina, 2002), en general la información de esta bacteria en perros es escasa, existe un estudio en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitán de la Universidad Autónoma de México (UNAM), en donde se aislaron 11 cepas de *Bordetella bronchiseptica* de exudados nasales caninos en perros callejeros y de entrenamiento (Molina *et al.*, 2006).

1.6. Métodos de Detección de Anticuerpos

Los métodos de detección de anticuerpos están clasificados dentro de una rama de la inmunología denominada Serología dedicada al desarrollo de pruebas de laboratorio para la identificación de antígenos o de anticuerpos, existen pruebas macroscópicas antígeno-anticuerpo como las de precipitación que pueden ser en medio líquido o en agar y las de aglutinación que se dividen en pruebas rápidas en placa, pruebas en tubo y las pruebas de aglutinación indirecta. También hay otras pruebas dependientes de un sistema indicador de la reacción antígeno-anticuerpo como la prueba de fijación del complemento, las pruebas de inmunofluorescencia y las pruebas inmunoenzimáticas entre las que se encuentran ELISA, Inmunotransferencia o Western blot, Inmunoperoxidasa y la prueba de Radioinmunoensayo; además se realizan ensayos especiales para virus tales como el de la Inhibición de la hemoaglutinación y la Seroneutralización (Schmidt *et al.*, 2008; Molina González *et al.*, 2014). A continuación se describen más detalladamente las pruebas de Aglutinación y de ELISA, que tienen como principio básico la interacción antígeno-anticuerpo, proceso reversible que se lleva a cabo entre enlaces no covalentes (Forbes *et al.*, 2007; Wild, 2008)

1.6.1. Prueba de Aglutinación

La prueba de aglutinación es semicuantitativa, eficaz, fácil de usar, esta basada en el desarrollo de los complejos antígeno-anticuerpo en forma de partículas aglutinantes, debido a la interacción entre las partículas insolubles del antígeno (particulados) y sus anticuerpos específicos solubles en un medio acuoso que contiene electrolitos, de manera que la reacción se realiza en la superficie de eritrocitos, bacterias o látex con el antígeno expuesto a los sitios específicos de unión de los anticuerpos, se observa como resultado de la aglutinación la formación de un agregado visible, donde se denominan aglutininas a los anticuerpos que poseen carga positiva y aglutinógenos a los antígenos con carga negativa, este

método puede ser utilizado para la identificación de bacterias y de glóbulos rojos (Roitt, 1991; Calderón, 2007).

La microaglutinación (MAT) es la prueba diagnóstica de referencia para la Organización Mundial de la Salud, se emplea para estudios epidemiológicos por ser una prueba serovar específica, es decir, que puede precisar las serovariedades que están circulando en poblaciones humanas y animales, dato indispensable cuando se plantea establecer las bases para las medidas de control de la enfermedad (Agudelo Florez & Restrepo Isaza, 2007).

Las pruebas de aglutinación pueden ser cualitativas y cuantitativas, en las de tipo cualitativo se mezcla sobre un portaobjetos una gota de la muestra a analizar con una gota del reactivo de la prueba, el resultado obtenido dependerá de la existencia o no de aglutinación (Rodas, 2013). Las pruebas semicuantitativas consisten en la realización de diluciones seriadas de la muestra problema en una placa adecuada, buscando encontrar la dilución en la que no se produzca aglutinación al añadir el reactivo de la prueba, de esta forma se determina el título de anticuerpos que será directamente proporcional al nivel de anticuerpos presentes en la muestra sérica (Rodas, 2013; Alhabbab, 2018).

La reacción de aglutinación depende de varios factores, como el estado físico de los antígenos, de la concentración de electrolitos, de la avidéz de los distintos isotipos de anticuerpos, de la localización de los determinantes antigénicos así como de las condiciones de reacción (el pH, la temperatura y la concentración de antígenos y de anticuerpos). La aglutinación es una técnica, sensitiva, fácil, rápida y se clasifica en aglutinación directa o indirecta (Nichols y Nakamura, 1984; Mak y Saunders, 2006; Coico, R. y Sunshine, 2015).

La aglutinación directa o activa se realiza entre la reacción de los anticuerpos específicos del paciente en el suero y la superficie de los patógenos que conlleva a la formación de una aglutinación visible, definida como un resultado positivo o uno negativo en su ausencia. En la aglutinación indirecta o pasiva los antígenos o

anticuerpos se recubren de alguna partícula como bentonita (arcilla de cerámica), látex (polímero de poliestireno), colodión o carbón activado, para detectar la presencia de anticuerpos específicos o de antígenos de interés en el suero del paciente, se emplean antígenos solubles que se unen a partículas aglutinantes para detectar anticuerpos que se agregan al complejo y así obtener un resultado positivo, o bien un resultado negativo cuando dicho complejo no se forma (Coico y Sunshine, 2015). Las pruebas de aglutinación se utilizan para el diagnóstico inmunológico de enfermedades infecciosas tales como salmonelosis, brucelosis, rickettsiosis y en el control epidemiológico de infecciones para determinar títulos de anticuerpos en sueros con *Brucella* (brucelosis), *Francisella* (tularemia) y *Bordetella* (Nichols y Nakamura, 1984).

1.6.2. Ensayo Inmunoabsorbente Unido a una Enzima (ELISA)

Otra de las técnicas más utilizadas para la determinación de anticuerpos es ELISA, una prueba inmunoabsorbente de unión a una enzima, basada en la reacción antígeno-anticuerpo, en donde se unen el antígeno o el anticuerpo a un soporte en fase sólida, además se requiere marcarlos con una enzima para obtener un conjugado con actividad tanto inmunológica como enzimática (Engvall y Perlmann, 1971; Grange *et al.*, 2014). Dentro de sus aplicaciones se encuentran la cuantificación de algunos metabolitos (medicamentos y hormonas), el diagnóstico de infecciones por microorganismos o la confirmación de los anticuerpos contra los antígenos. En general todas las pruebas ELISA pueden ser tanto cualitativas cuando se detecta la presencia del analito o cuantitativas al detectar en un espectrofotómetro la densidad óptica de los complejos coloridos y colocarla en una gráfica para determinar una concentración desconocida específica de anticuerpos o de antígenos. Existen cuatro tipos de ensayos ELISA; ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA sándwich y ELISA competitivo (Grange *et al.*, 2014; Alhabbab, 2018).

- a) **ELISA directa.** La prueba de ELISA directa requiere de la inmovilización de los antígenos del paciente en una microplaca y anticuerpos específicos a dichos antígenos, además de anticuerpos complementarios que se encuentran conjugados a una enzima la cual se une a su sustrato, una vez que se han unido el sustrato correspondiente se convierte a un producto detectable. Una de las alternativas usadas más ampliamente es el método enzimático en donde se emplea el producto de una reacción colorida por la unión de una enzima para cuantificar los anticuerpos, se utilizan enzimas marcadoras como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano, responsables de acelerar las reacciones de color para la detección de compuestos (Roitt, 1991; Montes Barqueros, 2018).
- b) **ELISA indirecta.** En este tipo de prueba se requiere la inmovilización del antígeno en la superficie de la pared de la microplaca al igual que en la prueba de ELISA directa, esta técnica presenta la ventaja de ser versátil y a diferencia de ELISA directa en la indirecta se usan dos tipos de anticuerpos en lugar de uno solo, primero se ocupan anticuerpos primarios que son específicos y complementarios de los que se han adherido a la pared de la microplaca, después se adicionan anticuerpos que son específicos a la región de la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos primarios, y son conjugados a una enzima que puede unirse a su sustrato obteniéndose productos detectables, lo que le imparte mayor sensibilidad, entre sus desventajas se encuentran que puede ocurrir una actividad cruzada con el anticuerpo secundario. (Grange *et al.*, 2014).
- c) **ELISA sandwich.** Este método utiliza anticuerpos específicos, denominados anticuerpos de captura o complementarios, el procedimiento consiste en que los antígenos de interés son adsorbidos en la pared de la microplaca, esta prueba elimina los inconvenientes de las pruebas de ELISA directa e indirecta, donde algunas proteínas podrían ser absorbidas en la pared de la microplaca. En el ensayo ELISA sandwich los antígenos se unen a los anticuerpos primarios, luego a los anticuerpos secundarios que se encuentran conjugados con una enzima (enzima conjugada que es específica a el antígeno del paciente, se une al antígeno y captura los anticuerpos, posteriormente, la enzima conjugada se une

a los anticuerpos secundarios y reacciona con el sustrato adicionado para producir productos detectables. Al utilizar dos anticuerpos específicos en esta prueba, se aumenta la sensibilidad y el costo comparada con la prueba ELISA directa e indirecta (Alhabbab, 2018).

- d) **ELISA competitiva.** El método se basa en una competencia entre dos antígenos distintos para unirse a los sitios de los anticuerpos disponibles que son limitados. Se inicia con el antígeno del suero a utilizar, después se añade un segundo antígeno que usualmente es similar al antígeno anterior adicionado con biotina o con una enzima, de forma que los antígenos compiten por los sitios de unión a los anticuerpos, el número de antígenos en la muestra es inversamente proporcional a los niveles de las señales obtenidas. Los antígenos que están biotinilados y unidos a streptavidina, se etiquetan por medio de algunos métodos (Bhandari *et al.*, 2011; Grange *et al.*, 2014). Para la determinación se utilizan diferentes productos que son detectables tales como cambios en el color, inducción de quimioluminiscencia o fluorescencia.

2. JUSTIFICACIÓN

Las vacunas formuladas a base de subunidades de microorganismos que contienen antígenos purificados o recombinantes son muy seguras para ser administradas a infantes, ancianos y personas inmunocomprometidas, pero presentan el inconveniente de tener una baja inmunogenicidad en comparación con las formulaciones de vacunas elaboradas a partir de microorganismos completos, ante esta situación surge la necesidad de buscar adyuvantes que logren potenciar la respuesta inmune de los organismos vacunados, con la finalidad de mantener un control estricto sobre las enfermedades que aquejan a los seres vivos, además de disminuir la cantidad de antígeno administrado y el número de dosis de las vacunas, con la consecuente disminución de costos (Schijns., 2000; Franco *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 2018).

Los adyuvantes completo e incompleto de Freund son referentes muy potentes para estimular el sistema inmunológico, sin embargo tienen el inconveniente de ser altamente reactogénicos, de baja compatibilidad y de difícil degradación, características que los hacen inviables para su administración en seres vivos, esta realidad contribuye a la necesidad de proponer alternativas de adyuvantes, resultando de gran interés que reúnan características de inocuidad, biodegradabilidad y liberación prolongada, garantizando la inducción de una fuerte respuesta inmune (Cortés Hinojosa, 2009; Mejía-Martínez *et al.*, 2010; Batista-Duharte A. y Lindblad E., 2011).

Con base en lo mencionado anteriormente y considerando la posibilidad de hacer un uso más amplio del termogel de quitosán como una alternativa en el área veterinaria, en el presente estudio se planteó la siguiente interrogante ¿El uso de un termogel a base de quitosán presenta una mayor capacidad como adyuvante en comparación con el adyuvante de Freund en el desarrollo de una respuesta humoral contra *B. bronchiseptica*? con este fin se implementó un modelo murino para evaluar el efecto adyuvante del termogel a base de quitosán en comparación con el adyuvante de Freund, mezclados con dos preparaciones (suspensión bacteriana o

extracto proteico) de *B. bronchiseptica*, evaluando los niveles de anticuerpos en las muestras séricas.

3. HIPÓTESIS

La administración del antígeno (suspensión o extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*) en combinación con un termogel a base de quitosán como adyuvante, en comparación con el adyuvante de Freund (completo e incompleto), tiene una mejor acción reguladora de liberación lenta provocando una respuesta inmune humoral efectiva en ratones.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar la función del termogel a base de quitosán como adyuvante en el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral contra *Bordetella bronchiseptica* y su comparación con el adyuvante de Freund (completo e incompleto), empleando un modelo murino.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Elaborar un termogel de quitosán, mediante el tratamiento del biopolímero con una solución amortiguadora ácida (ácido acético y acetato de sodio) a bajas temperaturas, para utilizarlo como adyuvante.
- 4.2.2. Obtener una suspensión bacteriana y una preparación de extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica* para su aplicación como inmunógenos en ratones.
- 4.2.3. Comparar la actividad como adyuvante del termogel de quitosán y el de Freund (completo e incompleto), en ratones inmunizados con *Bordetella bronchiseptica*, evaluando la respuesta humoral desarrollada mediante la técnica de aglutinación en microplaca y el ensayo inmunoabsorbente unido a una enzima (ELISA).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Grupos de animales

Los animales utilizados pertenecían a la cepa CD1, en este estudio se requirieron 89 ratones adultos sexo femenino que fueron adquiridos y mantenidos en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la FES-Cuautitlán Campo 4, UNAM, los animales permanecieron a una temperatura de alojamiento de 21°C, con 16 cambios de aire, a una humedad relativa de 60% y una iluminación de 12 x 12 a 280 luxes. Los ratones se distribuyeron en un total de nueve grupos, formados por diez animales cada uno, a excepción de un grupo que fue de nueve animales. Los diferentes tratamientos se asignaron por grupo, es decir, los grupos 1, 2 y 3 fueron inoculados con suspensión bacteriana, extracto proteico y solución salina fisiológica (SSF), respectivamente, empleando para estos grupos el adyuvante de Freund; completo en el tiempo 0 e incompleto en el tiempo 28. Por otra parte, se utilizó el termogel de quitosán como adyuvante para los siguientes tres grupos 4, 5 y 6, inoculados con suspensión bacteriana, extracto proteico y SSF, respectivamente, mientras que los grupos 7, 8 y 9 se inocularon con los mismos inmunógenos, pero sin adyuvante. La distribución de los animales y la descripción del tratamiento para cada uno de los grupos se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Grupos de ratones cepa CD1 inmunizados con *Bordetella bronchiseptica*, número de animales por grupo, adyuvante empleado y tipo de inmunógeno.

Grupo	No. de ratones	Tratamientos
1	10	Adyuvante de Freund + Suspensión bacteriana
2	10	Adyuvante de Freund + Extracto proteico
3	10	Adyuvante de Freund + Solución salina
4	10	Termogel de quitosán + Suspensión bacteriana
5	10	Termogel de quitosán + Extracto proteico
6	10	Termogel de quitosán + Solución salina
7	10	Solución salina + Suspensión bacteriana
8	10	Solución salina + Extracto proteico
9	09	Solución salina + Solución salina

Cada grupo consistió de diez animales, a excepción del grupo nueve. Los dos adyuvantes comparados fueron Adyuvante de Freund completo e incompleto y Quitosan, administrados con suspensión bacteriana o extracto proteico; incluyéndose los grupos controles, tanto de los adyuvantes como de los inmunógenos y diluyente (SSF).

5.2 Adyuvantes

Para la inmunización de los ratones se trabajaron dos adyuvantes diferentes, fueron el Adyuvante de Freund y el termogel a base de quitosán.

5.2.1. Adyuvante de Freund

Se empleó el adyuvante completo de Freund (SIGMA, Núm. Cat. F5881) en el día 0, para inmunizar a los ratones del grupo 1 (tratados con adyuvante completo de Freund y suspensión de *B. bronchiseptica*) y a los animales del grupo 2 (tratados con adyuvante completo de Freund y con extracto proteico de *B. bronchiseptica*). En el día 28, se utilizó el adyuvante Incompleto de Freund en lugar del adyuvante completo de Freund para inmunizar a los ratones de los mismos grupos 1 y 2 (grupo1, tratados con adyuvante incompleto de Freund y suspensión de *B. bronchiseptica* y grupo 2, tratados con adyuvante incompleto de Freund y extracto proteico de *B. bronchiseptica*) (SIGMA, Núm. Cat. F5506).

5.2.2. Elaboración del termogel de quitosán

El quitosán fue proporcionado por la Dra. Patricia Miranda Castro, del laboratorio 4 de Biotecnología de la FES-Cuautitlán, se obtuvo a partir de la extracción de quitina de exoesqueletos de camarón, en donde las condiciones de extracción, así como la forma de desacetilación del biopolímero han sido documentadas previamente por Miranda-Castro en 2011. El quitosán se disolvió en las soluciones preparadas por separado (Solución A: Ácido acético 0.2 M y solución B: Acetato de sodio 0.2 M), se mezclaron simultáneamente con el quitosán hasta alcanzar una concentración al 2 %. Se tomaron 5 ml de la solución (previamente enfriada) de quitosán al 2 %, y se les agregó 0.5 g de β -glicerolfosfato de sodio para disolver suavemente, se obtuvo una mezcla de 85 % de desacetilación, que se mantuvo fría hasta su uso (Chenite *et al.*, 2001).

5.3. Preparación de los inmunógenos de *Bordetella bronchiseptica*

5.3.1. Cepa de *Bordetella bronchiseptica*

La cepa LBF, de origen porcino, de la bacteria *B. bronchiseptica* fue donada para la presente investigación por la Dra. Graciela Molina del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se realizó la identificación de *B. bronchiseptica*, para ello se sembró en una placa de Petri en Agar MacConkey, se incubó (37°C durante 48 horas), posteriormente se observó la morfología colonial y microscópica, así como los resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas a la bacteria. Inicialmente se le realizó una tinción Gram al microorganismo, luego se llevó a cabo la prueba de motilidad y se le efectuaron algunas pruebas como oxidasa, catalasa, ureasa, nitratos, indol, citrato y fermentación de hidratos de carbono para caracterizar a *Bordetella bronchiseptica*.

5.3.2. Suspensión bacteriana inactivada con formaldehído al 0.3 %

Para la preparación de la suspensión bacteriana se sembró la cepa de *B. bronchiseptica* a lo largo de toda la placa de agar en Mac Conkey en forma masiva y se incubó a 37°C por 48 horas. Posteriormente se cosechó el crecimiento bacteriano con SSF estéril, se realizaron dos lavados, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, el paquete bacteriano obtenido se resuspendió en aproximadamente 15 ml de SSF estéril, este paso se repitió una vez más. Se ajustó la suspensión bacteriana a una Densidad Óptica (DO) de 1 a una longitud de onda de 650 nm utilizando un espectrofotómetro Opsys MR "Spectronic 20 D" que equivale a una concentración de 1×10^{12} UFC/ml (Chong Melchor, 1994; Jiménez, 2015), por último, se adicionó formaldehído a una concentración final de 0.3 %.

5.3.3. Obtención del extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*

5.3.3.1. Preparación de la suspensión bacteriana

Se sembró la cepa de *B. bronchiseptica* a lo largo de toda la placa de agar MacConkey en forma masiva y se incubó a 37°C por 48 horas, posteriormente el paquete bacteriano se cosechó utilizando 10 ml de SSF estéril por cada placa sembrada. Se realizaron dos lavados centrifugando a 3000 rpm durante 15 min, el paquete bacteriano obtenido de 30 placas se resuspendió en 25 ml de SSF estéril.

5.3.3.2. Lisado de las bacterias por congelación y sonicación

Los 25 ml de suspensión bacteriana obtenida en el punto **5.3.3.1** se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación, para después realizar tres ciclos de sonicación (90 Hertz durante 5 min), posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se concentró mediante precipitación en frío con 5 volúmenes de acetona durante 15 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, el precipitado se resuspendió en 3 ml de SSF. Finalmente se determinó la concentración de proteínas obtenidas.

5.3.3.3. Determinación de la concentración de proteína del extracto bacteriano

La determinación de la concentración de proteínas en la preparación del extracto bacteriano de *B. bronchiseptica* se realizó empleando el Micro BCA Protein Assay Kit (23235, Thermo Scientific). Siguiendo las instrucciones del proveedor, inicialmente se llevó a cabo la reconstitución y preparación de una serie de diluciones dobles de albúmina sérica bovina (BSA), que se empleó como proteína estándar de referencia; por lo tanto, se trabajó con ocho diferentes concentraciones de BSA iniciando con 80 ug/ml hasta 0.62 ug/ml, así mismo, se realizaron varias diluciones (partiendo de la dilución 1:4) de la muestra de extracto proteico; en el ensayo se elaboraron triplicados de cada concentración de BSA y de cada dilución

de la muestra a evaluar. Brevemente, en una microplaca de poliestireno con fondo plano se agregaron de forma independiente 150 ul/pozo de cada una de las diferentes diluciones de BSA o de la muestra problema, después de agitar se adicionaron 50 ul de la Solución Mezcla preparada a partir de los reactivos A (25 partes), B (24 partes) y C (1 parte), la microplaca se agitó por un minuto y luego se incubó a 37°C durante 120 min. Posteriormente se realizó la lectura en el elisómetro (espectrofotómetro Opsys MR), empleando un Test Filter 450 nm, sin Ref. filter and W/L mode Single para medir la DO a una longitud de onda de 570 nm. Se utilizaron los resultados de DO obtenidos en cada dilución de la BSA para elaborar la curva estándar y poder interpolar los valores de DO correspondientes a la muestra, para finalmente determinar la concentración de proteína en la misma.

5.3.3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Para definir el patrón de proteínas del extracto proteico de *B. bronchiseptica* se analizaron diferentes concentraciones de la muestra, como proteína control se utilizó la BSA y se incluyeron los marcadores de peso molecular (PM). Se empleó un sistema de geles discontinuos de acuerdo con el procedimiento de Laemmli (1970), trabajando con un gel de separación al 10 %, un gel de concentración ajustado al 4 % y la solución amortiguadora de corrida pH 8.3 (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M-SDS al 0.1 %). Se utilizó la solución de trabajo al 40 % Acrilamida/Bis Solution, 29:1 (BIO-RAD, Cat. Num. 161-0146). Las cantidades necesarias de las soluciones amortiguadoras y de los reactivos requeridos se mezclaron y se vertieron rápidamente al molde de la cámara de electroforesis para preparar el gel de separación (Laemmli, 1970).

5.3.3.4.1. Preparación y corrimiento de las muestras

Se colocó el volumen necesario de la muestra que contuviera la concentración de proteína de 5 ó 10 ug/ml en viales de plástico de 0.5 ml debidamente etiquetados, agregando el mismo volumen de solución digestora (Tris base 0.5 M pH 6.8, SDS, glicerol, 2 mercaptoetanol, azul de bromofenol), después se mezclaron y se

mantuvieron en ebullición en baño María durante 3 min. Posteriormente se colocaron los volúmenes preparados de cada muestra en los carriles del gel de concentración, junto con las muestras problema se corrieron en carriles adyacentes marcadores de peso molecular (fosforilasa b, 94 Kd; Albúmina sérica bovina, 67 Kd; Ovoalbúmina, 43 Kd; Anhidrasa carbónica, 30 Kd; inhibidor de tripsina de soya, 20.1 Kd y Alfalactoalbúmina, 14.4 Kd), como referencia. La electroforesis se corrió a 70 volts, para el gel concentrador y posteriormente de 80 a 100 volts en el gel de separación, hasta que el frente del colorante llegó al final del gel de separación.

5.3.3.4.2. Tinción de geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio con azul de Coomassie R250 (A.C.)

Una vez concluido el procedimiento de separación por electroforesis de las diferentes proteínas presentes en el extracto proteico de *B. bronchiseptica*, se desensamblaron los moldes del gel cuidadosamente, se cortó y separó el gel concentrador del gel separador y se colocó este último en la solución de tinción de azul de Coomassie R-250 (A.C.) durante 12 horas. Transcurrido el tiempo se transfirió cuidadosamente a la solución desteñidora I y se mantuvo en agitación; posteriormente, bajo las mismas condiciones se utilizó la solución desteñidora II, se realizaron los cambios necesarios de ambas soluciones desteñidoras hasta que el exceso de colorante en el gel se eliminó y las bandas de proteínas se distinguieron perfectamente.

5.3.3.4.3. Curva patrón de la movilidad relativa de proteínas

Para determinar los valores de peso molecular de las proteínas presentes en la muestra de extracto proteico de *B. Bronchiseptica*, previamente se elaboró una curva patrón que mostró la relación entre el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas estándares (eje de las Y) y los coeficientes de movilidad relativa (Rf) correspondientes a cada banda de las proteínas estándares (eje de las X). La recta se ajustó mediante el tratamiento matemático de mínimos cuadrados y a través de una regresión lineal, el valor de Rf obtenido para cada una de las bandas presentes

en la muestra se interpoló en la gráfica y se determinaron los valores de los pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto proteico.

Los valores de Rf, tanto de las proteínas estándares como de la muestra, fueron determinados midiendo la distancia recorrida por cada proteína en el gel de poliacrilamida y utilizando la fórmula siguiente:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la proteína (banda)}}{\text{Distancia total recorrida por la muestra}}$$

5.4. Inmunización de los ratones y toma de muestras sanguíneas

5.4.1. Protocolo de inmunización

Se realizaron tres inmunizaciones por la vía intraperitoneal (IP), con las especificaciones requeridas para cada uno de los grupos de ratones mencionados anteriormente en la **Tabla 3**. Antes de iniciar la primera inmunización se tomaron las muestras sanguíneas basales de la vena caudal de los animales. La dosis de antígeno (suspensión bacteriana con una densidad óptica de 1, equivalente a una concentración de 1×10^{12} UFC/ml)(Chong Melchor, 1994; Jiménez, 2015) y de los adyuvantes correspondientes (Freund completo o incompleto, quitosán o solución salina) que se inocularon en los grupos 1, 4 y 7 fue de 100 ul por cada ratón y la dosis tanto del inmunógeno utilizado (extracto proteico que posee una concentración de proteína de 342 ug/ml) como del adyuvante correspondiente a los grupos 2, 5 y 8 fue de 125 ul por cada animal correspondiente a 42.75 ug de proteína del extracto proteico, la administración de las respectivas dosis se realizó en cada una de las inmunizaciones.

La primera aplicación de cada uno de los inmunógenos (suspensión bacteriana o extracto proteico) o SSF, con o sin el adyuvante correspondiente se llevó a cabo en el día cero, en esta primera inmunización se utilizó el adyuvante completo de Freund para los grupos que lo requirieron. La segunda inmunización de los ratones se llevó a cabo cuatro semanas después (día 28), en este caso se empleó el adyuvante incompleto de Freund en los grupos mencionados anteriormente; diez días después (día 38) se realizó la toma de muestra sanguínea de la vena caudal de todos los animales. La tercera inmunización de los ratones se efectuó el día 97 del experimento, para ello se administraron los inmunógenos sin adyuvante a los diferentes grupos, suspensión bacteriana, extracto proteico y sin inmunógeno. Finalmente, en el día 105 del experimento se procedió al sacrificio de los animales y se realizó la última toma de muestra sanguínea por punción cardíaca.

5.4.2. Sangrado de los animales y colección de muestras sanguíneas

Para llevar a cabo la toma de muestra sanguínea de la vena caudal, se colocó a cada ratón en un cepo y se le dio un masaje desde la base de la cola a la punta de la misma, para estimular una adecuada irrigación sanguínea; después con un bisturí se realizó una pequeña incisión en la punta de la cola del ratón, la cual se colocó dentro del tubo receptor y se esperó hasta obtener el volumen deseado (100 a 200 μ l por animal de cada grupo), los tubos se rotularon de forma individual con la fecha de colección de la muestra, número de grupo, número de animal y número de toma sanguínea. Cada una de las muestras (gotas) de sangre se colectaron en un vial de 0.5 ml, posteriormente se incubaron a 37°C durante 30 min, para favorecer la formación del coágulo, seguidas de una incubación a 4°C durante toda la noche, para después centrifugarlas a 4000 rpm durante 12 min a continuación, se separó el suero del coágulo cada una de las muestras de suero se colectó en otro vial etiquetado de la misma forma, finalmente se conservaron en congelación a una temperatura de -20°C hasta su uso. La toma de la muestra sanguínea de la vena caudal se realizó en dos ocasiones para la obtención de los sueros correspondientes a los días 0 (basal) y 38 del experimento.

Con respecto a la toma de sangre por punción cardiaca cada uno de los animales se introdujo dentro de una cámara con cloroformo para anestesiarlo, luego se realizó el corte con bisturí en la parte media abdominal del cuerpo del ratón, en seguida se puncionó directamente el corazón con una aguja apropiada para obtener la sangre correspondiente al día 105 del experimento, después se separó el suero del coágulo y se conservó en congelación.

5.5. Pruebas serológicas para determinar los niveles de anticuerpos en sueros murinos

Las técnicas serológicas que se emplearon en este trabajo fueron la prueba de aglutinación en microplaca y la prueba de inmunoensayo ELISA, las cuales se

tuvieron que estandarizar para llevar a cabo la detección de anticuerpos contra *Bordetella. bronchiseptica*.

5.5.1. Estandarización de la técnica de aglutinación en microplaca

Se estandarizó el ensayo de aglutinación en microplaca para evaluar los niveles de anticuerpos específicos contra *B. bronchiseptica* presentes en las muestras séricas murinas. Dicha estandarización se efectuó de acuerdo a la descripción siguiente:

a) Se prepararon 12 diluciones dobles de un suero positivo y uno negativo iniciando con la dilución 1:20, considerando un volumen final de 50 ul por pozo de una microplaca de 96 pozos con fondo redondo (NUNC-Immuno Plate MaxiSorp, Núm. Cat. 439454). Como control negativo del sistema se incluyó la SSF.

b) Posteriormente se añadieron de forma independiente 50 ul/pozo de cada una de las tres diluciones trabajadas (1:1, 1:2 o 1:4) de la suspensión de *B. bronchiseptica* (cepa LBF) inactivada con formaldehído al 0.3 %, DO = 1 a una longitud de onda de 650 nm (suspensión original), la microplaca se incubó a temperatura ambiente (37°C durante 48 horas) y después de ese tiempo se realizó la lectura. Para la obtención de los resultados se consideró una prueba positiva cuando se presentó una clara aglutinación (malla) y negativa, cuando se observó la formación de un botón o paquete

5.5.2. Estandarización de la técnica de ELISA

Para la realización de esta prueba se utilizó una microplaca de poliestireno de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Núm. Cat. 439454), se efectuó la fijación de los antígenos, dispensando en forma independiente y por duplicado 100 ul/pozo de cada una de las cuatro diferentes concentraciones del extracto bacteriano de *B. bronchiseptica* (1, 5, 10 y 20 ug/ml); para la preparación de la solución de antígeno a cada concentración se empleó la solución amortiguadora de bicarbonato ácido de

sodio y carbonato de sodio anhidro, pH 9.6, esta misma solución sin antígeno se incluyó como blanco del sistema.

Después se incubó la microplaca durante 2 horas a 37°C, seguida de una incubación a 4°C durante toda la noche, posteriormente se realizó una serie de tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05 % (PBS-T); para el bloqueo de los sitios libres de antígenos remanentes en las paredes de la microplaca, se adicionaron 300 ul/pozo de solución bloqueadora BSA-PVA-PVP y se incubaron por tres horas a 37°C y durante toda la noche a 4°C.

Una vez retirada la placa del refrigerador se lavó tres veces con PBS-T y se dispensaron por duplicado 100 ul/pozo de las muestras de los sueros murinos (positivo o negativo, disponibles en el laboratorio de trabajo) diluidos 1:100; se empleó como diluyente la solución pre-bloqueadora PBS-BSA, esta misma solución se utilizó en los pozos correspondientes al blanco del sistema, la microplaca se incubó a 37°C durante un período de 60 min y se dejó durante 60 min en refrigeración a 4°C.

Transcurrido este tiempo, se lavó 5 veces con PBS-T, para detectar los anticuerpos unidos se agregaron 100 ul/pozo del conjugado peroxidado anti-IgG de ratón, producido en cabra (Bio-Rad No. Cat. 172-1011), utilizando seis diluciones (1:100, 1:200, 1:250, 1:400, 1:500, 1:800) preparadas con solución pre-bloqueadora, se incubó a 37°C por 60 min. Posteriormente se lavó cuatro veces con PBS-T y un último lavado con PBS, después se realizó el revelado de la microplaca empleando 200 ul/pozo de orto-fenilendiamina [O-Phenylenediamine (OPD) Dihydrochloride] (Sigma Immuno Chemicals, P-6662), se mezcló e incubó por 45 min, la reacción se detuvo con 50 ul de ácido sulfúrico 3 M. Finalmente, la microplaca se leyó en un elisómetro a 490 nm, empleando un Test Filter 450 nm, sin Ref. filter and W/L mode Single.

5.6. Evaluación de los niveles de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en muestras séricas murinas

Para llevar a cabo la evaluación de los niveles de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en las muestras séricas de los ratones se utilizaron dos técnicas serológicas, el ensayo de aglutinación en microplaca y la técnica de inmunoensayo ELISA, previamente estandarizadas. Se establecieron tres tiempos de sangrado de los animales, los cuales se realizaron en los días 0, 38 y 105 después de la primera inmunización de los ratones.

5.6.1. Ensayo de aglutinación en microplaca para la determinación del título de anticuerpos

Se realizó la titulación de las muestras séricas murinas correspondientes a los días 0, 38 y 105 por medio de la prueba de aglutinación en microplaca, para ello se prepararon seis diluciones dobles (iniciando con la dilución 1:20) de cada uno de los sueros, empleando la SSF como diluyente y considerando un volumen final de 50 ul/pozo. Para el control negativo del sistema se adicionaron 50 ul del diluyente, después se añadió un volumen de 50 ul/pozo de la suspensión original de *B. bronchiseptica* a una dilución 1:4, se agitó la microplaca y se incubó a 37°C durante 48 horas, por último, se registraron los resultados, considerando una prueba positiva la formación de una malla de aglutinación y negativa la formación de un botón del paquete bacteriano. El título de la muestra sérica se reportó como el recíproco de la máxima dilución donde se observó una reacción de aglutinación positiva.

5.6.2. Determinación de los niveles de anticuerpos en sueros murinos mediante la técnica de ELISA

Inicialmente se realizó la estandarización de la prueba de ELISA, determinando la concentración óptima de antígeno y la dilución de trabajo del conjugado peroxidado anti-IgG de ratón producido en cabra (Bio-Rad No. cat. 172-1011). Se emplearon

cuatro diferentes concentraciones del extracto proteico de *B. bronchiseptica* y seis diluciones del conjugado (1:100, 1:200, 1:250, 1:400, 1:500, 1:800).

Posteriormente se llevó a cabo la determinación del título de anticuerpos presentes en las muestras séricas murinas correspondientes a los días 0 y 105, empleando la técnica de ELISA. Brevemente, se inició con la fijación del antígeno a una concentración óptima (5 ug/ml del extracto proteico de *B. bronchiseptica*) y se incubó la microplaca durante dos horas a 37°C, seguida de una incubación a 4°C durante toda la noche. Se realizaron una serie de tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05 % (PBS-T), luego se adicionaron 300 ul/pozo de solución bloqueadora BSA-PVA-PVP y se incubó la microplaca a 37°C por tres horas y a 4°C durante toda la noche.

Por otra parte, se prepararon diez diluciones dobles por duplicado de cada una de las muestras séricas murinas iniciando con 1:2000, empleando como diluyente la solución pre-bloqueadora PBS-BSA. Posterior al bloqueo la microplaca se retiró del refrigerador y se lavó 3 veces con PBS-T, se secó muy bien y se dispensaron por duplicado 100 ul/pozo de cada una de las diluciones correspondientes, se incubó la microplaca a 37°C durante un periodo de 60 min y 60 min a 4°C.

Después de la incubación se procedió a lavar la microplaca 5 veces con PBS-T, luego se agregaron 100 ul/pozo del conjugado peroxidado anti-IgG de ratón empleando la dilución óptima de trabajo (1:500), preparada en solución pre-bloqueadora, la microplaca se incubó durante 60 min a 37°C. Posteriormente se lavó cuatro veces con PBS-T y una vez con PBS, el revelado se realizó empleando 200 ul/pozo de OPD (Sigma Immuno Chemicals, P-6662) y la microplaca se incubó durante 45min, la reacción se detuvo con 50 ul/pozo de ácido sulfúrico 3 M. Finalmente, la microplaca se leyó en un elisómetro a una longitud de onda de 490 nm empleando un Test Filter 450 nm, sin Ref. filter and W/L mode Single.

5.7. Análisis Estadístico

Para realizar el diseño del experimento se procedió a determinar el tamaño de la muestra de animales requeridos, para ello se empleó el software de cómputo estadístico “R” (R coreTeam, 2019) (versión 3.5.3.) y la función “pwr. anova.test” del paquete “pwr” (Champely, 2018)(v 1.2-2), obteniéndose como resultado un número de 10 animales por cada uno de los nueve grupos establecidos, lo que suma un total de 90 ratones (*Mus musculus*). Sin embargo, por la disponibilidad de animales se ajustó la cantidad de ratones (cepa CD1) a 89 disponiendo los grupos como se mencionó anteriormente (**Tabla 3**).

Para la prueba de aglutinación en microplaca se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados tomando en consideración cuatro factores: el tipo de adyuvante, el tipo de antígeno, el tiempo y el ratón de que se trate. El diseño experimental fue en parcela dividida, en este caso el factor ratón funcionó como parcela.

El análisis estadístico de los resultados de la prueba de aglutinación se realizó utilizando el paquete R (R core Team, 2019) (v.3.5.3.) y la plataforma Rstudio (R core Team, 2019). A su vez se utilizaron los paquetes de R: ‘nlme’ (Pinheiro *et al.*, 2018) ‘emmeans’ (Russell Lenth, 2019) y ‘ggplot2’; (H., 2016). El paquete nlme (*linear and no linear mixed effects models*) se utilizó en el ajuste del modelo de efectos mixtos, ya que el experimento tiene tres factores de efectos fijos (Adyuvante, antígeno y tiempo) y un factor de efectos aleatorios (ratón). El paquete ‘emmeans’ se empleó para estimación de medias. Los paquetes ‘ggplot2’ (Wickham, 2016; Pinheiro *et al.*, 2018; Russell Lenth, 2018, 2019) de R y el programa informático GraphPad Prism versión 7.0 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA), <http://www.graphpad.com> se utilizaron para la elaboración de las gráficas.

El análisis de resultados de la prueba de ELISA, se inició con la determinación del punto de corte, para obtener los valores del título de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en los sueros murinos; dicho punto de corte se estableció como el

promedio más dos desviaciones estándar, de las DO de los sueros obtenidos en la dilución 1:500 del tiempo 0 preinoculación.

Para calcular el título de cada ratón, los datos se ajustaron a la ecuación log-logística de 3 parámetros:

$$y = \frac{d}{1 + \exp(b \log x - e)}$$

Donde $y = \text{DO}$

$x = \log(\text{dil}^{-1}/100)$

d , b y e , son los parámetros a estimar que representan el valor máximo de DO, la pendiente y el punto de inflexión de la curva, respectivamente.

El ajuste se hizo con el paquete de R “drc”, con este paquete se calculó el título por interpolación del punto de corte en la curva ajustada. El paquete “drc” realiza el ajuste de modelos a los datos de curvas dosis respuesta y entre otras funciones realiza la estimación de las dosis a determinados valores de la respuesta (Ritz *et al.*, 2015).

Una vez obtenido el título correspondiente a los anticuerpos presentes en el suero de cada ratón, se realizó el análisis de un modelo lineal de dos factores: tipo de adyuvante, (Freund, quitosán o solución salina); y el tipo de antígeno (extracto o suspensión bacteriana), en un diseño completamente aleatorio. La comparación múltiple se hizo con el paquete de R “emmeans” mediante la prueba de Tukey con “valores p” ajustados.

6. RESULTADOS

6.1. Morfología de las colonias de *B. bronchiseptica* y pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria

Para la identificación de *B. bronchiseptica*, se inoculó la bacteria en agar Mac Conkey con un tiempo de incubación de 48 horas a 37 °C, la morfología de las colonias obtenidas en los cultivos de la cepa LBF fueron lisas, circulares, brillantes, convexas, con bordes regulares. Al efectuar la tinción de Gram y observar al microscopio se apreciaron cocobacilos Gram (-), la prueba de movilidad del microorganismo fue positiva y los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria fueron positivos a las pruebas de oxidasa, ureasa, catalasa, citrato y reducción del nitrato y fueron negativas a la hidrólisis de la gelatina, producción de ácido a partir de azúcares y a la prueba de indol, los resultados se reportan en la **Tabla 4**, donde se aprecia que los datos obtenidos en el laboratorio de trabajo coinciden con los reportados en la literatura (Cowan y Steel's, 1993).

6.2. Obtención de los extractos bacterianos

Una vez identificada la bacteria *B. bronchiseptica* se realizó la obtención y cosecha de las colonias empleando SSF, se recuperó una suspensión violeta de consistencia espesa y viscosa. La lisis de esta suspensión bacteriana se logró mediante varios tratamientos de congelación-descongelación y sonicación. Posteriormente, a la concentración y precipitación de proteínas con acetona, se obtuvo un volumen de aproximadamente 25 ml del extracto proteico, del cual se realizaron alícuotas y se procedió a su conservación a 4°C.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas realizadas a *Bordetella bronchiseptica* cepa LBF.

Pruebas Bioquímicas	<i>B. bronchiseptica</i> referencia	<i>B. bronchiseptica</i> en pruebas de laboratorio LBF
Tinción Gram	-	-
Morfología	cocobacilo	cocobacilo
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Reducción de nitrato	+	+
Citrato Christensen	+	+
Ureasa	+	+
Motilidad	+	+
Producción de gelatinasa e Indol	-	-
Producción de H ₂ S a partir de TSI	-	-
Fermentación de carbohidratos	-	-

Características morfológicas y resultados de pruebas bioquímicas comparados con los datos reportados en la bibliografía (Cowan y Steel's, 1993).

6.2.1. Determinación de la concentración de proteínas del extracto proteico bacteriano

La determinación de la concentración de proteínas del extracto proteico se realizó empleando el método Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23235). Los valores promedio de las lecturas de Densidad Óptica que se obtuvieron en el elisómetro a una longitud de onda de 570 nm, correspondientes a la curva patrón de proteínas empleando ocho diferentes concentraciones de BSA se reportan en la **Tabla 5**; en la **Figura 5** se grafican los valores obtenidos.

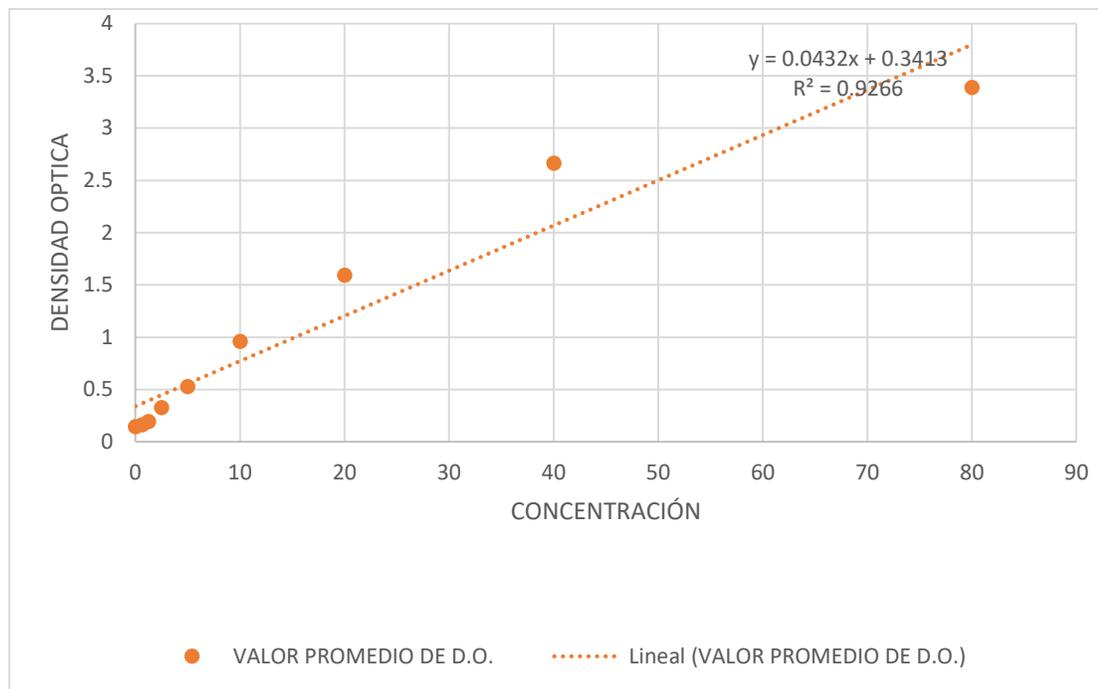
Los promedios de los valores de DO correspondientes a las diluciones realizadas a la muestra del extracto proteico bacteriano, se interpolaron en la curva patrón para determinar la concentración de proteínas; en la **Tabla 6** se observan los resultados únicamente para las cinco primeras diluciones trabajadas y considerando la interpolación de los valores de DO en la parte media de la curva se decidió utilizar la dilución 1:8 para determinar la concentración de proteínas en la muestra del extracto proteico, la cual resultó ser de 342 ug/ml; el volumen total del extracto proteico de *B. bronchiseptica* se distribuyó en alícuotas de 1.5 ml por vial y se conservó en congelación (-20°C) hasta su uso.

Tabla 5. Concentraciones de albúmina sérica bovina y valores promedio de densidad óptica (DO) correspondientes a la curva estándar de proteínas.

ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN ug/ml	VALOR PROMEDIO DE DO
A	80	3.38 ±0.03
B	40	2.66 ±0.08
C	20	1.59 ±0.09
D	10	0.95 ±0.01
E	5	0.52 ±0.01
F	2.5	0.32 ±0.03
G	1.25	0.19 ±0.01
H	0.625	0.16 ±0.01
BLANCO	0	0.14 ±0.01

Concentración en ug/ml de ocho diluciones preparadas a partir de la proteína de BSA y sus valores de DO ± DS obtenidos a una longitud de onda de 570 nm, datos utilizados para la elaboración de la curva estándar requerida para determinación de la concentración de proteínas presentes en el extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 5. Curva estándar para la determinación de la concentración de proteínas



Valores graficados de la concentración en $\mu\text{g/ml}$ de ocho diluciones de la proteína BSA y de la Densidad Óptica obtenida en un elisómetro a 570 nm; la elaboración de la curva estándar fue requerida para la determinación de la concentración del extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*.

Tabla 6. Determinación de la concentración de proteínas en el extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*.

	VALOR PROMEDIO DO	CONCENTRACIÓN (ug/ml)	FACTOR DE DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL (ug/ml)
1:4	3.22	66.52	4	266.08
1:8	2.19	42.75	8	341.98
1:16	1.22	20.22	16	323.59
1:32	0.65	7.14	32	228.42
1:64	0.36	0.32	64	20.30

Valores de DO de las cinco primeras diluciones efectuadas al extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica* y la concentración de proteínas en ug/ml, determinada para cada una de ellas al interpolar dichos valores de DO en la curva estándar, considerando el factor de dilución empleado se obtuvo la concentración final (ug/ml) de las proteínas presentes en el extracto bacteriano.

6.2.2. Electroforesis de los extractos bacterianos

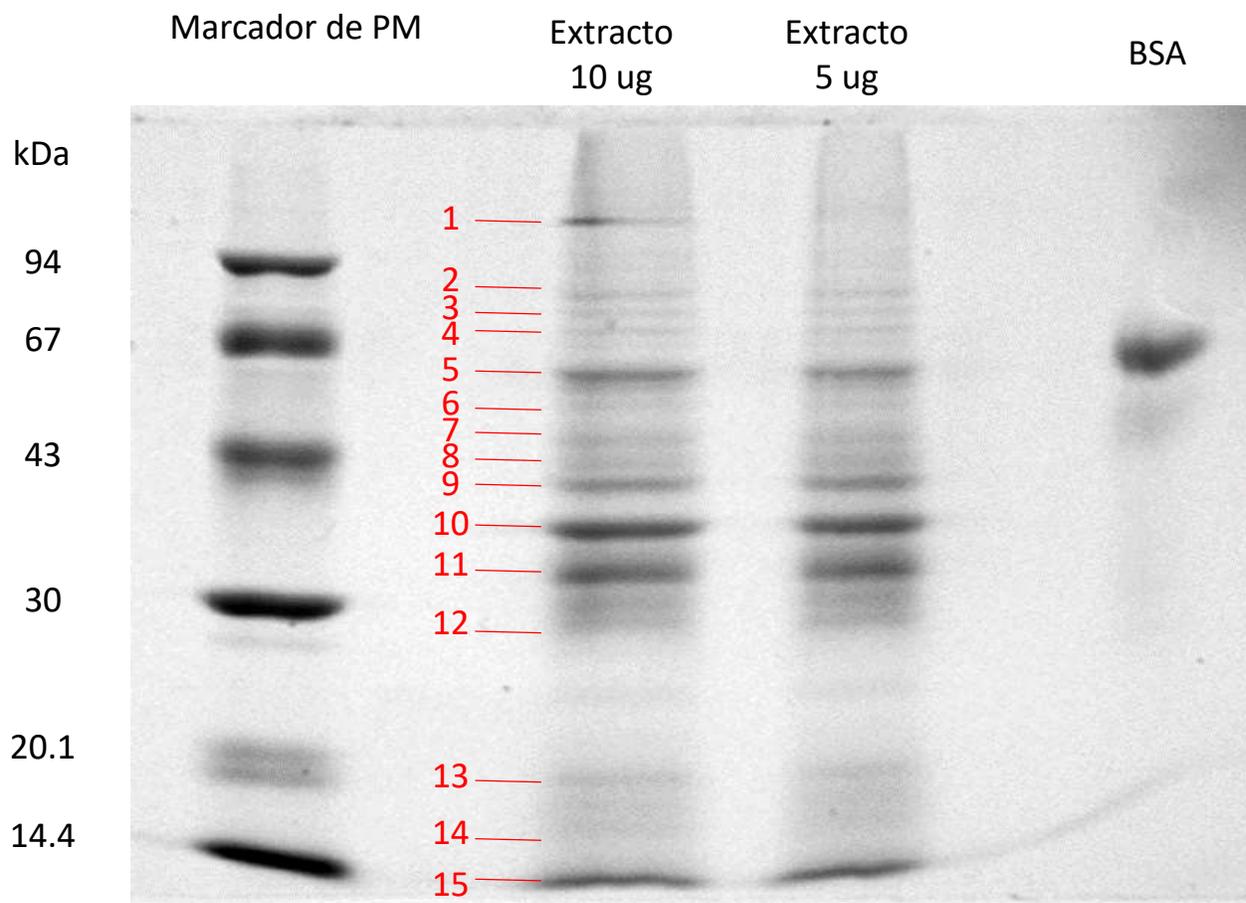
Por medio de la técnica de electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida-SDS, se determinaron los pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto proteico de *B. bronchiseptica* cepa LBF, que se utilizó en las cantidades de 10 ug y 5 ug. En el lado izquierdo de la **Figura 6** se indican los valores de los pesos moleculares de las seis bandas visualizadas, que corresponden a las proteínas contenidas en el estándar de los marcadores de peso molecular (PM); posteriormente se observan las 15 bandas de las proteínas presentes en el extracto proteico de *B. bronchiseptica* (a una cantidad de 10 ug y 5 ug), finalmente se muestra el corrimiento de la proteína de referencia (BSA, con un peso molecular de 67 kDa) la cantidad empleada fue de 10 ug.

Además, se determinaron los valores del coeficiente de movilidad relativa (Rf) para cada una de las bandas proteicas presentes en el estándar de pesos moleculares, extracto proteico de *B. bronchiseptica* y la proteína de referencia. En la **Tabla 7** se reportan los valores correspondientes a los Rfs de las proteínas del marcador de pesos moleculares, así como sus pesos moleculares y los valores del logaritmo de cada uno de ellos, estos datos se muestran graficados en la curva patrón de PM (**Figura 7**).

los Rf de las proteínas de extracto bacteriano calculados se interpolaron en la curva patrón; elaborada con los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas estándar y sus respectivos valores de Rf, para posteriormente determinar los valores de los pesos moleculares de las proteínas identificadas en el extracto proteico bacteriano que se encontraron entre 5.64 y 99 kDa.

En la **Tabla 8** se enlistan los Rf de las bandas obtenidas en el gel poliacrilamida-SDS y los PM de las proteínas presentes en el extracto proteico de *B. bronchiseptica* cepa LBF a una cantidad de 10 ug.

Figura 6. Patrón electroforético del extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*.



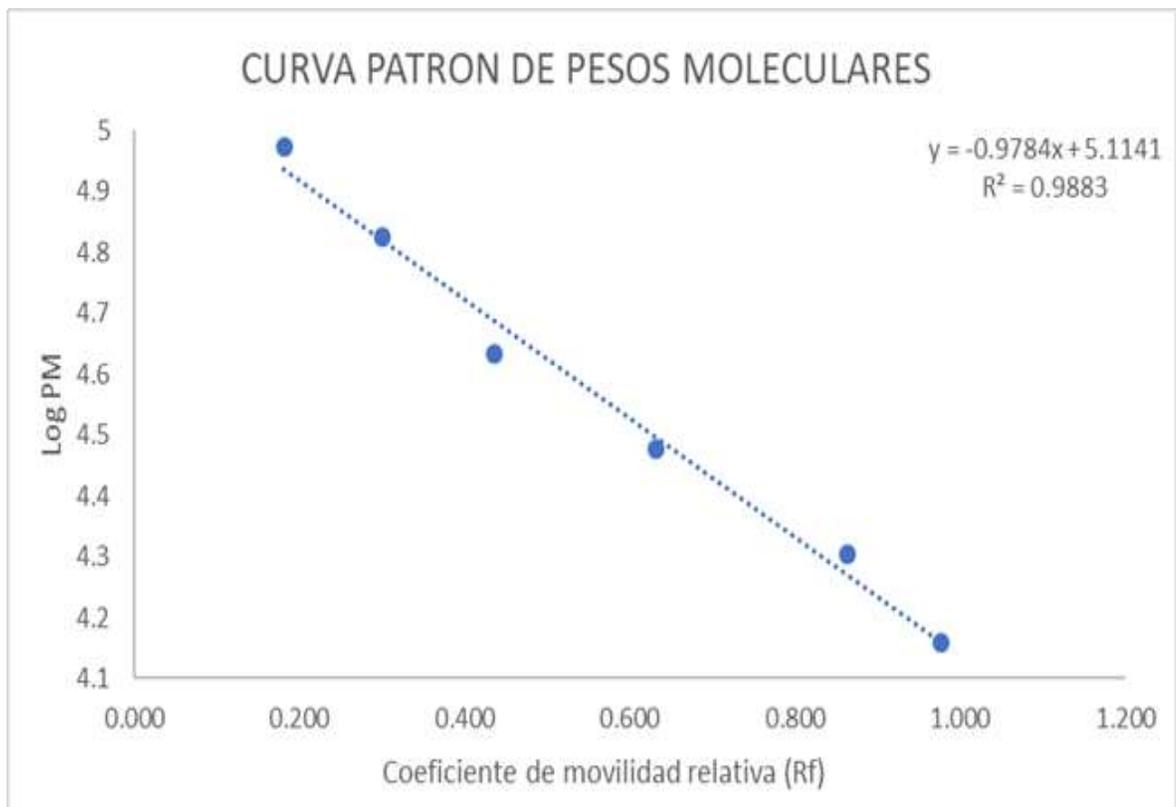
Se presentan las bandas obtenidas en un gel de poliacrilamida-SDS correspondientes al patrón de marcadores de peso molecular, las 15 bandas del extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica* con una concentración de 10 ug y de 5 ug de extracto, así como la banda de albúmina sérica bovina de 67 kDa utilizada como proteína de referencia adicionada a una concentración de 10 ug.

Tabla 7. Proteínas contenidas en el estándar de pesos moleculares.

Proteína patrón en el estándar de pesos moleculares	PM (kDa)	Log PM	Rf
Fosforilasa b	94	4.97	0.18
Albúmina sérica bovina	67	4.83	0.30
Ovoalbúmina	43	4.63	0.44
Anhidrasa carbónica	30	4.48	0.63
Inhibidor de tripsina de soya	20.1	4.30	0.86
Alfa-lactoalbúmina	14.4	4.16	0.98

Se indican las seis proteínas con sus valores de peso molecular, logaritmos de éstos y de los correspondientes valores de coeficiente de movilidad relativa (Rf), obtenidos con la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS; dichos valores se emplearon para la elaboración de la curva patrón de pesos moleculares.

Figura 6. Curva patrón de proteínas elaborada con los estándares de peso molecular empleados en la técnica de electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS.



Los valores de los logaritmos del PM de las proteínas de referencia y de los Rf de las mismas, fueron utilizados para la elaboración de la curva patrón donde se interpolaron los valores de movilidad relativa, calculados para determinar los valores de peso molecular (kDa), correspondientes a las bandas de proteínas presentes en el extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*.

Tabla 8. Pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica* cepa LBF obtenidas en el corrimiento electroforético del gel de poliacrilamida-SDS.

BANDA	Rf	Log PM	PM kDa
1	0.11	5.00	99
2	0.23	4.89	76
3	0.28	4.84	71.83
4	0.34	4.78	65.52
5	0.41	4.72	59.42
6	0.42	4.70	57.99
7	0.48	4.64	52.61
8	0.53	4.60	48.31
9	0.59	4.54	42.57
10	0.62	4.51	39.70
11	0.64	4.49	37.73
12	0.75	4.38	27.51
13	0.85	4.28	17.65
14	0.92	4.21	11.38
15	0.98	4.15	5.64

Valores de los Rf, de los logaritmos de PM, y de PM, correspondientes a las 15 bandas visualizadas en el extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica* utilizado en una cantidad de 10 ug.

6.3. Inmunización de los ratones y toma de muestras sanguíneas

Se realizaron tres inmunizaciones los días 0, 28 y 97, y las muestras sanguíneas murinas se tomaron el día 0 (basal), día 38 y día 105, de acuerdo a lo descrito anteriormente en la metodología. El volumen de suero obtenido de cada animal fluctuó en un rango entre 50 ul a 100 ul a partir de un volumen de sangre entre 100 ul a 200 ul, respectivamente.

6.4. Técnicas serológicas para determinar los niveles de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* en sueros murinos

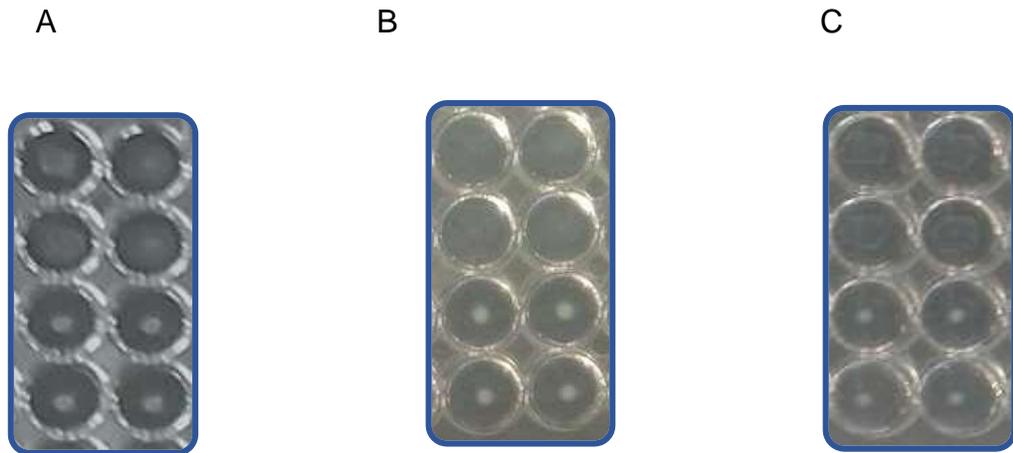
Para la determinación de los niveles de anticuerpos en el suero de los ratones se realizaron las técnicas serológicas de prueba de aglutinación en microplaca y la prueba de inmunoensayo ELISA, las cuales fueron previamente estandarizadas para llevar a cabo la detección de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* presentes en las muestras séricas de ratones durante el día 0 (basales), día 38 y día 105.

6.4.1. Estandarización de la técnica de aglutinación en microplaca

Se trabajaron por duplicado una serie de doce diluciones dobles iniciando con la dilución 1:20 de dos sueros murinos, uno que resultó positivo y otro negativo a la presencia de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*. Como antígeno se utilizaron tres diluciones (1:1, 1:2, 1:4), de una suspensión de *B. bronchiseptica* ajustada a una DO=1. El análisis de los resultados mostró que la dilución 1:4 fue la más adecuada para la determinación de los niveles de anticuerpos, permitiendo observar una clara aglutinación con los sueros positivos mostrada por duplicado en la **Figura 8**, donde se aprecian las dos primeras diluciones (1:20 y 1:40) realizadas a los sueros, contenidas en los cuatro pozos superiores mostrados en los paneles, **A**: corresponde a la suspensión bacteriana concentrada 1:1, **B**: a la suspensión bacteriana diluida 1:2 y **C**: suspensión bacteriana diluida 1:4; también es posible observar por duplicado la ausencia de una reacción de aglutinación empleando las

dos primeras diluciones del suero negativo, correspondiendo a los cuatro pozos inferiores de cada panel (**A**, **B** y **C**).

Figura 7. Prueba de aglutinación en microplaca empleando la suspensión de *Bordetella bronchiseptica*



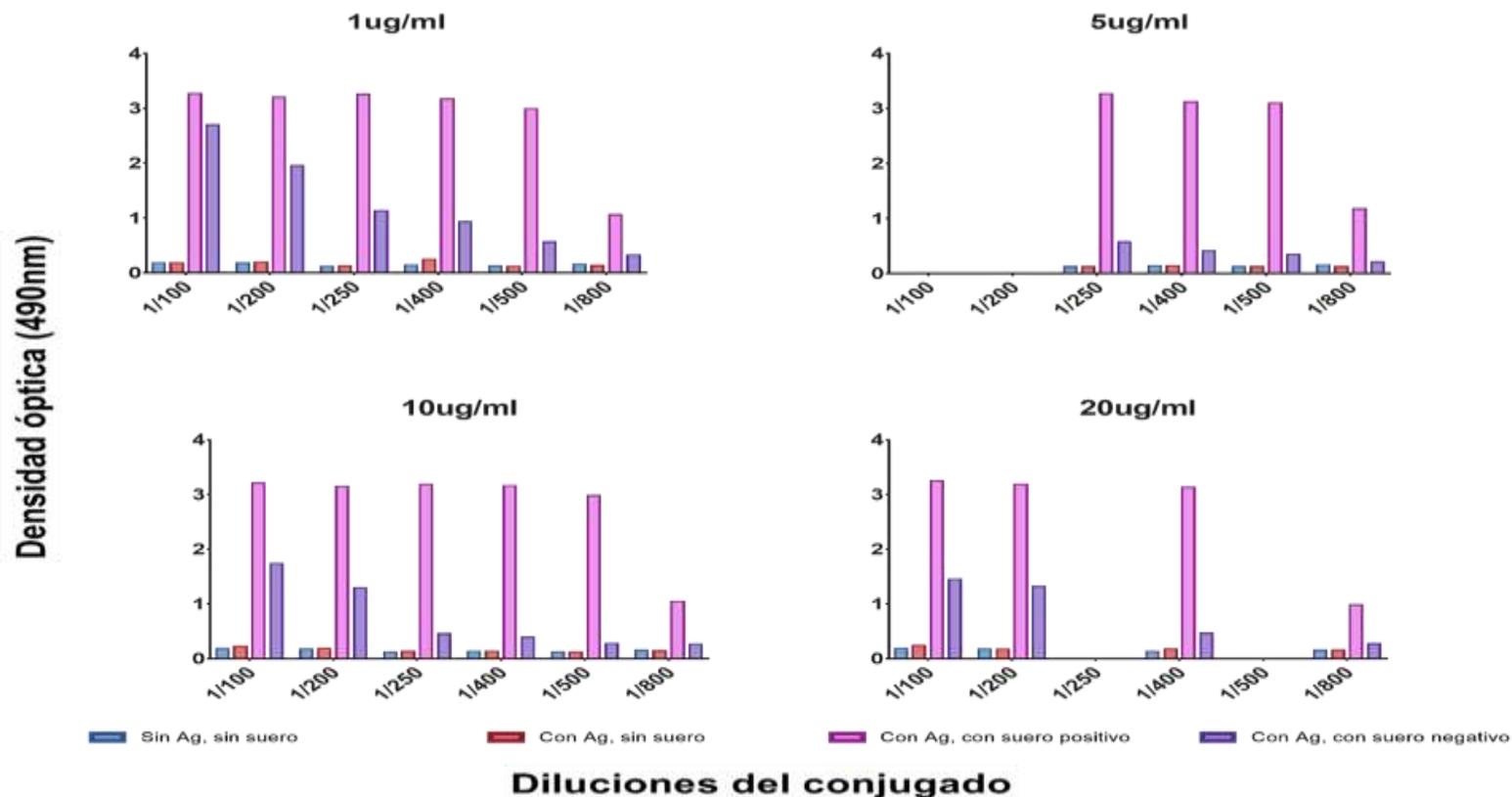
Se realizó la prueba de aglutinación en microplaca llevando a cabo una serie de 12 diluciones dobles por duplicado iniciando con la de 1:20 de dos sueros murinos (uno positivo y otro negativo), y con tres diferentes diluciones de la suspensión bacteriana ajustada a una $DO = 1$. En la ilustración se observan una reacción positiva y una negativa obtenidas empleando las dos primeras diluciones de los sueros y tres diferentes diluciones de la suspensión bacteriana, los cuatro pozos superiores de cada panel corresponden al suero positivo y los cuatro pozos inferiores al suero negativo. Panel **A**: suspensión concentrada (1:1), Panel **B**: diluida (1:2) y Panel **C**: diluida (1:4).

6.4.2. Estandarización del Ensayo ELISA

Se analizaron cuatro diferentes concentraciones del extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica* (1, 5, 10 y 20 ug/ml) y cada una de ellas se probó con seis diluciones del conjugado peroxidado anti-IgG de ratón producido en cabra (1:100, 1:200, 1:250, 1:400, 1:500, 1:800), utilizando un suero murino positivo y uno negativo, diluidos 1:100; incluyéndose controles negativos.

Los resultados se presentan en la **Figura 9**, se puede apreciar que los valores de DO para las condiciones de trabajo sin antígeno o con antígeno, incubados sin suero, pero con el resto de los reactivos, resultaron ser relativamente bajos, donde el control (barra azul) presentó valores de DO en un rango de 0.19 a 0.15, valores similares se obtuvieron para el control con antígeno sin suero (barra roja). Mientras que el suero positivo (barras rosas), con las cuatro concentraciones del extracto proteico utilizadas, presentó valores de DO elevados, que se mantuvieron en las primeras cuatro diluciones (1:100, 1:200, 1:250, 1:400) del conjugado; así mismo, los valores de DO obtenidos con el suero negativo (barras lilas), fueron relativamente bajos, a partir de la dilución 1:250 del conjugado con las cuatro concentraciones (1, 5, 10 y 20 ug/ml) del antígeno analizadas. Por lo tanto, las condiciones óptimas de trabajo que se determinaron fueron concentración de 5 µg/ml del extracto proteico de *B. bronchiseptica* y una dilución de 1:500 del conjugado peroxidado anti-IgG de ratón.

Figura 8. Estandarización de la técnica de ELISA para la determinación de los niveles de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*.



Se muestran los valores obtenidos de DO para cada una de las seis diluciones distintas (1:100, 1:200, 1:250, 1:400, 1:500 y 1:800) del conjugado peroxidado anti-Ig G de ratón producido en cabra, que se probaron con cuatro concentraciones diferentes del extracto proteico bacteriano (1, 5, 10 y 20 µg/ml), empleando un suero murino positivo (barra rosa) y uno negativo (barra lila), así como los valores de DO de un control sin antígeno y sin suero (barra azul) y otro con antígeno sin suero (barra roja)

6.4.3. Determinación de los niveles de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* en muestras séricas murinas

6.4.3.1. Ensayo de aglutinación en microplaca para la determinación del título de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*

Para realizar la determinación de los valores de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en los sueros de los ratones cepa CD1 de los nueve grupos de tratamiento, se utilizó la prueba de aglutinación en microplaca, para ello se empleó la suspensión original de *B. bronchiseptica* diluida 1:4, se llevó a cabo por duplicado la titulación de las muestras séricas correspondientes a la preinmunización (día 0) y a la postinmunización (días 38 y 105) de los ratones, con este fin se prepararon seis diluciones dobles, iniciando con la dilución 1:20.

En la **Tabla 9** se reportan los valores de los títulos de anticuerpos aglutinantes contra *B. bronchiseptica* presentes en las muestras sérica murinas, que se determinaron como el recíproco de la máxima dilución del suero donde se observó una reacción de aglutinación positiva; se puede apreciar que tanto los valores de los títulos de los sueros pertenecientes a los nueve grupos en el día cero (basales), como los correspondientes a los días 38 y 105 de los controles negativos, es decir los grupos de ratones tratados únicamente con cada uno de los adyuvantes o con solución salina (grupos 3, 6 y 9) presentaron valores de títulos negativos considerando que fueron menores a 20.

A diferencia de los animales inmunizados con los antígenos (suspensión bacteriana o extracto proteico) mezclados con los adyuvantes (grupos 1, 2, 4 y 5), en los días 38 y 105, mostraron valores elevados de títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, con excepción de algunos animales inmunizados con los antígenos mezclados con el adyuvante de Freund (grupos 1 y 2), además en esos grupos los valores de los títulos resultaron ser bastante variables, en comparación con los animales inmunizados con

quitosán más antígenos (grupos 4 y 5) los cuales mostraron valores de títulos de anticuerpos más elevados y consistentes. Sin embargo, es importante mencionar que los resultados obtenidos indican que la dosis empleada de ambos antígenos resultó ser alta, considerando que los grupos de ratones inmunizados con la suspensión bacteriana o el extracto proteico sin ninguno de los adyuvantes (grupos 7 u 8) desarrollaron niveles de anticuerpos aglutinantes, aunque se presentó una gran variabilidad en estos grupos y los valores de los títulos en su mayoría se vieron disminuidos en el día 105, principalmente en los animales tratados con el extracto proteico (grupo 8).

Los sueros correspondientes al día 38 de los animales inmunizados con suspensión bacteriana o con extracto proteico, mezclados con quitosán o con el adyuvante de Freund (grupos 1, 2, 4 y 5), presentaron valores de títulos de anticuerpos aglutinantes contra la bacteria por arriba de 20 en la mayoría de los sueros analizados; resultando interesante que en los sueros de los ratones donde se utilizó quitosán como adyuvante (grupos 4 y 5) los niveles de anticuerpos fueron más elevados en comparación con los animales inoculados con el adyuvante de Freund, independientemente del antígeno empleado (suspensión bacteriana o extracto proteico).

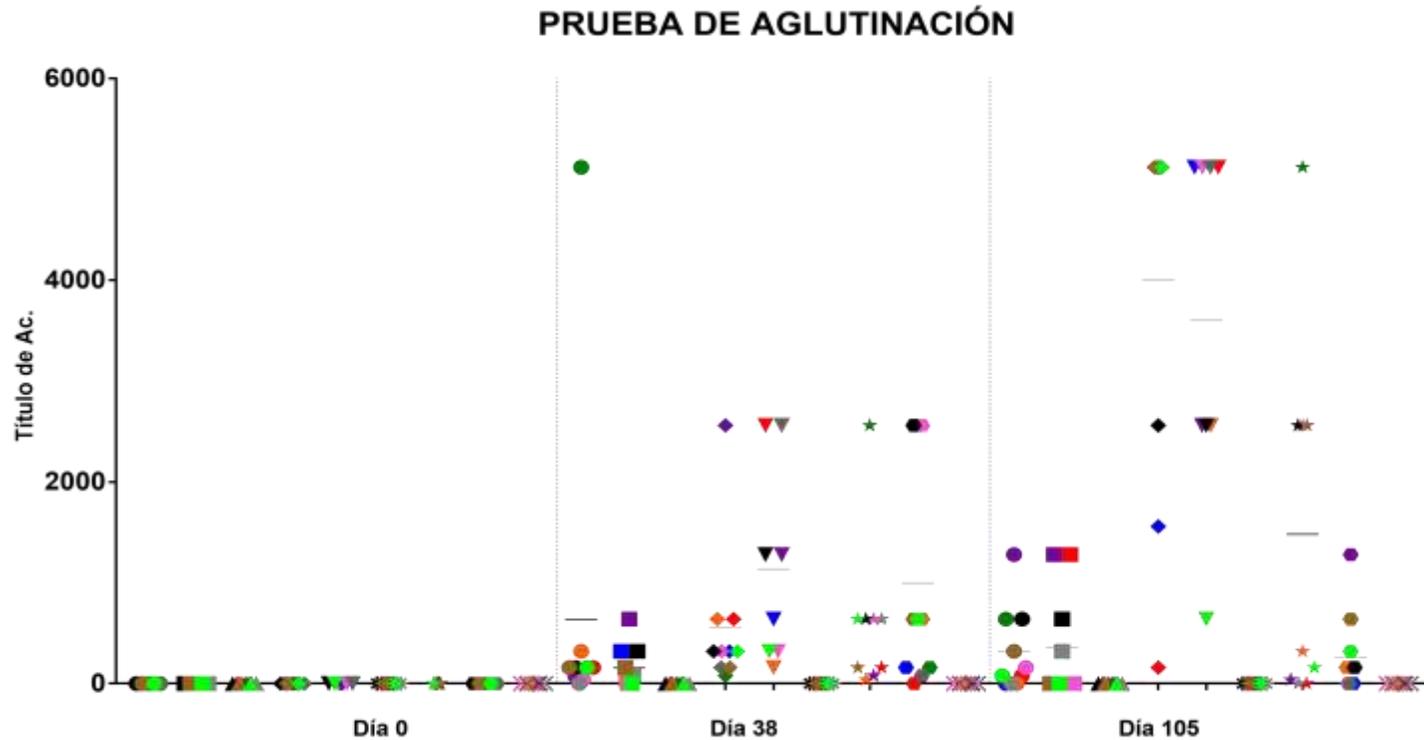
En lo que respecta a los valores de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en los sueros murinos obtenidos el día 105 de los grupos 1, 2, 4 y 5, los sueros de los animales que previamente recibieron el adyuvante de Freund con algún antígeno (grupos 1 y 2) presentaron valores de títulos de anticuerpos inconsistentes por grupo, y comparándolos con el día 38 el aumento de los niveles de anticuerpos solo se observó en algunos de los ratones, mientras que en el resto de los animales de estos grupos los niveles de anticuerpos aglutinantes disminuyeron. A diferencia de los valores de los títulos de anticuerpos aglutinantes contra la bacteria de los ratones tratados inicialmente con quitosán en combinación con la suspensión bacteriana o el extracto proteico (grupos 4 y 5), donde se observaron elevaciones considerables de dichos valores en todos los animales, a excepción de uno perteneciente al grupo 4. En la **Figura 10** se reportan graficados estos resultados.

Tabla 9. Valores de los títulos de anticuerpos aglutinantes de las muestras sérica murinas obtenidos en la prueba de aglutinación en microplaca correspondientes a los días 0, 38 y 105.

Tratamiento	Código del suero	Día de toma de muestra			Tratamiento	Código del suero	Día de toma de muestra			Tratamiento	Código del suero	Día de toma de muestra		
		0	38	105			0	38	105			0	38	105
G1 Adyuvante de Freund + Suspensión Bacteriana	G1-S1	< 20	160	80	G2 Adyuvante de Freund + Extracto Proteico	G2-S1	< 20	< 20	1280	G3 Adyuvante de Freund + Solución Salina	G3-S1	< 20	< 20	< 20
	G1-S2	< 20	5120	640		G2-S2	< 20	< 20	< 20		G3-S2	< 20	< 20	< 20
	G1-S3	< 20	320	< 20		G2-S3	< 20	40	< 20		G3-S3	< 20	< 20	< 20
	G1-S4	< 20	160	< 20		G2-S4	< 20	320	< 20		G3-S4	< 20	< 20	< 20
	G1-S5	< 20	80	1280		G2-S5	< 20	640	1280		G3-S5	< 20	< 20	< 20
	G1-S6	< 20	40	160		G2-S6	< 20	< 20	< 20		G3-S6	< 20	< 20	< 20
	G1-S7	< 20	160	640		G2-S7	< 20	320	640		G3-S7	< 20	< 20	< 20
	G1-S8	< 20	< 20	< 20		G2-S8	< 20	80	320		G3-S8	< 20	< 20	< 20
	G1-S9	< 20	160	320		G2-S9	< 20	160	< 20		G3-S9	< 20	< 20	< 20
	G1-S10	< 20	160	80		G2-S10	< 20	< 20	< 20		G3-S10	< 20	< 20	< 20
G4 Termogel de Quitosán + Suspensión Bacteriana	G4-S1	< 20	640	160	G5 Termogel de Quitosán + Extracto Proteico	G5-S1	< 20	2560	5120	G6 Termogel de Quitosán + Solución Salina	G6-S1	< 20	< 20	< 20
	G4-S2	< 20	80	5120		G5-S3	< 20	160	2560		G6-S2	< 20	< 20	< 20
	G4-S3	< 20	640	5120		G5-S4	< 20	640	5120		G6-S3	< 20	< 20	< 20
	G4-S4	< 20	320	1560		G5-S5	< 20	1280	2560		G6-S4	< 20	< 20	< 20
	G4-S5	< 20	2560	5120		G5-S6	< 20	320	5120		G6-S5	< 20	< 20	< 20
	G4-S6	< 20	320	5120		G5-S7	< 20	1280	2560		G6-S6	< 20	< 20	< 20
	G4-S7	< 20	320	2560		G5-S8	< 20	2560	5120		G6-S7	< 20	< 20	< 20
	G4-S8	< 20	160	5120		G5-S10	< 20	320	640		G6-S8	< 20	< 20	< 20
	G4-S9	< 20	160	5120							G6-S9	< 20	< 20	< 20
	G4-S10	< 20	320	5120							G6-S10	< 20	< 20	< 20
G7 Solución Salina + Suspensión Bacteriana	G7-S1	< 20	160	< 20	G8 Solución Salina + Extracto Proteico	G8-S1	< 20	< 20	< 20	G9 Solución Salina + Solución Salina	G9-S1	< 20	< 20	< 20
	G7-S2	< 20	2560	5120		G8-S2	< 20	160	< 20		G9-S2	< 20	< 20	< 20
	G7-S3	< 20	40	320		G8-S3	< 20	640	160		G9-S3	< 20	< 20	< 20
	G7-S5	< 20	80	40		G8-S4	< 20	160	< 20		G9-S4	< 20	< 20	< 20
	G7-S6	< 20	640	2560		G8-S5	< 20	2560	1280		G9-S5	< 20	< 20	< 20
	G7-S7	< 20	640	2560		G8-S6	< 20	2560	< 20		G9-S6	< 20	< 20	< 20
	G7-S8	< 20	640	< 20		G8-S7	< 20	2560	160		G9-S8	< 20	< 20	< 20
	G7-S9	< 20	160	2560		G8-S8	< 20	80	< 20		G9-S9	< 20	< 20	< 20
	G7-S10	< 20	640	160		G8-S9	< 20	640	640					
						G8-S10	< 20	640	320					

Distribución de los ratones cepa CD1 en los diferentes grupos de tratamiento y valores de los títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* obtenidos en los sueros murinos considerando los tres días de extracción sanguínea (0, 38 y 105).

Figura 9. Niveles graficados de títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* obtenidos en la prueba de aglutinación empleando los sueros de los ratones cepa CD1 correspondientes a los días 0, 38 y 105.



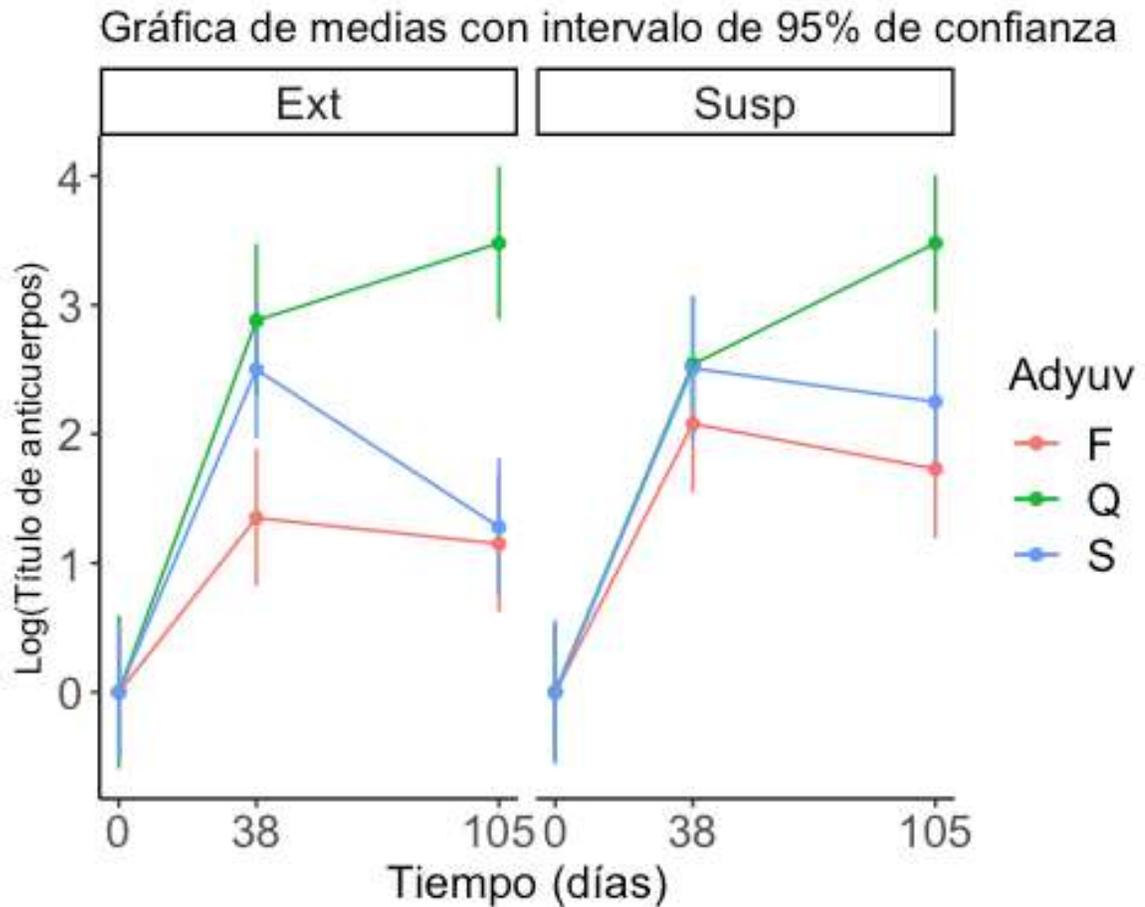
Valores de títulos de anticuerpos contra la bacteria obtenidos en los sueros trabajados por duplicado, de los nueve grupos de animales correspondientes a los días 0, 38 y 105, postinoculación, cada grupo de animales se representa con los símbolos siguientes: ● Adyuvante de Freund+ suspensión bacteriana (grupo 1), ■ Adyuvante de Freund + extracto bacteriano (grupo 2), ▲ Adyuvante de Freund + Solución salina (sin antígeno, grupo 3), ◆ Termogel de quitosán + suspensión bacteriana (grupo 4), ▼ Termogel de quitosán + extracto bacteriano (grupo 5), * Termogel de quitosán + solución salina (sin antígeno, grupo 6), ★ Solución salina + suspensión bacteriana (grupo 7), ● Solución salina + extracto bacteriano (grupo 8), ✕ Solución salina + solución salina (sin antígeno, grupo 9).

6.4.3.2. Análisis estadístico de resultados de la prueba de aglutinación en microplaca

En la **Figura 11** se observa la gráfica correspondiente a los resultados obtenidos en la prueba de aglutinación en microplaca, donde se compara, el logaritmo del promedio de los valores de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, en los sueros murinos obtenidos en el día 0, los días 38 y 105 postinmunización de todos los grupos experimentales, se puede apreciar que el promedio de los valores de los títulos de anticuerpos en los ratones tratados con quitosán más extracto proteico (grupo 5) y quitosán más suspensión bacteriana (grupo 4), presentan una continua elevación de los valores que se prolonga hasta los días 38 y 105, reflejando que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en lo que respecta al tipo de antígeno utilizado con quitosán. El promedio del valor de títulos de anticuerpos obtenido en el día 105 de los grupos tratados con quitosán más extracto proteico (grupo 5) o suspensión bacteriana (grupo 4), fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que los promedios de los niveles de anticuerpos obtenidos en los sueros de los ratones inoculados con estos mismos antígenos mezclados con el adyuvante de Freund (grupos 1 y 2) o con solución salina (grupos 7 y 8).

Los valores promedio de los títulos de anticuerpos aglutinantes contra *Bordetella bronchiseptica* en los sueros de los animales tratados con el adyuvante de Freund y alguno de los dos antígenos (grupos 1 y 2) en los días 38 y 105, presentaron valores de títulos de anticuerpos por debajo de los obtenidos en los grupos tratados con quitosán más alguno de los antígenos (suspensión bacteriana o extracto proteico, grupos 4 y 5 respectivamente) en los mismos días, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de los títulos de anticuerpos contra la bacteria en los grupos tratados con quitosán más antígenos (grupos 4 y 5) y los niveles de anticuerpos obtenidos en los sueros de los ratones tratados con el adyuvante de Freund más antígenos (grupos 1 y 2), independientemente del antígeno inoculado.

Figura 10. Valores de medias con el 95 % de confianza, de Log del valor del título de anticuerpos aglutinantes contra *Bordetella bronchiseptica* en sueros murinos y el tiempo (días) de sangrado.



Comparativo entre los promedios de los niveles de títulos de anticuerpos séricos contra *B. bronchiseptica*, en tres días distintos 0 basales, 38 y 105 obtenidos postinoculación de los diferentes adyuvantes (quitosán y adyuvante de Freund) o la SSF y el extracto proteico (gráfica de la izquierda) o la suspensión bacteriana (gráfica de la derecha), administrados a ratones cepa CD1. No se encontró diferencia significativa entre los dos antígenos utilizados (suspensión bacteriana y extracto proteico) ($p > 0.05$).

En lo que respecta al día 38, se observó que los valores promedio de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en los grupos tratados con quitosán y los tratados con solución salina, ambos acompañados con la suspensión bacteriana (grupo 4 y grupo 7) o el extracto proteico (grupo 5 y grupo 8) no tuvieron diferencia significativa ($p > 0.05$), obteniéndose valores de títulos de anticuerpos similares en estos grupos. Comparando los niveles de anticuerpos de los animales inmunizados obtenidos en los grupos tratados con solución salina o con el adyuvante Incompleto de Freund en el día 38, se presentó un fenómeno muy singular, puesto que los valores promedio de los títulos de anticuerpos en los sueros de los animales inmunizados con suspensión bacteriana o extracto proteico, mezclados con solución salina, grupo 7 y grupo 8, respectivamente, fueron mayores que los obtenidos con el adyuvante incompleto de Freund, (grupo 1 y grupo 2) independientemente del antígeno utilizado ($p < 0.05$); en caso contrario, para el día 105 no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los valores promedio de título de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, obtenidos en los sueros murinos de los grupos tratados inicialmente con el adyuvante de Freund más ambos antígenos en forma independiente (grupo 1 y grupo 2) y los grupos de ratones inoculados con solución salina, más estos antígenos (grupo 7 y grupo 8) ($p > 0.05$).

En la **Tabla 10** se muestra el análisis que se obtuvo de la prueba estadística de ANOVA de los valores de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en los sueros de los ratones, determinados por la técnica de aglutinación, donde se puede apreciar que al comparar el tipo de adyuvante con respecto al tiempo y determinar el valor p , se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellos, pero no existió una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los antígenos utilizados.

Considerando lo mencionado en el párrafo anterior con respecto a que no existió una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de anticuerpos presentados en los grupos de animales inmunizados con los dos tipos de inmunógenos, se procedió a calcular los valores promedios de los títulos de anticuerpos correspondientes a los grupos inmunizados con suspensión bacteriana

y extracto proteico acompañado con el adyuvante de Freund, quitosán o SSF con respecto al tiempo; en la **Figura 12** se muestran los logaritmos de los valores promedios de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* determinados en los sueros murinos obtenidos los días 0, 38 y 105, mostrando la comparación entre los dos tipos de adyuvantes utilizados (quitosán y adyuvante de Freund) y la SSF,

Tabla 10. Valores obtenidos en la prueba estadística ANOVA de los niveles de títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*

Fuente de variación	Grados de libertad	denDF	Estadística F	Valor p
Adyuvante	2	51	15.6451	<0.0001
Antígeno	1	51	2.2952	0.1359
Tiempo	1	51	0.4238	0.5180
Adyuvante: Antígeno	2	51	1.2572	0.2931
Adyuvante: Tiempo	2	51	8.4072	0.0007
Antígeno: Tiempo	1	51	1.4320	0.2370
Adyuvante:Antígeno:Tiempo	2	51	1.0843	0.3458

ANOVA de los niveles de anticuerpos en sueros murinos determinados por la prueba de aglutinación en microplaca analizando el tipo de adyuvante, de antígeno y el tiempo postinmunización. Considerando el valor p obtenido, se aprecia que existe un efecto significativo del tipo de adyuvante, pero no de la presentación del antígeno (suspensión bacteriana o extracto proteico).

observándose que en el día 38 se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre quitosán y adyuvante de Freund, así como entre solución salina y adyuvante de Freund ($p < 0.05$), sin embargo, no se encontró una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre quitosán y SSF. En la **Tabla 11** se observan las comparaciones múltiples de las medias de los valores de los títulos de anticuerpos contra la bacteria obtenidos en los sueros de los ratones tratados con los distintos adyuvantes en el día 38.

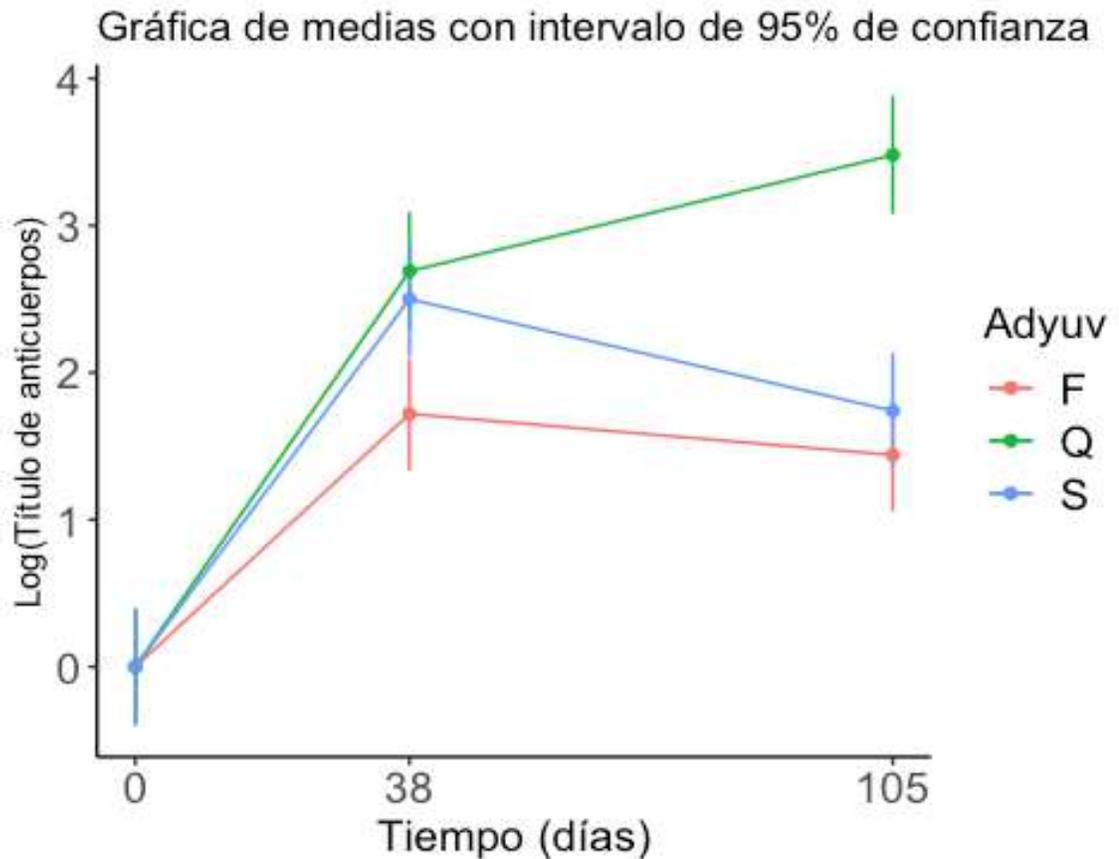
En la **Figura 12** también se puede observar que en el día 105 el valor promedio de títulos de anticuerpos de los grupos tratados con ambos inmunógenos fue significativamente mayor ($p < 0.05$) cuando en las dos primeras inmunizaciones se acompañaron con quitosán que cuando se mezclaron con el adyuvante de Freund o con SSF; se observa además que los grupos tratados con ambos inmunógenos y adyuvante de Freund presentaron una disminución en los valores promedio de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, similar al comportamiento que se encontró en los animales tratados con los inmunógenos más la SSF, no existiendo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos. En la **Tabla 12** se muestran las comparaciones múltiples de las medias de los valores de los títulos de anticuerpos contra la bacteria obtenidos por la técnica de aglutinación en el día 105.

Tabla 11. Comparaciones múltiples de las medias de los valores de los títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* por la técnica de aglutinación obtenidas en el día 38.

Contraste	Estimado	SE	df	Radio t	Valor p
Q - F	0.975	0.336	54	2.898	0.0148
F - SSF	-0.786	0.332	54	- 2.370	0.0548
Q - SSF	0.188	0.340	54	0.553	0.8451

Se observa la diferencia de medias estimada entre los ratones tratados con los adyuvantes quitosán (Q), Freund (F) y solución salina (SSF). El valor p indica que existe diferencia significativa entre Q y F ($p < 0.05$), pero no entre SSF y F ($p > 0.05$), tampoco se observó una diferencia significativa, entre Q y SSF ($p > 0.05$).

Figura 11. Valores graficados de medias con el 95 % de confianza del Log del promedio de los valores de los títulos de anticuerpos aglutinantes contra *Bordetella bronchiseptica* en sueros murinos en el día 0 y los días 38 y 105 postinmunización.



Comparativo entre los diferentes adyuvantes (quitosán o adyuvante de Freund) o la SSF, y los promedios de los niveles de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en sueros de ratones cepa CD1; aclarando que no se muestra el efecto del tipo de antígeno (extracto proteico o suspensión bacteriana) debido a que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos.

Tabla 12. Comparaciones múltiples de las medias de los valores de los títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* por la técnica de aglutinación obtenidas el día 105.

Contraste	Estimado	SE	df	Radio t	Valor p
Q - F	2.041	0.336	54	6.069	0.0001
F - SSF	- 0.303	0.332	54	- 0.913	0.6344
Q - SSF	1.738	0.340	54	5.105	0.0001

Se observa la diferencia de medias estimada entre los animales tratados con los adyuvantes quitosán (Q), Freund (F) y solución salina (SSF). El valor p indica que hay diferencia significativa entre Q y F ($p < 0.0001$), así como entre Q y SSF ($p < 0.0001$), Sin embargo, entre F y SSF, no se encontró una diferencia significativa ($p > 0.05$).

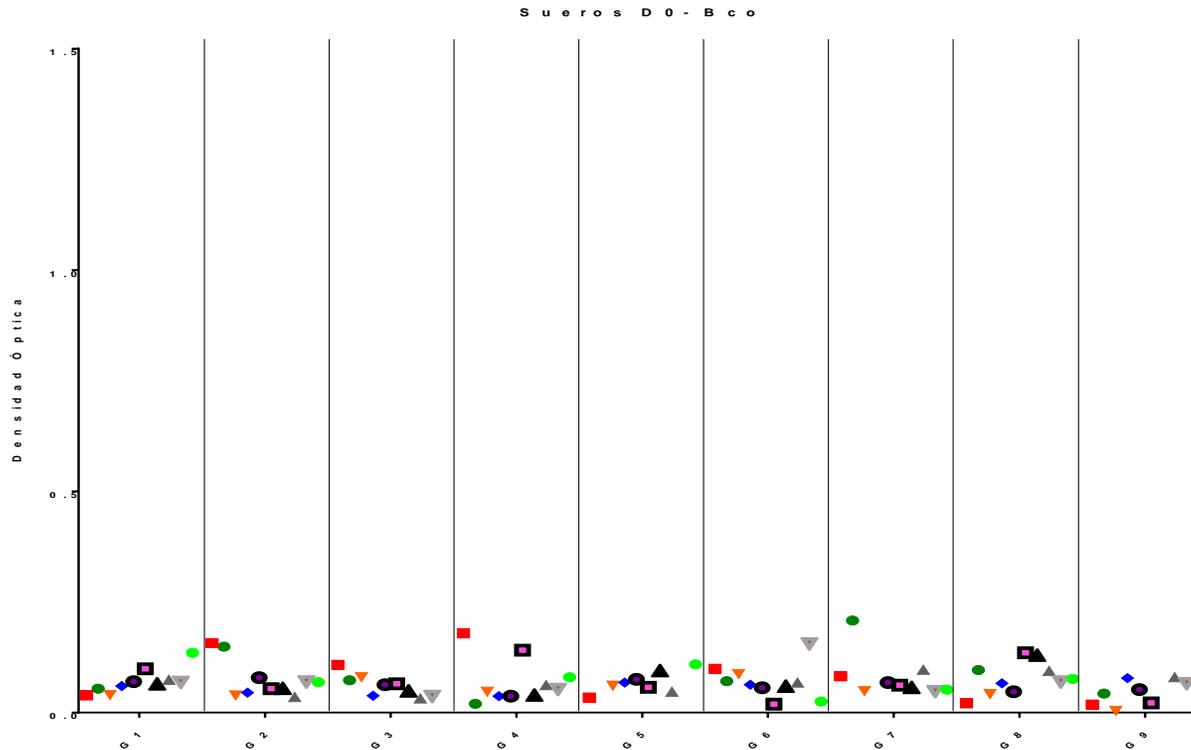
6.4.3.3. Determinación de los niveles de anticuerpos en sueros murinos por la técnica de ELISA

Se realizó la determinación de los niveles de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* presentes en las muestras de sueros murinos, correspondientes al día 0 (basal) y al día 105 postinoculación, empleando la técnica de ELISA con las condiciones óptimas de trabajo, (5 µg/ml del extracto proteico de *B. bronchiseptica* y la dilución 1:500 del conjugado peroxidado), la determinación de los valores del título de anticuerpos se realizó considerando un punto de corte de 0.252, que se estableció a partir del promedio más dos desviaciones estándar de las DO de los sueros obtenidos en la dilución 1:2000 del tiempo 0 preinoculación.

Los resultados de DO obtenidos de los sueros correspondientes al día 0 se representan en la **Figura 13**, donde se pueden observar los valores bajos de DO que se determinaron por la técnica de ELISA, los cuales fueron considerados negativos en todos los animales de los nueve grupos, indicando la ausencia de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, puesto que los ratones aún no habían tenido contacto con el antígeno.

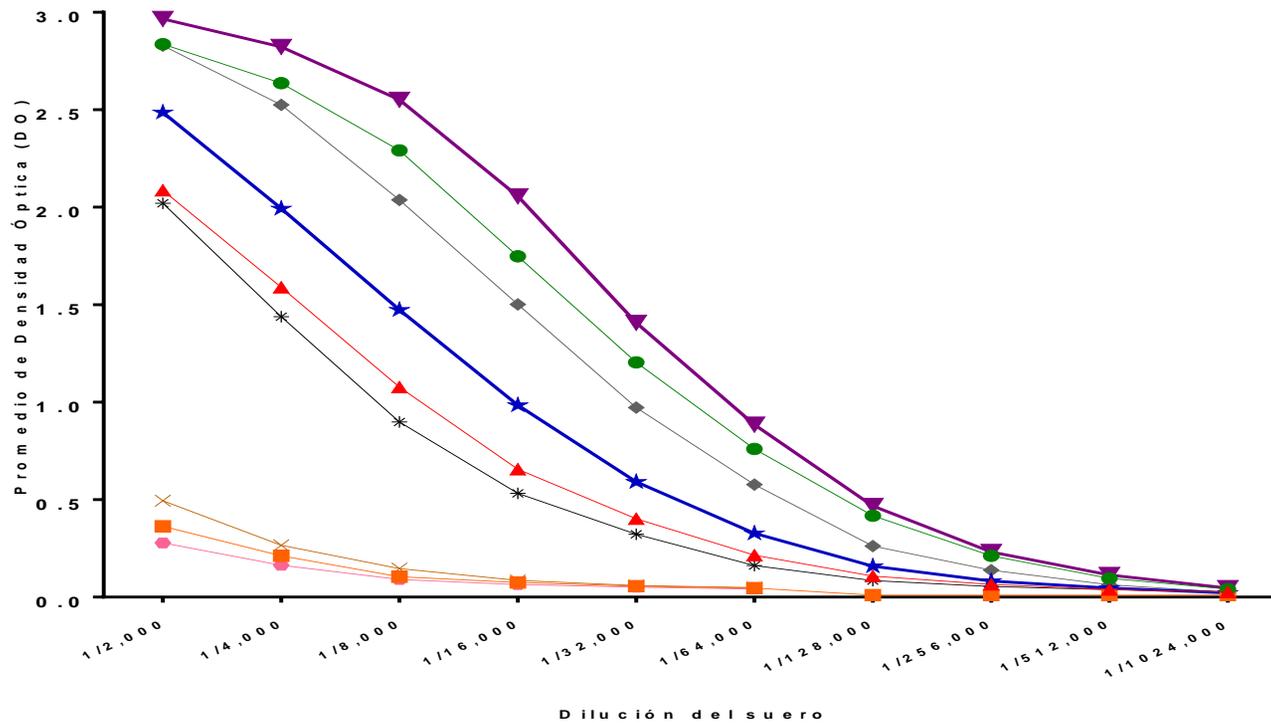
En la **Figura 14** se grafican los valores promedio de DO obtenidos de la prueba ELISA para todas las muestras séricas correspondientes al día 105, empleando diez diluciones de cada uno de los sueros. Se puede apreciar que la mayoría de las muestras séricas de los ratones pertenecientes a los grupos que recibieron algún antígeno (extracto proteico o suspensión bacteriana), combinado con alguno de los dos adyuvantes utilizados en el presente trabajo (adyuvante de Freund y quitosán) o solución salina presentaron valores altos de DO, indicando la presencia de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*; mientras que los grupos sin antígeno, pero con adyuvante de Freund, quitosán o sin adyuvante, presentaron valores bajos de DO en todas las diluciones.

Figura 12. Valores de DO correspondientes a los niveles de títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* presentados por los sueros murinos del día 0 (basal) en la prueba de ELISA



Se muestran los valores promedios de DO presentados por las muestras séricas murinas del día 0 (basal), correspondientes a los títulos de anticuerpos contra la bacteria determinados en los nueve grupos de ratones cepa CD1 analizados. Cada animal se representa por medio de un ícono y color de figura diferente dentro de cada grupo. adyuvante de Freund+ suspensión bacteriana (**G1**, grupo 1), adyuvante de Freund + extracto proteico (**G2**, grupo 2), adyuvante de Freund + SSF (sin antígeno) (**G3**, grupo 3), termogel de quitosán + suspensión bacteriana (**G4**, grupo 4), termogel de quitosán + extracto proteico (**G5**, grupo 5), termogel de quitosán + SSF (sin antígeno) (**G6**, grupo 6), SSF + suspensión bacteriana (**G7**, grupo 7), SSF + extracto proteico (**G8**, grupo 8), SSF (sin antígeno) (**G9**, grupo 9).

Figura 13. Valores graficados del promedio de DO en la prueba ELISA de las diluciones efectuadas a los sueros de ratones cepa CD1 correspondientes al día 105 postinmunización.



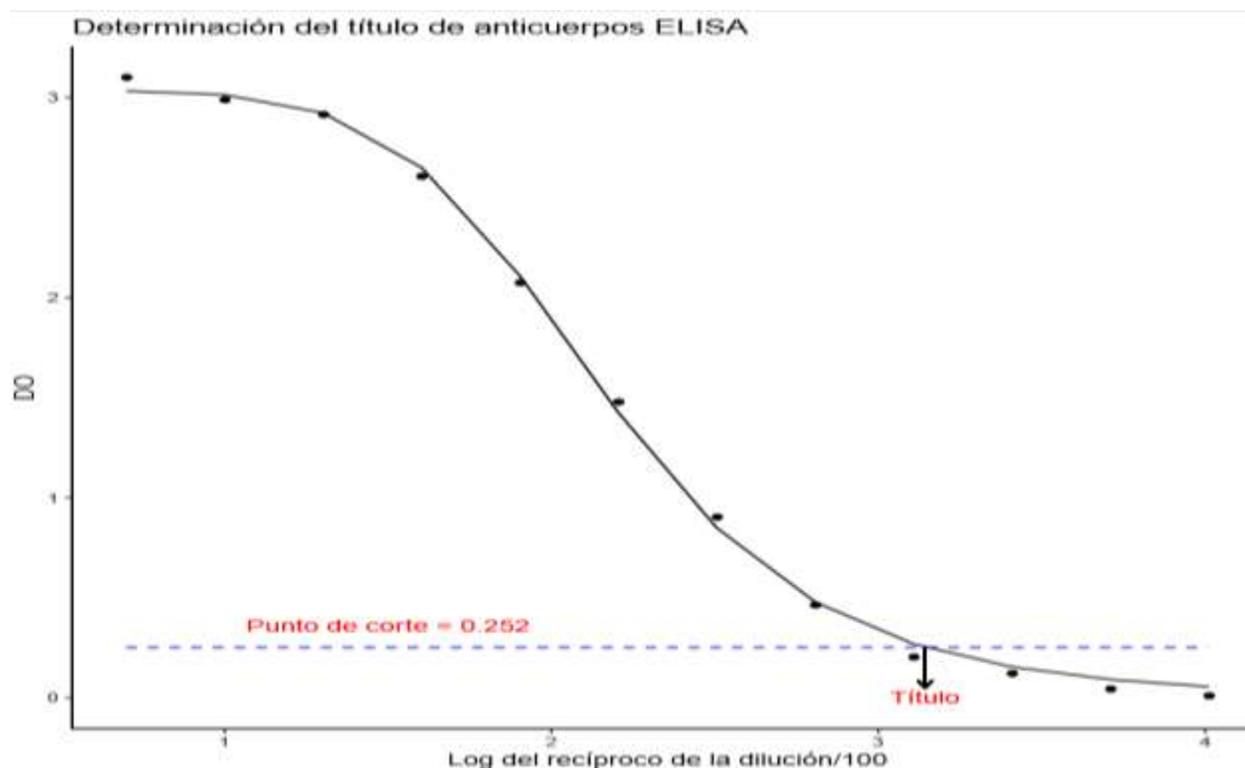
Valores promedio de DO de resultados de la prueba ELISA, en las diluciones de los sueros obtenidos el día 105, mostrados en relación a cada una de dichas diluciones del suero iniciando con 1:2000 hasta 1:1024000, de cada uno de los nueve tratamientos de inmunización que se representan de la siguiente forma; ▲ A. de Freund y suspensión bacteriana (grupo 1), ● A. de Freund y extracto proteico (grupo 2), ■ A. de Freund y SSF (grupo 3), ★ Quitosán y suspensión bacteriana (grupo 4), ▲ Quitosán y extracto proteico (grupo 5), ◆ Quitosán y SSF (grupo 6), * SSF y suspensión bacteriana (grupo 7), ◆ SSF y extracto proteico (grupo 8), ■ SSF únicamente (grupo 9).

Una vez obtenidos los valores de las DO correspondientes a cada una de las diluciones de los sueros murinos se procedió a determinar los valores de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* para todas las muestras séricas, considerando el valor de corte definido como una DO = 0.252; e interpolando en las gráficas mostradas posteriormente, dicho procedimiento se muestra en la **Figura 15**.

En la **Tabla 13** se encuentran los valores de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* y el grupo de tratamiento correspondiente a cada ratón, se aprecia que los grupos de ratones inmunizados con suspensión bacteriana o con extracto proteico utilizando el adyuvante de Freund (grupos 1 y 2), presentaron niveles elevados de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, en el grupo tratado con el adyuvante de Freund con suspensión bacteriana (grupo 1), los valores de los títulos de anticuerpos fluctuaron entre 7000 hasta 79000; en el grupo de animales tratados con el mismo adyuvante y extracto proteico (grupo 2), los niveles de anticuerpos en los animales alcanzaron valores entre 38000 y 667000. En lo que respecta a los grupos de ratones que fueron inmunizados utilizando quitosán como adyuvante y suspensión bacteriana (grupo 4), alcanzaron valores de título de anticuerpos de 17000 hasta 214000; mientras que los valores de títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en los sueros de los animales tratados con quitosán y extracto proteico (grupo 5) también presentaron valores elevados de anticuerpos, además de mostrar una menor variabilidad entre ellos, alcanzando valores de títulos de anticuerpos que se encontraron entre 119000 y 512000.

En los sueros de los grupos de ratones inmunizados con extracto proteico de *B. bronchiseptica* y SSF sin adyuvante (grupo 8), se obtuvieron valores de títulos de anticuerpos contra la bacteria que fluctuaron entre 113000 y 555000, mientras que los valores de los títulos de anticuerpos de los sueros murinos correspondientes al grupo que fue tratado con suspensión bacteriana y SSF (grupo 7) resultaron ser

Figura 14. Obtención del valor de título de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* por la técnica ELISA en sueros murinos colectados el día 105.



Se realizó la determinación del nivel de título de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* utilizando el punto de corte calculado con el promedio de los niveles de DO más dos desviaciones estándar correspondientes a los sueros basales de los ratones, dicho punto de corte se interpoló en una gráfica elaborada con los valores de los logaritmos del recíproco/100 de las diluciones efectuadas a cada uno de los sueros murinos y las lecturas de DO obtenidas en ellas, para la elaboración de la gráfica se realizó el ajuste del modelo log-logístico a las lecturas de DO de cada una de las diluciones efectuadas a los sueros murinos. En la **Figura 15** se ilustra la curva obtenida para un ratón del grupo 1 tratado con el Adyuvante de Freund combinado con la suspensión bacteriana.

Tabla 13. Valores de títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* de las muestras sérica murinas obtenidos en la prueba ELISA correspondientes al día 105 postinmunización

Tratamiento	Código del suero	Día de toma de muestra	Tratamiento	Código del suero	Día de toma de muestra	Tratamiento	Código del suero	Día de toma de muestra
	G1	105		G2	105		G3	105
G1 Adyuvante de Freund + Suspensión Bacteriana	G1-S1	38709	G2 Adyuvante de Freund + Extracto Proteico	G2-S1	100690	G3 Adyuvante de Freund + Solución Salina	G3-S1	500
	G1-S2	7784		G2-S2	839082		G3-S2	500
	G1-S3	21555		G2-S3	123943		G3-S3	500
	G1-S4	79018		G2-S4	135273		G3-S4	500
	G1-S5	76228		G2-S5	218348		G3-S5	500
	G1-S6	61246		G2-S6	217829		G3-S6	500
	G1-S7	42696		G2-S7	82297		G3-S7	500
	G1-S8	34223		G2-S8	90107		G3-S8	500
	G1-S9	66543		G2-S9	370750		G3-S9	500
	G1-S10	33614		G2-S10	667832		G3-S10	500
G4 Termogel de Quitosán + Suspensión Bacteriana	G4-S1	58271	G5 Termogel de Quitosán + Extracto Proteico	G5-S1	125233	G6 Termogel de Quitosán + Solución Salina	G6-S1	500
	G4-S2	38024		G5-S3	422957		G6-S2	500
	G4-S3	149545		G5-S4	147763		G6-S3	500
	G4-S4	74038		G5-S5	511844		G6-S4	500
	G4-S5	58933		G5-S6	136778		G6-S5	500
	G4-S6	49512		G5-S7	286658		G6-S6	500
	G4-S7	187208		G5-S8	119229		G6-S7	500
	G4-S8	214069		G5-S10	336312		G6-S8	500
	G4-S9	56512					G6-S9	500
	G4-S10	16668					G6-S10	500
G7 Solución Salina + Suspensión Bacteriana	G7-S1	35039	G8 Solución Salina + Extracto Proteico	G8-S1	138908	G9 Solución Salina + Solución Salina	G9-S1	500
	G7-S2	138041		G8-S2	162409		G9-S2	500
	G7-S3	34300		G8-S3	113221		G9-S3	500
	G7-S5	13601		G8-S4	115985		G9-S4	500
	G7-S6	58366		G8-S5	150592		G9-S5	500
	G7-S7	25208		G8-S6	555667		G9-S6	500
	G7-S8	32481		G8-S7	162911		G9-S8	500
	G7-S9	26576		G8-S8	146785		G9-S9	500
	G7-S10	51001		G8-S9	195668			
				G8-S10	263276			

Determinación de los valores del título de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* utilizando el punto de corte (0.252) en los resultados de DO obtenidos en la prueba ELISA, realizada a los sueros de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento obtenidos el día 105 postinmunización

entre 38000 y 214000 aproximadamente, siendo más bajos con respecto al grupo de ratones inmunizados con el extracto proteico y SSF.

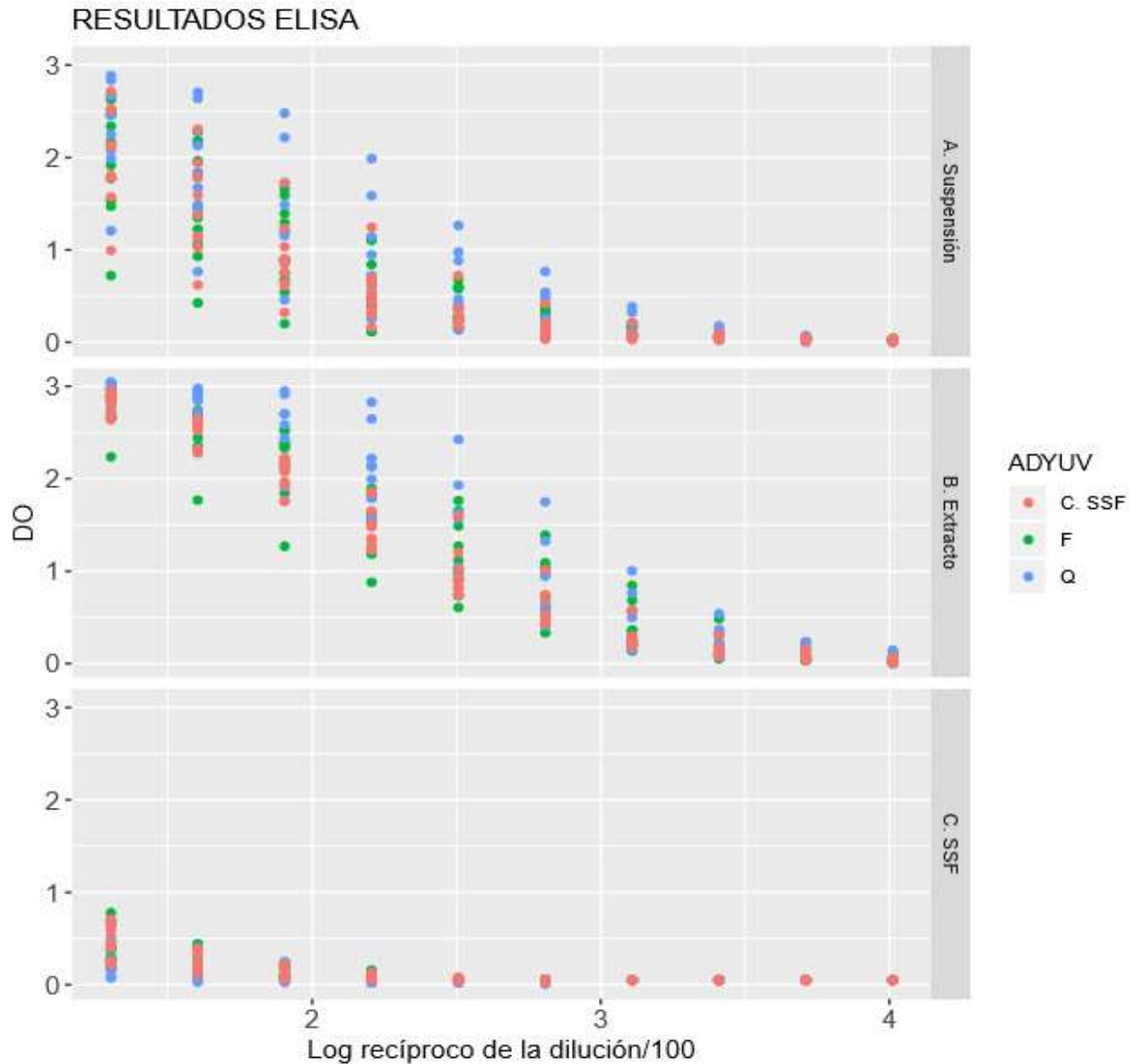
También se obtuvieron las lecturas de los sueros de los grupos de ratones inmunizados solo con los adyuvantes, grupos 3, 6 y 9, sin antígeno con adyuvante de Freund, quitosán y sin adyuvante, respectivamente, las cuales presentaron valores negativos de títulos de anticuerpos. Haciendo una comparación entre los dos adyuvantes utilizados (adyuvante de Freund y quitosán) y los niveles de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*, se puede observar que los sueros de los ratones del grupo que recibió quitosán y suspensión bacteriana (grupo 4), presentaron valores similares de títulos de anticuerpos, que los obtenidos para el grupo inoculado con el adyuvante de Freund y suspensión bacteriana (grupo 1). Así mismo, realizando una comparación entre los valores de títulos de anticuerpos desarrollados en los grupos de adyuvante de Freund con extracto proteico (grupo 2) y quitosán con extracto proteico (grupo 5), se observa que ambos presentaron niveles elevados de anticuerpos indicando que estas condiciones indujeron una eficiente respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

6.4.3.4. Análisis estadístico de resultados prueba ELISA

En la **Figura 16** se muestran los datos correspondientes a la DO obtenida para todas las diluciones (Log recíproco de la dilución/100) de los sueros murinos en forma individual y para cada uno de los tratamientos aplicados a los nueve grupos de ratones cepa CD1; considerando los dos adyuvantes (Freund y quitosán) y la SSF, así como la presentación del antígeno (suspensión bacteriana y extracto proteico) y los grupos controles negativos (sin antígenos); en la gráfica se observa que independientemente del tipo de antígeno utilizado existe una mayor variabilidad en los grupos de ratones tratados con adyuvante de Freund (grupo 1 y grupo 2), en cambio en los grupos tratados con quitosán (grupos 4 y 5) se aprecian datos más consistentes de títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*; se muestra también el comportamiento de las curvas de los grupos controles que no recibieron antígenos (grupos 3, 6 y 9) apreciándose valores de D.O. bajos en comparación a los presentados por los otros grupos.

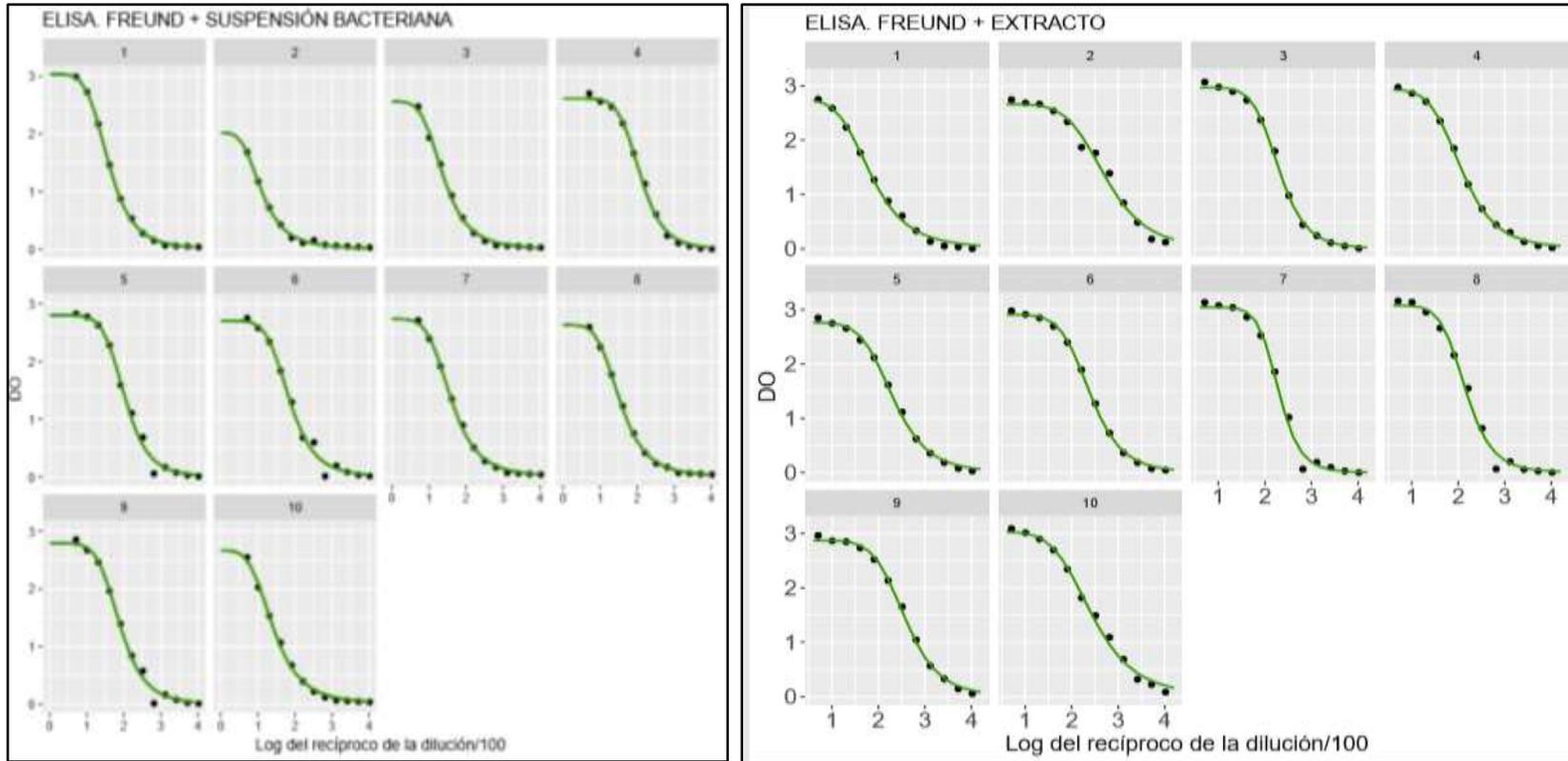
En las **Figuras 17 y 18** se observa la relación existente entre la DO y la dilución (expresada como el log del recíproco de la dilución /100) de la muestra sérica, observándose los puntos correspondientes a los datos obtenidos con cada dilución para cada uno de los sueros de los ratones y la curva ajustada con el modelo log-logístico, se aprecia claramente un excelente ajuste del modelo a los datos; la interpolación del punto de corte ($DO=0.252$) en las curvas se utilizó para obtener el valor del título de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* para cada unidad experimental.

Figura 15. Valores de DO resultado de la prueba ELISA y del Log del recíproco de la dilución dividido por 100, correspondientes a todos los sueros de ratones cepa CD1 inmunizados con *Bordetella bronchiseptica* del día 105 postinmunización



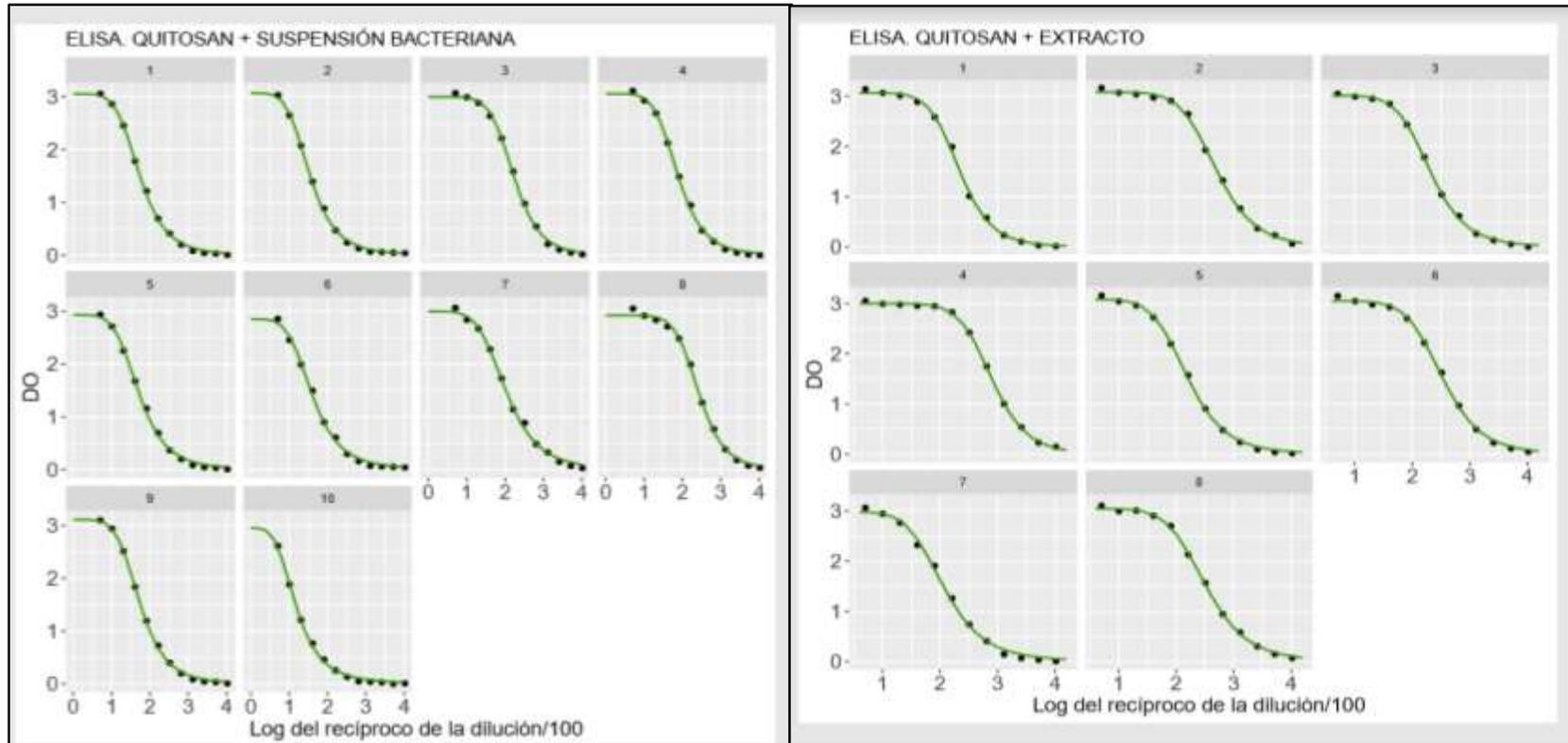
Se observan tres gráficos que muestran el comportamiento del adyuvante de Freund (F: color verde), quitosán (Q: color azul) y la solución salina fisiológica (SSF: color rojo) con cada preparación antigénica, **A.** suspensión bacteriana, **B.** extracto proteico y **C.** SSF.

Figura 16. Ajuste del modelo log-logístico a los valores graficados de DO correspondientes a la presencia de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* obtenidos en las diferentes diluciones (graficadas como el Log del recíproco de la dilución/100) de los sueros murinos del día 105 postinmunización.



El panel del lado izquierdo corresponde a los ratones inmunizados con el adyuvante de Freund más suspensión bacteriana (grupo 1) y el panel del lado derecho a los tratados con el adyuvante de Freund más extracto proteico (grupo 2). Dichas curvas fueron utilizadas para estimar el valor del título de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*.

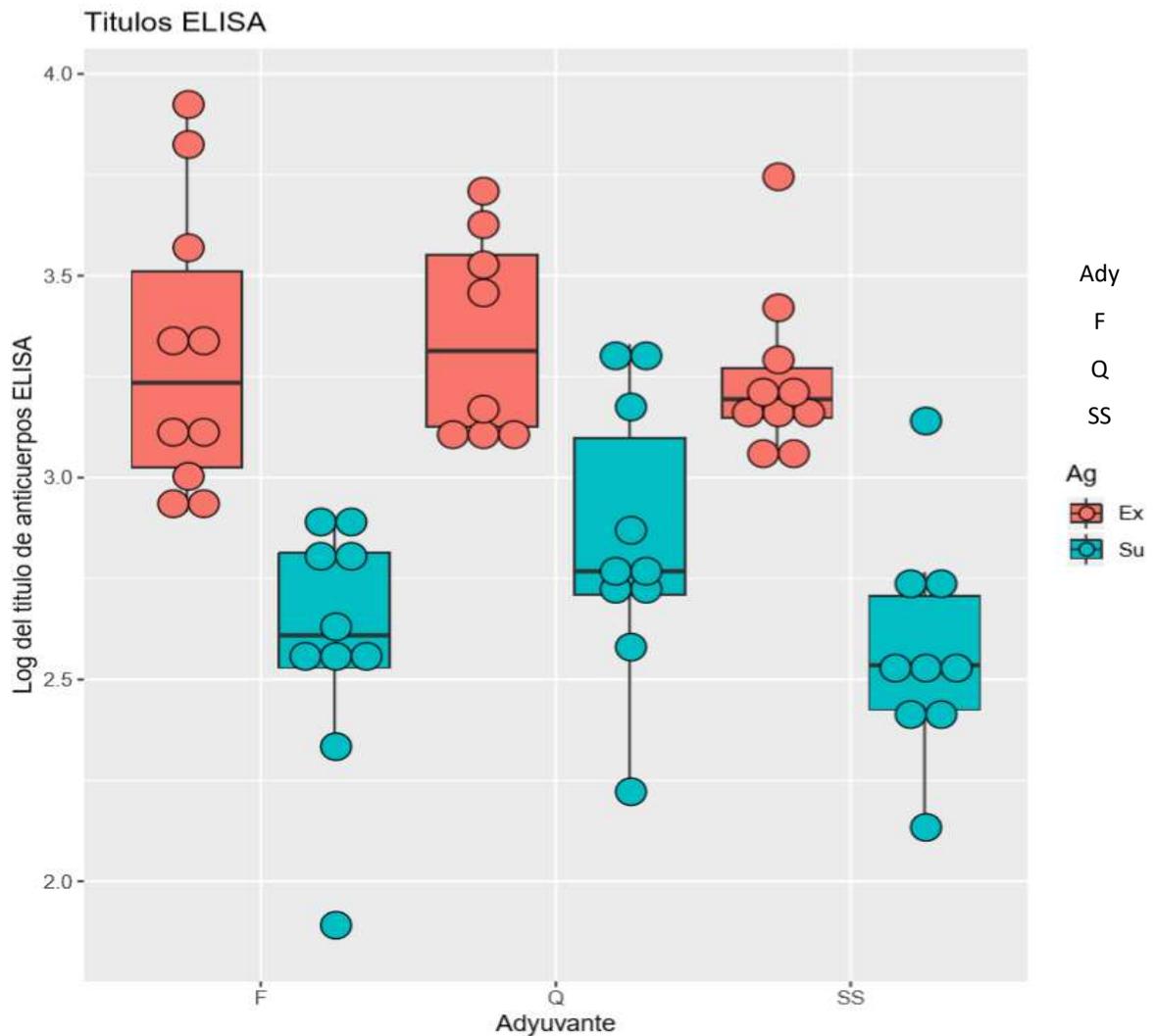
Figura 17. Ajuste del modelo log-logístico a los valores graficados de DO correspondientes a la presencia de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* obtenidos en las distintas diluciones (graficadas como el Log del recíproco de la dilución/100) de los sueros murinos del día 105 postinmunización.



El panel del lado izquierdo corresponde a los animales tratados con quitosán combinado con suspensión bacteriana (grupo 4) y el panel del lado derecho a los inmunizados con quitosán combinado con extracto proteico (grupo 5). Se muestran las curvas utilizadas para determinar el valor de título de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*.

En la **Figura 19** se observan graficados los valores de los logaritmos de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* obtenidos de los sueros murinos del día 105 postinmunización de seis grupos incluidos en el presente estudio, adyuvante de Freund (F) combinado con suspensión bacteriana (grupo 1, símbolos de color azul) o con extracto proteico (grupo 2, símbolos de color rojo); quitosán (Q) combinado con suspensión bacteriana (grupo 4, símbolos de color azul) o con extracto proteico (grupo 5, símbolos de color rojo); y los dos antígenos mencionados sin ningún adyuvante solo con SSF (SS), es decir la suspensión bacteriana (grupos 7, símbolos de color azul) o el extracto proteico (grupo 8, símbolos de color rojo). Cada animal se representa por un pequeño círculo en la gráfica de cajas y bigotes que incluye la media por grupo, se aprecia que no existe un efecto significativo ($p > 0.05$) debido al tipo de adyuvante (quitosán o adyuvante de Freund) o SSF, pero si por el tipo de antígeno utilizado (suspensión bacteriana y extracto proteico) ($p < 0.05$) sobre el valor del título de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en los sueros de los animales.

Figura 18. Representación gráfica de los logaritmos de los valores de los títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* obtenidos de los sueros murinos en el día 105 postinmunización, agrupados de acuerdo al tipo de adyuvante y de antígeno utilizado.

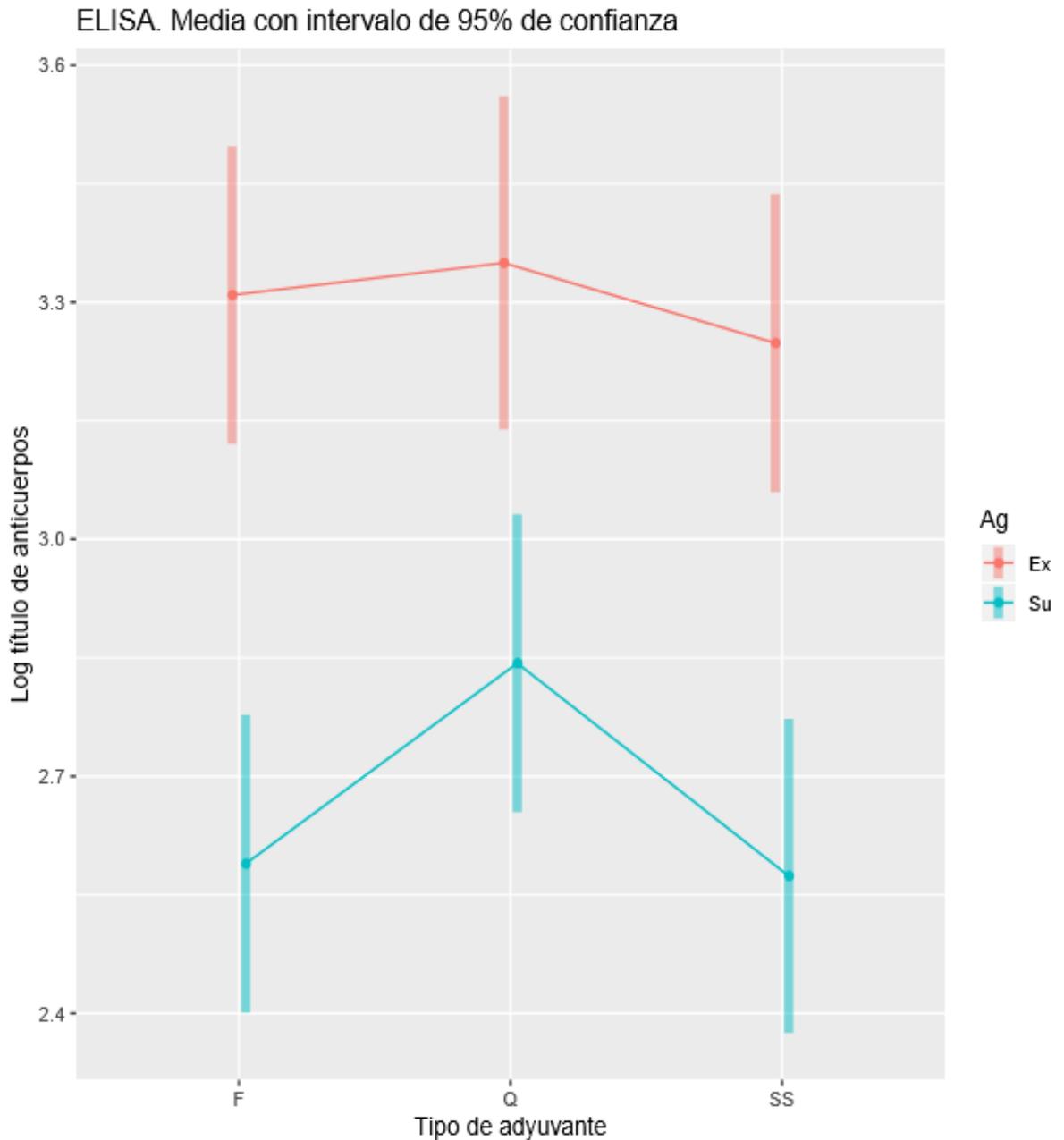


Se muestran los logaritmos de los valores graficados correspondientes a los sueros murinos de seis grupos experimentales: adyuvante de Freund (F) combinado con suspensión bacteriana (Su) o con extracto proteico (Ex) grupos 1 o 2, respectivamente; quitosán (Q) combinado con suspensión bacteriana (Su) o con extracto proteico (Ex) grupos 4 o 5, respectivamente; y sin adyuvantes, únicamente SSF (SS) con suspensión bacteriana (Su) o con extracto proteico (Ex) grupos 7 u 8, respectivamente. Los resultados se muestran agrupados en una gráfica de cajas y bigotes de acuerdo al tipo de adyuvante (Ady) y de antígeno (Ag) empleado: suspensión bacteriana (color azul) o extracto proteico (color rojo).

Posteriormente en la **Figura 20** se graficaron los valores promedio de los logaritmos de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* de los sueros murinos obtenidos el día 105 postinmunización y evaluados por la técnica de ELISA, donde se puede observar que los ratones tratados inicialmente con quitosán más suspensión bacteriana o quitosán más extracto proteico (grupos 4 o 5, respectivamente), así como los animales inoculados con SSF mezclada con los antígenos, suspensión bacteriana (grupo 7) o extracto proteico (grupo 8), presentaron valores semejantes de títulos de anticuerpos que aquellos animales tratados en los días 0 y 28 con adyuvante de Freund (completo e incompleto respectivamente), no existiendo diferencia significativa entre ellos ($p>0.05$), este efecto se observó independientemente del tipo de antígeno utilizado. También se aprecia que el título promedio de los niveles de anticuerpos contra la bacteria es mayor en los ratones inmunizados con extracto proteico que con suspensión bacteriana, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p<0.001$), independientemente del tipo de adyuvante utilizado (adyuvante de Freund o quitosán) en las inoculaciones previas (día 0 y día 28). Mientras que el efecto del tratamiento de los animales que fueron tratados en un inicio con el termogel de quitosán combinado con alguno de los dos antígenos (suspensión bacteriana, grupo 4 o extracto proteico, grupo 5), sobre los valores de los títulos de anticuerpos obtenidos en los sueros de los ratones, fue similar al efecto ocasionado por el tratamiento con la SSF mezclada con suspensión bacteriana o con extracto proteico (grupos 7 u 8, respectivamente), no encontrándose diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$).

Los resultados de la prueba ANOVA que se muestran en la **Tabla 14** apoyan lo mencionado anteriormente, destacando que el valor indica que existe una diferencia significativa ($p<0.05$) entre los antígenos utilizados, pero no entre los dos diferentes adyuvantes ($p>0.05$).

Figura 19. Comparativa de medias de los valores de los logaritmos de los títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* en sueros murinos, entre los dos tipos de antígenos, los dos tipos de adyuvantes y la SSF en los sueros murinos del día 105.



Representación gráfica comparativa de los niveles promedio de títulos de anticuerpos, utilizando como antígeno la suspensión bacteriana (Su) o el extracto proteico (Ex), combinados con quitosán (Q), con el adyuvante de Freund (F), o únicamente con SSF (SS) en ratones cepa CD1.

Tabla 14. Valores de la prueba estadística ANOVA de los niveles de títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* en sueros murinos determinados por la prueba ELISA en el día 105 postinoculación.

ANOVA TITULO ELISA					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Estadística F	Valor p
Adyuvante	2	0.2090	0.1045	1.1848	0.3141
Antígeno	1	5.7715	5.7715	65.4341	< 0.001
Adyuvante: Antígeno	2	0.1164	0.0582	0.6601	0.5212
Residual	51	4.4984	0.0882		

En la tabla se aprecian los resultados obtenidos para el valor p, que indican que se encontró un efecto significativo en la forma de presentación de los antígenos, pero no en el tipo de adyuvante utilizado.

7. DISCUSIÓN

En la elaboración de vacunas existe la tendencia a preparar formulaciones en base a subunidades de microorganismos por ser consideradas más seguras y de menor virulencia, sin embargo, presentan el inconveniente de desarrollar una insuficiente respuesta inmune específica, surgiendo la necesidad de adicionar a las vacunas sustancias de baja o nula toxicidad denominadas adyuvantes, que actúan como potenciadores eficaces de la respuesta inmunológica a los antígenos administrados en los organismos (Seferian y Martinez, 2000; Velásquez, 2008; Berghoff, 2011; Reed *et al.*, 2013; Batista-Duharte *et al.*, 2014).

En el presente estudio se propuso un termogel elaborado a base del biopolímero quitosán como adyuvante, con la finalidad de desarrollar inmunidad humoral hacia *Bordetella bronchiseptica* en comparación con el adyuvante de Freund en un modelo murino; la bacteria *B. bronchiseptica* en esta investigación fue identificada a través de varias pruebas morfológicas y bioquímicas realizadas a las colonias obtenidas, coincidiendo con las características descritas en la literatura (Cowan y Steel's, 1993; Barcenas, 1993; Molina González *et al.*, 2014).

La bacteria *Bordetella bronchiseptica* es un patógeno que esta presente en algunos mamíferos particularmente en cerdos y en perros capaz de ocasionar diversos problemas de salud. En un estudio realizado en granjas porcinas de la parte oeste de Estados Unidos se detectó que animales que estaban aparentemente libres de patógenos, presentaron infección por *B. bronchiseptica*, en el 54 % de los cerdos (Lárez *et al.*, 2019; Meyer y Beamer, 1973).

Algunos investigadores como Lebre y sus colaboradores elaboraron una vacuna en donde asociaron a quitosán con aluminio, como un nuevo adyuvante para mejorar la vacunación, concluyeron que al combinar dos inmunoestimulantes se logró aumentar tanto la respuesta inmune humoral como la celular, proponiendo una mezcla segura y confiable como sistema de liberación de antígenos (Lebre *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en este estudio nos muestran que la utilización del

termogel de quitosán como adyuvante logró elevar de forma significativa la respuesta inmune humoral en los sueros murinos.

Una vez identificada *B. bronchiseptica* se prepararon dos presentaciones de la bacteria para utilizarlas como inmunógenos, una como suspensión bacteriana y otra como extracto proteico; el extracto proteico se obtuvo por el sometimiento de la suspensión bacteriana sin añadir formaldehído al 3%, a varios procedimientos de congelación-descongelación, así como de sonicación, lo que provocó el rompimiento de la membrana celular bacteriana y la liberación de las proteínas, las cuales fueron extraídas de la solución utilizando acetona obteniendo así el concentrado proteico de la bacteria.

La concentración de proteína en el extracto proteico puede dificultar el corrimiento por electroforesis del gel de acrilamida al 12%, por lo que se disminuyó la concentración de poliacrilamida en el gel de separación a una concentración del 10%, dicho procedimiento facilitó el corrimiento de la muestra, permitiendo la correcta ubicación de los pesos moleculares de las proteínas de *Bordetella bronchiseptica*.

Terminado el procedimiento de separación de las proteínas presentes en 10 ug y 5 ug de la muestra de extracto proteico de *Bordetella bronchiseptica*, se analizó el patrón electroforético de las proteínas presentes en el gel, en donde se encontraron 15 bandas proteicas, en un rango de 99 a 5.64 kDa de peso molecular, además se observó una mayor nitidez de las bandas de las proteínas en la muestra que contenía 10 ug del extracto que en la que contenía 5 ug. Cuando se comparó el perfil electroforético del extracto proteico de la bacteria con los patrones obtenidos en otras investigaciones como la de Cotera en 1990, Barcenas en 1993 y Sisti en 2002, quienes trabajaron con cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen porcino se obtuvieron resultados muy similares que coincidieron con el patrón electroforético característico del extracto proteico de *B. bronchiseptica* cepa LBF. En este estudio se encontró un patrón con diferencias mínimas, como las proteínas 105, 46, 45, 34 y 23 kDa, con respecto a los estudios mencionados anteriormente en donde las

cepas analizadas no mostraron una marcada diferencia entre ellas a nivel de componentes estructurales, se dedujo que cualquiera de ellas sería capaz de inducir inmunidad cruzada con las otras cepas (Cotera y col., 1990), por otra parte la ausencia de las bandas señaladas puede deberse a alguna alteración de las proteínas durante la realización de la técnica de extracción o de preparación del extracto proteico; se destaca la presencia de una banda de 65.5 en el patrón electroforético del extracto de *Bordetella bronchiseptica* que es muy cercana a la correspondiente a la denominada Pertactina, antígeno proteico de membrana exterior identificado por Montaraz y col., en 1985 y que se ha encontrado en cepas virulentas de la bacteria, además Novotny y col., en 1985 reportaron que cepas virulentas presentaban la proteína de 68 kDa, pero las cepas de bacterias no patógenas no la presentan, lo que sugiere que posiblemente sea un factor de virulencia (Montaraz *et al.*, 1985; Novotny *et al.*, 1985; Cotera *et al.*, 1990; Barcenas, 1993; Chong Melchor, 1994; Sisti *et al.*, 2002; Francisco Coronado, 2009).

7.1. Características del termogel de quitosán

Para la preparación del termogel se probaron experimentalmente diversas concentraciones, inicialmente se utilizó quitosán al 1% con la cual se obtuvo una solución líquida, se elaboraron otras soluciones con concentraciones del 1.5%, 2% y 2.5%, con esta última concentración el gel era demasiado compacto, concluyéndose que la consistencia adecuada se obtuvo a una concentración de 2% de quitosán. En la elaboración del termogel se utilizó quitosán con un peso molecular de 90297 Da, empleado como matriz polimérica y una concentración de 2% de quitosán que permite la formación y permanencia del gel, después se añadió glicerolfosfato sódico como agente neutralizante de quitosán, los datos mencionados coinciden con la concentración de quitosán utilizada por Jiménez en 2015, quien sentó un precedente para la elaboración del termogel e hizo algunas observaciones en el análisis general de su proyecto que fueron consideradas en este trabajo. Condiciones similares fueron establecidas en un estudio realizado por

Abadía en 2010, donde se utilizó como sustancia neutralizante el glicerolfosfato de sodio, así mismo concluyó que la concentración de 2% de quitosán fue la más adecuada para la formación del termogel; sin embargo, Mohamed y col., en 2018 utilizaron una concentración de quitosán del 1%, para llevar a cabo la preparación y evaluación inmunológica de una vacuna del virus de influenza aviar encapsulado en nanopartículas de quitosán, obteniendo resultados favorables (Abadía y Navarro, 2010; Jiménez, 2015; Mohamed *et al.*, 2018).

El biopolímero obtenido de exoesqueletos de camarón y utilizado en este estudio alcanzó un grado de desacetilación del 83 %, mientras que Hernández y col., en 2009, llevaron a cabo la obtención de quitosán logrando un grado de desacetilación del 64%, utilizando la misma materia prima (Hernández *et al.*, 2009).

Para llevar a cabo la determinación de los niveles de anticuerpos en el suero de los ratones se utilizaron las pruebas de aglutinación en microplaca y ELISA, las cuales fueron previamente estandarizadas. La estandarización de la técnica de aglutinación en microplaca empleó un suero positivo (Suero de conejo inmunizado con *Bordetella bronchiseptica*) y un control negativo (Solución salina fisiológica SSF) a la presencia de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*, antes de trabajar con las diferentes concentraciones de la suspensión bacteriana fue necesaria la inactivación del complemento, que consiste en el sometimiento de las muestras séricas a un tratamiento térmico de 56°C durante 30 minutos, para evitar el enturbiamiento del suero que provoca interferencia en la observación de la malla formada por la aglutinación en las muestras con resultados positivos.

Para la prueba de aglutinación en microplaca se determinó que la condición óptima de trabajo fue la obtenida con la dilución 1:4 del stock, donde se observó una mejor diferenciación entre una reacción de aglutinación positiva y negativa, comparada con el antígeno (suspensión de *Bordetella bronchiseptica*) concentrado y la dilución 1:2 (Jenkins, 1978).

Existen factores que influyen en los resultados de la prueba de aglutinación; como lo observado en el estudio realizado por Jenkins en 1978, quien de acuerdo a la variación fenotípica de las colonias de la bacteria *Bordetella bronchiseptica* observó cuatro fases que pueden presentar títulos aglutinantes diferentes, siendo más altos cuando se utiliza como antígeno a la bacteria en Fase I que cuando esta se encuentra en la Fase III.

La cepa LBF de *Bordetella bronchiseptica* es mantenida en un contenedor de Nitrógeno líquido a -196°C , para evitar los cambios morfológicos que presentan las colonias de este microorganismo cuando se mantienen en medios de cultivo por pases seriados. Chong Melchor, en 1994, llevó a cabo estudios de la bacteria en el laboratorio de Inmunología de la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán, detectando que la cepa LBF de *Bordetella bronchiseptica* permanecía en Fase 1 (Jenkins, 1978; Chong Melchor, 1994).

En relación a la temperatura de incubación de las muestras se trabajaron a 37°C por 48 horas, aunque no se analizó el efecto de la variación de la temperatura en el presente estudio, se documentó la realización de un estudio de la reacción de los anticuerpos aglutinantes en sueros de cerdos naturalmente infectados con *Bordetella bronchiseptica* en un rango extenso de temperatura, encontrando la actividad máxima a 55°C , Jenkins en 1978, también reportó que los títulos de anticuerpos aglutinantes de algunos sueros permanecieron estables cuando la prueba se llevó a cabo primero a 37°C y posteriormente a 55°C (Jenkins, 1978; Barcenás, 1993).

Las condiciones óptimas de trabajo que se determinaron experimentalmente para la estandarización de la prueba ELISA fueron una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ del extracto proteico de *B. bronchiseptica* y una dilución de 1:500 del conjugado peroxidado anti-IgG de ratón.

7.2. Técnicas de aglutinación y de ELISA para determinar los niveles de títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en sueros murinos cepa CD1.

Anteriormente a la inmunización de los animales se realizó la preparación de las mezclas que se inocularon a los ratones, se apreció que la combinación de quitosán con suspensión bacteriana o con extracto proteico no presentó ningún problema al unir ambas sustancias integrándose con suma facilidad, sin embargo la elaboración de la mezcla del adyuvante de Freund más suspensión bacteriana o más extracto proteico presentó bastante dificultad al tratar de mezclarlos, de forma que se requirió mucho tiempo y esfuerzo para integrar las dos sustancias y formar la emulsión, incluso la inoculación de los animales resultó ser complicada debido a la consistencia tan densa de dicha emulsión.

Los ratones fueron inmunizados con las preparaciones realizadas por la vía intraperitoneal que de acuerdo a lo descrito por Chong en 1994, al inmunizar ratones por esa misma vía de forma pasiva artificial (con anticuerpos preferentemente IgG) con anticuerpos monoclonales contra antígenos de membrana, logró disminuir la multiplicación de *Bordetella bronchiseptica* en el pulmón del ratón, lo que implica que los anticuerpos llegan al epitelio de las mucosas y colaboran en la eliminación de las bacterias neutralizando productos bacterianos como las toxinas y enzimas (Chong Melchor, 1994).

Los animales fueron inmunizados los días 0, 28 y 97, y las muestras sanguíneas murinas se tomaron el día 0 (basal), día 38 y día 105, del experimento, bajo la consideración de que la bacteria debe estar ausente en ratas y ratones de laboratorio. En el primer día del experimento se inocularon los animales con el adyuvante completo de Freund o con quitosán acompañados de alguno de los dos antígenos (suspensión bacteriana o extracto proteico) y también a los ratones elegidos como controles, durante los siguientes días del experimento hasta el día 28 se presentó en los ratones la respuesta inmunitaria primaria donde se generaron en primer término anticuerpos IgM, especialmente en la semana uno a la tres culminando alrededor de las cuatro semanas postinmunización seguida de la

producción de IgG en las semanas dos a cuatro. El día 28 del experimento se llevó a cabo la segunda inmunización de los animales con el propósito de generar la respuesta inmunitaria secundaria o anamnésica, en donde se dio una breve producción de anticuerpos IgM anti *Bordetella bronchiseptica* en las semanas cinco a la siete, continuada por la producción aumentada de IgG en las semanas cinco a ocho así como la correspondiente expansión clonal de las células B de memoria que fueron sensibilizadas a *Bordetella bronchiseptica*, en el día 38 del experimento se realizó una segunda extracción sanguínea para conocer el título de anticuerpos en esta etapa del experimento, la tercera inmunización a los ratones se efectuó el día 97, pero en esta ocasión no se administró ningún adyuvante, de manera que se inocularon solo los inmunógenos y los controles necesarios, transcurridos ocho días después de la inmunización en el día experimental 105, se realizó la tercera toma de muestra sanguínea por punción cardíaca para obtener un mayor volumen de sangre que fluctuó entre 1 y 1.5 ml, en donde se determinaron los títulos de anticuerpos en los sueros murinos con el objetivo de conocer los niveles de los títulos alcanzados tres meses después de iniciado el estudio.(Bellanti, 2016).

Una vez colectados los sueros murinos se analizaron mediante la prueba de aglutinación en microplaca, se inició con la inactivación del complemento en los sueros de los animales, obteniéndose los mayores títulos de anticuerpos aglutinantes contra *B. bronchiseptica* en los sueros de los animales tratados con quitosán y alguno de los dos antígenos (suspensión bacteriana o extracto proteico), en comparación con los tratados con los inmunógenos mezclados con el adyuvante de Freund o con la SSF; resultados similares fueron obtenidos en un estudio realizado por Jiménez en 2015, quien utilizando ratas Wistar llevó a cabo la comparación de una bacterina acompañada con el termogel de quitosán o con el adyuvante de aluminio (Laborde *et al.*, 2004; Agudelo Florez & Restrepo Isaza, 2007; Jiménez, 2015).

Laborde y col., trabajaron en la producción de antígenos y anticuerpos para la investigación de *Bordetella bronchiseptica* en animales de laboratorio mediante la

técnica de microaglutinación directa en placa, Antes de empezar la inmunización los antígenos se controlaron con un suero control positivo anti B.b. (NH1, Japón), los antígenos producidos se inocularon en conejos (cepa californiana) para la producción de anticuerpos, se obtuvieron títulos de 1/5120 de *B. bronchiseptica* por medio de la técnica de microaglutinación. El cultivo se inactivó con 0.25 % (v/v) de formaldehído por 72 horas, con lo que se logró la inactivación de la suspensión del antígeno (Laborde *et al.*, 2004), mientras que en el presente estudio se agregó formaldehído al 3% para la inactivación de la suspensión bacteriana.

Posteriormente se determinaron los valores de títulos de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* mediante la técnica de ELISA en las muestras séricas murinas de los animales preinmunizados (día 0), y en las muestras correspondientes a los sueros de ratones colectados el día 105 postinmunización, para ello se determinó con antelación el valor de corte que fue de 0.252, este valor se aproxima al utilizado por Tao y col., quienes trabajaron con quitosán modificado en combinación con una vacuna de un polipéptido recombinante del virus de la hepatitis E en ratones, los investigadores propusieron como un adyuvante inmunoestimulante al cloruro de N-(2-hidroxy) propyl-3-trimetilamonio quitosán (HTCC), y determinaron el valor del punto de corte que fue de 0.22 (Tao *et al.*, 2017).

Cuando se realizó el análisis de los sueros obtenidos en este trabajo por medio de la técnica de ELISA, se detectaron valores bajos de títulos de anticuerpos en los sueros murinos basales de los nueve grupos analizados, evidencia de que los ratones no tuvieron contacto previo con la bacteria, resultados similares se obtuvieron por Muhammad y col., en 2019, al utilizar la misma técnica para determinar los niveles de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* presentes en la sangre de perros seronegativos, reportándose valores bajos de títulos de anticuerpos. En cambio en el suero de los ratones obtenidos el día 105 postinmunización, se determinaron valores similares de títulos de anticuerpos con los dos adyuvantes (Quitosán y Freund), aunque dichos valores fueron mayores con el uso de extracto proteico que con suspensión bacteriana independientemente del

adyuvante utilizado; sin embargo, se observaron valores heterogéneos en los títulos de anticuerpos de los sueros de los animales de los grupos inoculados con el adyuvante de Freund más el antígeno (suspensión bacteriana o extracto proteico), se especula que esta variabilidad puede deberse precisamente a las dificultades que se presentaron durante la inoculación y liberación de los inmunógenos integrados con el adyuvante de Freund. Algunos resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo se encontraron en un estudio desarrollado por los investigadores Ghalavand y col., que consistió en la síntesis de toxoide tetánico recubierto con nanopartículas de quitosán donde compararon la inmunidad inducida por esta mezcla con la provocada por el hidróxido de aluminio en un modelo murino, la determinación de los valores de los títulos de anticuerpos se efectuó por la prueba ELISA, los resultados indicaron que existieron diferencias significativas entre el control y los grupos que contenían adyuvante (aluminio o quitosán) mezclado con el antígeno; pero no se observaron diferencias significativas entre los valores de los títulos de anticuerpos al comparar el grupo inmunizado con adyuvante de hidróxido de aluminio más el antígeno y el grupo que fue tratado con quitosán como adyuvante más toxoide tetánico, concluyendo los autores que el antígeno combinado con nanopartículas de quitosán puede ayudar a elevar la respuesta humoral, por lo que se sugirió como una buena alternativa para liberar el toxoide tetánico, mostrando a quitosán como un excelente adyuvante para la elaboración de nuevas vacunas destinadas a la inmunización de los individuos (Ghalavand *et al.*, 2018; Muhammad *et al.*, 2019).

En otro estudio realizado por Cortés Hinojosa en 2009, donde se investigó la actividad inmunoestimulante de quitosán como adyuvante, por medio de un modelo de vacunación subcutánea en ratas, utilizando una vacuna recombinante contra la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), comparándolo con un adyuvante de actividad conocida como es el adyuvante completo de Freund, se obtuvieron valores más elevados de títulos de anticuerpos en los sueros de ratones tratados con quitosán, que los tratados con el adyuvante de Freund, concluyendo que quitosán

mejoró la respuesta inmune en un modelo de vacuna peptídica. Resultados similares se obtuvieron en esta investigación en la prueba de aglutinación en microplaca, donde los títulos de anticuerpos de los sueros de ratones del día 105 tratados con quitosán fueron más elevados que los sueros de los animales tratados con adyuvante de Freund, mientras que en la prueba ELISA los títulos de anticuerpos de los sueros murinos del día 105 fueron similares entre el grupo de ratones tratados con quitosán y los tratados con adyuvante de Freund.

Así mismo, Schierließ y col., determinaron el efecto adyuvante de tres diferentes tipos de quitosán comparados con el hidróxido de aluminio, encontrando que todos los tipos del biopolímero combinados con el antígeno al ser analizados mostraron una elevada actividad adyuvante, presentando valores de títulos de anticuerpos más altos que los estimulados por el hidróxido de aluminio, que es el adyuvante oficialmente autorizado para uso en vacunas. A diferencia de los resultados obtenidos en la prueba ELISA en el presente trabajo, donde la inmunización de los ratones con el antígeno (suspensión bacteriana o extracto proteico) mezclado con quitosán desarrolló niveles de títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* equivalentes a los inducidos por el adyuvante de Freund en el día 105 postinmunización (Cortés Hinojosa, 2009; Scherließ *et al.*, 2013; Jiménez, 2015).

Por otra parte Mohamed y col., en 2018, evaluaron el efecto adyuvante de quitosán y sus nanopartículas en la respuesta inmune humoral y mediada por células inducidas por la vacuna inactivada del virus de la influenza aviar H5N1 en pollos de engorda, con la finalidad de maximizar la eficacia de la vacuna contra la gripe aviar, se encontró que los valores de los títulos de anticuerpos más altos se registraron en el grupo de pollos vacunados con quitosán y el virus de la gripe aviar, seguido por el grupo vacunado con nanopartículas de quitosán y el mismo virus, los cuales presentaron un aumento significativo en el porcentaje de actividad fagocítica tres días después de la primera vacunación, luego los valores de los títulos de anticuerpos aumentaron significativamente de forma que a los 14 días se incrementó el porcentaje de actividad fagocítica en el grupo tratado con

micropartículas de quitosán, mientras que en el grupo tratado con aceite y el mismo virus se encontró un porcentaje menor (Mohamed *et al.*, 2018). En los resultados obtenidos se aprecia el efecto adyuvante de quitosán unido al virus de la gripe aviar, estimulando la elevación de los valores de los títulos de anticuerpos.

Novotny y col., en 1985, utilizaron también la prueba ELISA para realizar una evaluación de vacunas contra *Bordetella bronchiseptica* en lechones libres de patógenos con antígenos bacteriales de superficie, donde se llevó a cabo un análisis serológico de la inmunidad inducida por siete bacterinas que contenían *Bordetella bronchiseptica*, éstas fueron aplicadas en cerdas gestantes en la semana 7 y 2 antes del parto, los lechones fueron infectados por vía intranasal con *B. bronchiseptica* en los primeros cinco días de vida y luego sangrados hasta la semana nueve de vida. Se observó que solo dos de las siete bacterinas probadas fueron capaces de prevenir la atrofia nasal en los animales. Posteriormente el suero de los lechones inmunes fue comparado con el de lechones que habían desarrollado atrofia nasal, para ello se utilizó la prueba ELISA con tres diferentes antígenos de *Bordetella bronchiseptica*: un extracto de antígenos de superficie lipopolisacárido y un antígeno proteico purificado y con actividad de adenil ciclasa, encontrando que los animales no protegidos mostraron un elevado título de anticuerpos contra el lipopolisacárido, los lechones inmunes se inclinaron a reaccionar con el antígeno purificado, los resultados evidenciaron que los títulos de anticuerpos medidos con esta mezcla compleja de antígenos no se correlacionó con la prevención de las manifestaciones más importantes de la enfermedad (Novotny *et al.*, 1985).

Un estudio realizado por Stephenson y col., evaluó la inducción de una cepa comercial de una bacterina de *B. bronchiseptica* sin adyuvante, para estimular la respuesta inmune protectora en una cepa 13/N de cuyos, contra un desafío de la bacteria aerotransportada, la cual fue aprobada para uso en caninos. Los animales seronegativos fueron vacunados en el día 0 y 21 con una inyección intramuscular de 0.2 ml de la bacterina. Los títulos de los anticuerpos humorales de los animales vacunados, fueron determinados por la prueba ELISA, en el rango de 128-1024 en

el día 49. En el día 30 siguiendo la segunda dosis de la bacterina (día de estudio 51), 12 vacunados y 12 animales tratados con PBS encubiertos se expusieron a una dosis inhalada de 4.3×10^5 UFC de *B. bronchiseptica* (325 LD₅₀), los animales desafiados fueron clínicamente normales, sin embargo, cada uno desarrolló una infección respiratoria localizada en la parte superior. La protección inducida por la bacterina canina comercial fue suficiente para prevenir el desarrollo de una enfermedad pulmonar en la cepa 13/N de cuyos (Stephenson *et al.*, 1989). En la presente investigación se obtuvieron valores de títulos de anticuerpos en la prueba ELISA del día 105 postinoculación, que estuvieron de cinco a seis veces más elevados que los obtenidos por Stephenson y col. en 1989, posiblemente por el uso de adyuvantes en este estudio.

Se llevó a cabo otro estudio realizado por Boot y col., en 1993, donde cobayos fueron inmunizados con 0.2 ml de la cepa 1 de *Bordetella bronchiseptica* 1:1 en adyuvante completo de Freund, después de cuatro semanas los animales fueron sangrados por punción cardíaca bajo anestesia, todos los sueros fueron almacenados a -20°C. La prueba se realizó en sueros de conejo ELCO en placas de microtitulación transparentes usando 50 ul de suero inactivado por calor (30 min a 56°C, en baño de agua), se realizaron diluciones dobles seriadas en 50 ul de PBS 7.2 (dilución final de 1:2048), a cada pozo se le agregó 50 ul del antígeno diluido de la cepa de *Bordetella bronchiseptica* (Boot *et al.*, 1993).

Los antígenos fueron ajustados a 7.5 ug/ml de proteína y los sueros fueron diluidos 1:50. Volúmenes de 100 ul a una dilución de 1:15000 de suero IgG de anticobayo producido en cabra o peroxidasa de IgG anti-conejo producido en cabra, las concentraciones de antígeno y conjugado a ser utilizadas fueron preprobados por titulaciones de tablero de ajedrez con diferentes diluciones del antígeno y del conjugado. La ELISA se consideró positiva si la densidad óptica (DO) de la dilución del suero excedía el promedio ± 3 SD de las densidades ópticas observadas en los sueros control negativos.

En los resultados obtenidos se reportó que ninguna cepa reaccionó de forma cruzada con el antígeno de la cepa I en la prueba de microaglutinación, por lo que presumiblemente no están relacionados serológicamente con las otras cepas en este estudio. La falta de reactividad cruzada de las cepas 7 y 10 es importante, ya que sugiere que las infecciones por *B. bronchiseptica* con estas cepas no serían detectadas por ELISA utilizando la cepa I como antígeno. Por lo tanto, los antígenos preparados a partir de ambas cepas también deben utilizarse en ELISA en la prueba de animales para la infección por *B. bronchiseptica*.

La falta de reactividad cruzada de las cepas 7 y 10 es importante, ya que sugiere que las infecciones por *B. bronchiseptica* con estas cepas no serían detectadas por ELISA utilizando la cepa I como antígeno (preparado a partir de la cepa I), fue empleada con éxito en su totalidad para el seguimiento de cobayos y colonias de conejos utilizando el método de Microaglutinación, se detectaron anticuerpos contra *B. bronchiseptica* en alrededor de 28% de conejos saludables de colonias infectadas, dicho porcentaje fue significativamente menor que cuando se utilizaron cultivos selectivos o ELISA (Boot *et al.*, 1993). En el presente trabajo se observó una diferencia entre los resultados de la prueba de aglutinación en microplaca y la prueba ELISA, posiblemente atribuida al tipo de antígeno utilizado, para la realización de la prueba de aglutinación en microplaca se utilizó como antígeno una suspensión de *B. bronchiseptica* mientras que para la prueba ELISA se usó como antígeno el extracto proteico de *B. bronchiseptica*. El trabajo realizado por Boot en 1993, muestra la posibilidad de que algunas cepas pueden no ser detectadas por las pruebas, debido a la falta de reactividad cruzada entre dichas cepas de *B. bronchiseptica*.

7.3. Efecto del termogel de quitosán como adyuvante

En este estudio el termogel de quitosán combinado con los antígenos (suspensión bacteriana o extracto proteico) resultó ser eficiente en el desarrollo de una inmunidad humoral en los ratones tratados con el biopolímero, generando

anticuerpos contra *B. bronchiseptica* y actuando de forma similar que el adyuvante de Freund, puesto que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos en el día 105 postinmunización; sin embargo se ha reportado que el uso de quitosán como adyuvante presenta una serie de ventajas en comparación con el adyuvante de Freund, ya que quitosán es biodegradable, biocompatible, de baja toxicidad, de fácil adquisición y de bajo costo (Miranda y Lizárraga, 2012; Santos-López, 2013). Así mismo, es importante mencionar que en el desarrollo del presente proyecto se logró apreciar que la aplicación de los inmunogénos formulados con quitosán, formaron una mezcla fácil de manipular y de administrar a los animales a diferencia de la combinación formada con el adyuvante de Freund y los inmunógenos, que al prepararlos se obtuvo una emulsión de difícil manejo y bastante complicada de administrar a los ratones.

La capacidad inmunoestimuladora de quitosán podría ser atribuida a la elevada viscosidad que presenta en solución, ocasionando una reacción de inflamación que atrae células inmunitarias y que además provoca que el antígeno permanezca un mayor tiempo en el sitio de administración, así mismo, las estructuras de N-acetilglucosamina podrían activar a los TLR-2 presentes en las células dendríticas. En otro estudio se realizó la determinación del tipo de respuesta inmune que se desarrolla al utilizar quitosán, documentándose que es una respuesta de tipo Th2, al verse elevada la IgG1, en cambio el adyuvante completo de Freund ACF presentó una elevación en los títulos de IgG2a con una tendencia a una respuesta Th1. Aunque en el presente estudio se detectaron las IgG totales, sin analizar las subclases de IgG, quedó claro que el uso de quitosán combinado con el antígeno desarrolló la producción de anticuerpos de forma tan eficiente como el adyuvante de Freund, considerado el adyuvante por excelencia en este tipo de investigaciones, aún con sus grandes desventajas como son la alta reactogenicidad, la elevada toxicidad, así como una baja biodegradabilidad y biocompatibilidad (Cortés Hinojosa, 2009).

Por otra parte, Seferian y Martínez, describieron la actividad inmunoestimulante de dos formulaciones adyuvantes, una de partículas de zinc-quitosán y otra formulación a base de una emulsión con quitosán, ambas fueron probadas en ratones, el resultado reveló que se obtuvo una respuesta positiva en la elevación de anticuerpos con las dos mezclas utilizadas. En este estudio también se realizó un análisis de isotipos de anticuerpos, en donde se encontró que el isotipo IgG1 se incrementó en los animales inmunizados con partículas de zinc mezcladas con quitosán, en cambio se obtuvo una respuesta mixta con la emulsión a base de quitosán al elevarse IgG1, IgG2a e IgG2b. Por lo tanto, se sugiere realizar un análisis de isotipos de anticuerpos en una investigación posterior, sin embargo, conociendo que el quitosán obtenido en este trabajo fue de bajo peso molecular se podría especular que la subclase predominante en los sueros de los animales analizados fue IgG2a, se ha documentado que el quitosán de bajo peso molecular (LMW) induce un aumento en las IgG2a, posiblemente por el grado de desacetilación de quitosán de LMW, en consecuencia, tendría más unidades N-acetil-D-glucosamina y se sabe que las células fagocíticas internalizan algunos antígenos por medio de sus receptores de manosa, que reconocen carbohidratos en las paredes celulares de bacterias, incluyendo N-acetil-Dglucosamina además producen citoquinas TH1 tales como IL-12, IL18 y TNF alfa (Seferian y Martinez, 2000; Zhang *et al.*, 2005; Moran *et al.*, 2018).

Finalmente, se ha documentado que quitosán mejora tanto la respuesta inmune celular como la humoral y posee la capacidad de activación de macrófagos e iniciación de citocinas, también activa a las células dendríticas al unirse al receptor Toll-Like 4 (TLR4) y los receptores de manosa. En lo que respecta a la carga positiva que posee el biopolímero, ésta le proporciona una afinidad mayor por las (APC) uniéndose por interacción iónica a sus membranas celulares cargadas negativamente, además, estas cargas positivas permiten la unión electrostática con antígenos que tienen carga negativa y ADN para la administración de vacunas. Es importante mencionar que quitosán presenta una capacidad similar para desarrollar

una respuesta inmune adecuada que ACF, por lo tanto, se propone como una alternativa de adyuvante al demostrar la capacidad que posee de desarrollar una respuesta inmune humoral sin provocar un riesgo de toxicidad para los organismos (Morris *et al.*, 1999; Mohamed *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018).

8. CONCLUSIONES

8.1. El termogel de quitosán elaborado para este estudio presentó las características adecuadas para ser administrado a los animales como un adyuvante de liberación lenta, comportándose como un gel inteligente.

8.2. El termogel a base de quitosán tiene el efecto de un adyuvante en el desarrollo de la respuesta inmune humoral contra *B. bronchiseptica*, funcionando como soporte de liberación lenta del antígeno (suspensión bacteriana o extracto proteico) y favoreciendo una reacción de inflamación en el sitio de inoculación.

8.3. El termogel de quitosán combinado con suspensión bacteriana o extracto proteico de *B. bronchiseptica* es capaz de inducir el desarrollo de la respuesta inmune humoral en niveles equivalentes e incluso mayores al adyuvante de Freund, estimulando la producción de anticuerpos detectados mediante la técnica de ELISA y de aglutinación.

8.4. Los niveles de anticuerpos aglutinantes contra *B. bronchiseptica* fueron mayores en el grupo de ratones tratados con quitosán como adyuvante en comparación con el grupo de animales tratados con el adyuvante de Freund independientemente del antígeno suspensión bacteriana o extracto proteico.

8.5. Los valores de los títulos de anticuerpos contra *B. bronchiseptica* determinados por la técnica de ELISA resultaron ser equivalentes en los grupos de ratones que se inmunizaron con los antígenos mezclados con quitosán o con adyuvante de Freund, sin embargo, los niveles de anticuerpos fueron mayores en los grupos inoculados con extracto proteico que con suspensión bacteriana, independiente del adyuvante utilizado.

9. APÉNDICES

9.1. Apéndice 1. Preparación de Geles

Electroforesis de las muestras (proteínas purificadas y extractos bacterianos) en geles de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Se emplea un sistema de geles discontinuos de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1970); brevemente, se utiliza **un gel de separación al 12.0 %, uno de concentración al 4.0 %** y la solución amortiguadora de corrida o para electrodos (tanque), pH 8.3 (Tris 0.025M, Glicina 0.192, SDS al 0.1%).

Se utiliza la solución de trabajo al 40 % Acrylamide/Bis Solution, 29:1 (BIO-RAD, Cat. Num. 161-0146). Las cantidades de las soluciones amortiguadoras y de los reactivos, se mezclan y se vierten rápidamente al molde de la cámara de electroforesis para preparar el **gel de separación**:

Gel de separación	1 GEL	2 GELES
Acrilamida/bis acrilamida (solución de monómeros)	2.1 ml	4.2 ml
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8	1.8 ml	3.6 ml
Solución de SDS al 10%	70 ul	140 ul
Agua destilada	3.0 ml	6.0 ml
Persulfato de amonio al 10%	35 ul	70 ul
TEMED	3.5 ul	7.0 ul
Volumen total (un gel)	7.0 ml	14.0 ml

Nota: Se recomienda adicionar cuidadosamente (para no perder la interfase) una capa de agua destilada o isopropanol sobre la mezcla anterior, cuando ya está colocada en el molde de la cámara.

Una vez que el gel polimerice, si se utiliza isopropanol es necesario realizar una serie de lavados hasta eliminar el olor, y después se adiciona la mezcla correspondiente al **gel de concentración:**

Gel de Concentración	1 GEL	2 GELES
Acrilamida/bis acrilamida (solución de monómeros)	500 ul	1.0 ml
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.3 ml	2.6 ml
Solución de SDS al 10%	50 ul	100 ul
Agua destilada	3.12 ml	6.24 ml
Persulfato de amonio al 10%	25 ul	50 ul
TEMED	5.0 ul	10.0 ul
Volumen total (un gel)	5.0 ml	10.0 ml

y posteriormente se coloca el peine, el cual se retira cuando el gel este polimerizado o antes de su uso, para que de esta forma los carriles queden bien definidos.

Sustrato orto-fenilendiamina. [O-Phenylenediamine (OPD) Dihydrochloride, Sigma Immuno Chemicals, Product number P-6662]: Disolver la tableta en 0.05 M de phosphate-citrat buffer, pH5.0 a la concentración deseada (usualmente una concentración de OPD de 0.4 mg/ml es usada). Adicionar 40 μ l de peróxido de hidrógeno fresco al 30% (Sigma Podruct No. H-1009) por 100 ml de solución amortiguadora de sustrato, inmediatamente antes de su uso. En forma más específica se disuelven 2 tabletas en 5 ml de la solución amortiguadora de sustrato y se le agregan de 2 a 5 μ l de peróxido de hidrógeno fresco al 30% (Hydrogen Peroxide 30% w/w solution, Sigma, Cat. Num. H-1009), y de esta preparación se emplean 200 μ l/pozo. La reacción se detiene con la adición de 50 μ l de HCl al 3N o H₂SO₄ al 3M, por cada 200 μ l de la solución anterior. Finalmente, la microplaca se lee en un elisometro para obtener los valores de densidad óptica empleando un Test Filter 450 nm, sin Ref. filter and W/L mode Single (filtro disponible en el Laboratorio).

9.2. Apéndice 2. Preparación de Soluciones

Solución salina fisiológica (SSF).

Cloruro de sodio (NaCl)	0.85 g
Agua destilada	100 ml

Solución bloqueadora BSA-PVP-PVA.

BSA (1%)	0.50 g	2.5 g
PVA (0.5%)	0.25 g	1.25 g
PVP (0.8%)	0.40 g	2.0 g
Azida de sodio (0.05%)	0.025 g	0.125 g
PBS 10 mM (pH 7.4-7.2) (Vol. Final)	50 ml	250 ml

Solución bloqueadora BSA-PVP-PVA. (sin ázida de sodio)

BSA (1%)	0.50 g
PVA (0.5%)	0.25 g
PVP (0.8%)	0.40 g
PBS 10 mM (pH 7.4-7.2)	50 ml

Solución Pre-Bloqueadora

BSA (1 %)	0.5 g	2.5 g
PBS 10 mM (pH 7.4-7.2) (Vol. Final)	50 ml	250 ml

Solución amortiguadora de Fosfato-Citrato (0.05 M), pH=5.0.

Fosfato de sodio dibásico	0.7296 gr en 25.7 ml agua destilada
Ácido cítrico 0.1 M	0.510 gr en 24.3 ml de agua destilada
Ajustar con agua destilada (Vol. Final)	100 ml

Solución Reveladora (OPD)

96 pozos x 200 ul/pozo = 19.2 ml~20 ml	
O-phenylenediamine (OPD) Dihydrochloride	5 tabletas
Solución amortiguadora de Fosfato-Citrato 0.05 M	20 ml
Peróxido de Hidrógeno fresco al 30 %	500 ul
(Vol. final)	20 ml

Solución PBS-Tween 0.05% (Solución de lavado)

Buffer de Fosfatos (PBS), pH 7.2	250 ml	500 ml
Tween 20%	0.125 ml	0.250 ml
Volumen Final:	250 ml	500 ml

Solución Amortiguadora de fosfatos (PBS), pH= 7.2.

Cloruro de sodio (NaCl)	8.00 g
Fosfato dibásico de potasio (K ₂ HPO ₄)	1.21 g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.34 g
Agua destilada	1,000 ml

Solución amortiguadora de carbonatos (0.05 M), pH 9.6 (BBC).

Bicarbonato de sodio ácido (NaHCO ₃)	0.293 g	1.465 g	
Carbonato de sodio anhidro (Na ₂ CO ₃)	0.159 g	0.795 g	
Agua destilada	Vol. final	100 ml	500 ml

Información de Reactivos

Goat Anti-Mouse IgG(H+L) Horseradish Peroxidase Conjugate. BIO-RAD, Cat. Num. 172-1011, Lot. Num. 64067503
O-Phenylenediamine(OPD) Dihydrochloride, Sigma-Aldrich, Product number P-6662-100TAB. Lot. 129K8214 (Tab=1mg).

Solución reguladora del gel de separación Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.

Trizma base	18.15 g
Agua destilada	40 ml
Ajustar el pH con HCl 6 N, aforar a 50 ml, filtrar en papel Whatman No. 1 y guardar a 4 °C.	

Solución amortiguadora del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

Trizma base	3.0 g
Agua destilada	40 ml
Ajustar el pH con HCl 6 N, aforar a 50 ml, filtrar en papel Whatman No. 1 y guardar a 4 °C.	

Solución de lauril sulfato de sodio (SDS) al 10 %.

SDS	10 g
Agua destilada	100 ml
Se guardó a temperatura ambiente	

Solución de persulfato de amonio al 10 %

Persulfato de amonio	0.1 g
Agua destilada	1.0 ml
Se preparó en el momento de su utilización	

Solución amortiguadora de corrida (Tris base 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%), pH 8.3.

Trizma base	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS al 10%	10 ml
Agua destilada hasta	1 l
Ajustar el pH con el trizma base, el regulador del tanque inferior puede ser reusado de 4 a 5 veces, el del tanque superior debe ser descartado cada vez que se utilice	

Solución digestora

Tris 0.5 M, pH 6.8	4.375 ml
SDS	0.1 g (o 1 ml de una Solución al 10%)
Glicerol	0.5 ml
2-mercaptoetanol	0.25 ml
Azul de bromofenol	0.002 g
Dithiothreitol (DTT; FW 154.2)	0.130 g (OPCIONAL).
Almacenar a 4 °C (para periodos cortos) y en alícuotas de 0.3 ml a -20 °C hasta 6 meses.	

Solución concentrada (madre o stock) para tinción de proteínas.

Azul de Coomassie R-250	2 g
Agua destilada	200ml

Solución de trabajo para tinción de proteínas, Coomassie R-250 al 0.125%.

Solución concentrada de Azul de Coomassie	62.5 ml
Metanol absoluto	250 ml
Ácido acético glacial	50 ml
Agua destilada	137.5 ml
Si existen grumos se sugiere filtrar empleando papel Whatman No. 1.	

Solución amortiguadora de transferencia, pH 8.3 (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, metanol 20% V/V).

Trizma base	3.023 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml
Agua destilada	800 ml

Solución desteñidora I para gel.

Metanol absoluto	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua destilada	400 ml

Solución desteñidora II para gel.

Metanol absoluto	25 ml
Ácido acético glacial	35 ml
Agua destilada	440 ml

10. REFERENCIAS

- Abadía Piquero, Javier and Navarro Gómez, F. (2010). *Preparación Y Caracterización Mecánica De Hidrogeles De Quitosano Para Soporte De Células De Cartílago*. 50. <https://zaguan.unizar.es/record/5434/files/TAZ-PFC-2010-378.pdf>
- Abbas AK; Lichman AH; Pober, J. (2000). Propiedades generales de la respuesta inmunitaria. En *Inmunología celular y molecular* (4a ed., pp. 3–16). Mc Graw Hill. <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP11.pdf>
- Agudelo Florez, P., & Restrepo Isaza, M. (2007). Frecuencia de anticuerpos para 14 serovariedades de *Leptospira spp* detectados por la prueba de microaglutinación en una serie de casos humanos de Antioquia, Colombia. *CES Medicina*, 21(2), 7–13.
- Ahmed, Enas, M. (2013). Hydrogel: preparation, characterization, and applications. *Journal of advanced Research*.
- Alhabbab, R. (2018). Basic Serological Testing. En *Springer International Publishing Nature*.
- Anon. (1989). Chitin: A magic Bullet? *The Food Insects Newsletter*, 2(3), 1–7. <http://www.food-insects.com/Vol2 no3.htm>
- Arai, K., Kinumaki, T. y Fujita, T. (1968). "Toxicity of chitosan," *Bulletin of Tokai Regional. Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*, 56, 89–94.
- Arshud, Dar, Masroor, A. Tipu, Townsend, Hugh, Potter, Andy, Gerdt, Volker, and suresh T. (2015). Administration of Poly [di (sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) and Avian Beta Defensin as adjuvants in Inactivated Inclusion Body Hepatitis Virus and its Hexon Protein-Based experimental Vaccine Formulations in Chickens. *AVIAN DISEASES*, 59, 518–524.
- Baldrige J, Myers K, Johnson D, Persing D, Cluff C, H. R. (2006). Monophosphoryl Lipid A and Synthetic Lipid A Mimetics As TLR4-Based Adjuvants and Immunomodulators. In: Hackett C, Harn Jr. D, eds. *En vaccine adjuvants* (pp. 235–255). https://doi.org/10.1007/978-1-59259-970-7_12
- Banzhoff, A., Gasparini, R., Laghi-Pasini, F., Staniscia, T., Durando, P., Montomoli, E., Capecchi, P., di Giovanni, P., Sticchi, L., Gentile, C., Hilbert, A., Brauer, V., Tilman, S., & Podda, A. (2009). MF59® -adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. *PLoS ONE*, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004384>
- Barber G.N. (2015). STING: infection, inflammation and cancer,. *Nature Reviews Immunology*, 15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nri3921>.
- Barcenas, G. (1993). *Comparación de la respuesta immune humoral de cerdos inmunizados con Bordetella bronchiseptica y la desarrollada en casos clínicos de rinitis atrofica porcina*. UNAM.
- Batista-Duharte A., Lindblad E., O.-O. E. (2011). Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol Lett.*, 203, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.001>

- Batista-Duharte, A., Lastre, M., & Pérez, O. (2014). Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.012>
- Beebe, D.J., Moore, J.S., Bauer, J.M., Yu, Q., Liu, R.H., Devadoss, C., Jo, B. H. (2000). Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels. *Nature*, 404(6778), 588–590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/35007047>
- Bellanti, J. A. (2016). I. I. A. C. en S. y enfermedad. (2016). *Inmunología IV. Aplicaciones Clínicas en Salud y enfermedad* (Primera Ed). Editorial I Care Press.
- Bemis DA, Greisen HA, A. M. (1977). Pathogenesis of canine bordetellosis. *J Infect Dis.*, 135(5), 753–762. <https://doi.org/10.1093/infdis/135.5.753>
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Elsevier.*, 57(1), 35–52. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00160-7)
- Berghoff, C. F. (2011). *Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polimero sintético para regeneración de tejido óseo.*
- Bhale S, No HK, Prinyawiwatkul W, Farr AJ, Nadarajah K, M. S. (2003). Chitosan coating improves shelf life of eggs. *J. food s.ci*, 2378–2383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05776.x>.
- Bhandari, SS, Davies, JE, Struck, J, N. L. (2011). Influence of confounding factors on plasma midregional pro-adrenomedullin and mid-regional pro-A-type natriuretic peptide concentrations in healthy individuals. *Biomarkers*, 16(3), 281–287.
- Boot, R., Bakker, R. H. G., Thuis, H., & Veenema, J. L. (1993). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring guineapigs and rabbits for *Bordetella bronchiseptica* antibodies. *Laboratory Animals*, 27(4), 342–349. <https://doi.org/10.1258/002367793780745624>
- Boot R.G., Blommaert E.F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, A. J. (2001). Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem.*, 276(9), 6770–6778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009886200>.
- Bourtoom, T. (2008). Factors Affecting the Properties of Edible Film Prepared from Mung Bean Proteins,. *International Food Research Journal*, 15(2), 167–180.
- Brandl F, Sommer F, G. A. (2007). Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*, 28(2), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.017>
- Breyer, I. (1998). Neutrófilos humanos inducen la liberación de lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. *Medicina*, 58, 61–64.
- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F, M., Argüelles-Monal W., Desbrières J., R. M. (2001).

- An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569–3580. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00713-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00713-8)
- Brunner R, Jensen-Jarolim E, P.-S. I. (2010). . The ABC of clinical and experimental adjuvants--a brief overview. *Immunol. Lett.*, 128, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.10.005>
- Bueter, C. L., Lee, C. K., Wang, J. P., Ostroff, G. R., Specht, C. A., & Levitz, S. M. (2014). Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5943–5951. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301695>
- Bueter, C. L., Specht, C. A., & Levitz, S. M. (2013). Innate Sensing of Chitin and Chitosan. *PLoS Pathogens*, 9(1), 1–3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003080>
- Burns, V.C., Pishko, A. Preston, D.J., Maskell, E.J. and Harvill, E. . (2003). Role of *Bordetella bronchiseptica* O antigen in respiratory tract infection. *Infection Immunity*, 71(1), 86–94. [https://doi.org/0.1128/IAI.71.1.86–94.2003](https://doi.org/0.1128/IAI.71.1.86-94.2003)
- Calderón, R. (2007). Curso de inmunoquímica. UNAM. Instituto de Biotecnología, 25. 34–36.
- Cárdenas Vargas A., Pedroza-Roldán C., E.-Q. D. (2016). Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(3), 29–47.
- Carroll, E. C., Jin, L., Mori, A., Muñoz-Wolf, N., Oleszycka, E., Moran, H. B. T., ... Lavelle, E. C. (2016). The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons Immunity. *Immunity*, 44(3), 597–608. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.004>
- Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., & Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313(5790), 1126–1130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.1127119>
- Center for Diseases Control and Prevention. *Vaccine Adjuvants*. (2016). <http://www.cdc.gov/vaccinesafety/concerns/adjuvants.html>.
- Champely, S. (2018). *pwr. Basic Functions for Power Analysis. Repository CRAN*.
- Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerolphosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39–47. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00281-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00281-2)
- Chong Melchor, J. C. (1994). *Efecto de la inmunización activa o pasiva sobre la replicación de Bordetella bronchiseptica en el pulmón de ratón*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM,.
- Coico, R. y Sunshine, G. (2015). *Immunology: a short course*.
- Cortés Hinojosa, M. A. (2009). *Determinación de la inmunogenicidad provocada por quitosano como adyuvante en un modelo de vacuna peptídica anti-GNRH*.

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131455/Determinación-de-la-inmunogenicidad-provocada-por-quitosano-como-adyuvante-en-un-modelo-de-vacuna-peptídica-anti-GnRH.pdf?sequence=1>

- Costa CN, Teixeira VG, Delpech MC, Souza JV, C. M. (2015). Viscometric study of chitosan solutions in acetic acid/sodium acetate and acetic acid/sodium chloride. *Carbohydrate Polymers*, 133, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.094>.
- Cotera G., Atilano D., Miranda S., M. J. A. (1990). *Estudio comparativo de los patrones electroforéticos de diferentes cepas de Bordetella bronchiseptica* (pp. 153–155).
- Cowan, S. T. y Steel's, K. J. (1993). *Manual for Identification of Medical Bacteria*. Cambridge University Press.
- Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants - A classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15(3), 248–256. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00183-1)
- Dabaghian, M., Latifi, A. M., Tebianian, M., NajmiNejad, H., & Ebrahimi, S. M. (2018). Nasal vaccination with r4M2e.HSP70c antigen encapsulated into N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticulate systems: Preparation and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*, 36(20), 2886–2895. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.072>
- Darmadji, P., Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38(2), 243–254. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90114-7)
- DaSilva, C.A., Chalouni, C., Williams, A., Hartl, D., Lee, C.G., Elías, J. . (2009). Chitin is a Size Dependent Regulator of Macrophage TNF and IL-10 production. *The Journal of Immunology*, 182(6), 3573–3582. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802113>
- De Carvalho N, Teixeira J, Roteli-Martins CM, Naud P, De Borba P, Zahaf T, Sanchez N, S. A. (2010). Sustained efficacy and immunogenicity of the HPV-16/18 AS04- adjuvanted vaccine up to 7.3 years in young adult women. *Vaccine*, 28(38), 6247–6255. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.007>
- De La Paz, N., Pérez, D., Fernández, M., Darío López, O., Nogueira, A., Paneque, M. R., Valentín, S. A., & García, C. M. (2013). Evaluación Viscosimétrica Del Quitosano Derivado De La Quitina De Langosta. En *Revista Iberoamericana de Polímero Volumen Iberoam. Polim. Playa. La Habana. Cuba. Recibido: Noviembre* (Vol. 14, Número 142, pp. 84–91).
- Del Giudice y Corradin. (2005). Novel Adjuvants for Vaccines. *Current Medicinal Chemistry*, 4(2). <https://doi.org/10.2174/1568014053507113>
- Dev A., Mohan JC., Sreeja V., Tamura H., Patzke GR., Hussain F., Weyeneth S., Nair SV., J. R. (2010). Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Carbohydrate polymers*, 79(4), 1073–1079. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.038>
- Díaz Castellanos, M. (2011). *INCIDENCIA DE Rhizoctonia spp., Sclerotium rolfsii Y Macrophomina phaseolina EN FRIJOL COMÚN EN VILLA CLARA. Bases para el manejo integrado* [UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA].

- Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, Kielland A, Vosters O, Vanderheyde N, Schiavetti F, Larocque D, Van Mechelen M, G. N. (2009). AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6186–6197. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901474>
- Duncan, J. R., Ross, R. F., Switzer, W. P., & Ramsey, F. K. (1966). Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: atrophic rhinitis. *Am J Vet Res.*, 27(117), 457–466.
- Echeverri-Toro, L., Arango, A., Ospina, S., & Agudelo, C. (2015). Bacteriemia recurrente por *Bordetella bronchiseptica* en un paciente con trasplante de médula ósea. *Biomedica*, 35(3), 302–305. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i3.2494>
- Edelman, R. (1992). An Update on Vaccine Adjuvant in Clinical Trial. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 8, 1409–1411. <https://doi.org/10.1089/aid.1992.8.1409>
- El Ghaouth A, Ponnampalam R, Castaigne F, A. J. (2019). Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *Hort. Science.*, 27(9), 1016–1018. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.9.1016>
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M. J., Lagaron, J. M. (2010). The use of chitosan in antimicrobial films for food protection. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. <https://doi.org/10.1079/PAVSNR20105024> DOI 10.1079/PAVSNR20105024
- Forbes B, Bailey W, Weissfeld A, S. D. I. (2007). Immunochemical methods used for organism detection. En editores. Bailey and Scott (Ed.), *Diagnostic Microbiology* (pp. 189–201).
- Francisco Coronado M. C., M. M. D. (2009). *Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de Bordetella bronchiseptica de origen bovino y humano*.
- Franco, D., Giraldo, M., Patiño, P. (2004). Papel de los Adyuvantes en la Modulación de la Respuesta Inmune. *Rev. Col Cienc Pec*, 17(3), 280–289.
- Freund, J., Casals, J., Hosmer, E. (1937). S. and A. F. A. I. of T. B. and P. O. (1937). Sensitization and Antibody Formation After Injection of *Tubercle Bacilli* and Paraffin Oil. *Proc Soc Exp Biol Med*, 37(3), 509–513. <https://doi.org/10.3181/00379727-37-9625>
- Gallaher CM, Munion J, Hesslink R Jr, Wise J, G. D. (2000). Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr.*, 130(11), 2753–2759. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2753>
- Ganan M, Carrascosa AV, M.-R. A. (2009). Antimicrobial activity of chitosan against

- campylobacter spp. and other microorganisms and its mechanism of action. *J Food Prot.*, 72(8), 1735–1738. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.8.1735>
- Garçon, N., Leroux-Roels, G., & Cheng, W. F. (2011). Vaccine adjuvants. *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology*, 1(1), 89–113. <https://doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.004>
- Georgiev V St. (2009). Inmune Adjuvants. En *Infectious Disease* (Vol. 2, pp. 627–652).
- Ghalavand, M., Saadti M., Ahmadi, A., Abbasi E., Salimian, J. (2018). Immunological Evaluation of Chitosan Nanoparticles Loaded with Tetanus Toxoid. *Bratis Med. J.*, 119(2), 71–74.
- Gómez-Mascaraque, L. G., Méndez, J. A., Fernández-Gutiérrez, M., Vázquez, B., y San Román, J. (2014). Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: Application to hydrogels of agarose–chitosan. *Acta biomaterialia*, 10(2), 798–811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.003>
- Goodnow, R. A. (1980). Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*, 44(4), 722–738. <https://doi.org/10.1128/membr.44.4.722-738.1980>
- Goycoolea, F. Agulló, E., Mato, R. (2004). Fuentes y Procesos. En: Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. En *Fondo Editorial del Pontificia Universidad Católica del Perú*. (p. 105).
- Grange, RD, Thompson, JP, Lambert, D. (2014). Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br J Anaesth.*, 112(2), 213–216.
- Greenberg y Fleming, 1947. (1947). Increased efficiency of diphtheria toxoid when combined with pertussis vaccine; a preliminary note. *Can J Public Health*, 38(6), 279–282.
- Guadalupe, E., Patricia, S., ., Moreno-Martínez, E., Torres-Pacheco, I. y Virginia, A. (2013). Novel Methods for Preventing and Controlling Aflatoxins in food: A Worldwide Daily Challenge. En *INTECH, Aflatoxins-Recent advances and Future Prospects* (pp. 93–125).
- Guillén G, Aguilar JC, Dueñas S, Hermida L, Guzmán MG, Penton E, Iglesias E, Junco J, Torrens I, Lobaina Y, Muzio V, H. L. (2010). Virus-Like Particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. *Procedia Vaccinol.*, 2(2), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2010.07.004>
- Gupta RK. (1998). Aluminium compounds as vaccine adjuvants. *Adv. drug deliv. rev.*, 32, 155–172. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00008-8)
- H., W. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*.
- Ha TJ, L. S. (2001). Utilization of chitosan to improve the quality of processed milk. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 30(4), 630–634.
- Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Clark R, M. R. (1995). Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein, and cell morphology. *J. long-term defects med impl.*, 5(3), 209–231.

- Harish Prashanth K., T. R. (2005). Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1722(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.009>. Epub 2004 Dec 15.
- Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, R. S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol.*, 71(2–3), 235–244. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00609-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00609-2)
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez-Del Valle MG, Méndez-Montealvo MG, Sánchez-Rivera MM, B.-P. L. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydr Polym.*, 73(4), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.020>.
- Hernández, H., Águila, E., Flores, O., Viveros E., Ramos, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Sociedad mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales.*, 22(3), 57–60.
- Hirano, S., Nagao, N. (1989). Effects of Chitosan, Pectic Acid, Lysozyme, and Chitinase on the Growth of Several Phytopathogens,. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), 3065–3066. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869777>
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. Advanced drug delivery reviews. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 18–23.
- Ikeda I, Sugano M, Yoshida K, Sasaki E, Iwamoto Y, and H. K. (1993). Effects of chitosan hydrolyzates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats. *J. agric. food chem.*, 41(3), 431–435. <https://doi.org/10.1021/jf00027a016>
- Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, S. Y. (2009). Adjuvants and autoimmunity. *Lupus*, 18(13), 1217–1225. <https://doi.org/10.1177/0961203309345724>
- Jang, MK, Kong, B.G., Jeong, YI, Lee, C.H., Nah, J. (2004). Physicochemical characterization of –chitin, -chitin, -chitin separated from natural resources. *Journal of polymer science, part A: Polymer Chemistry*, 42(14), 3423–3432. <https://doi.org/10.1002/pola.20176>
- Jenkins, E. M. (1978). An agglutination test for the detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. *Canadian Journal of Comp. Med.*, 42(3), 286–292.
- Jennings R., Simms JR., H. A. (1998). Adjuvants and delivery systems for viral vaccines-mechanisms and potential. *Dev Biol Stand* 92, 19–28.
- Jeon, Y. J., Kamil, J. Y. V. A., & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an Edible Invisible Film for Quality Preservation of Herring and Atlantic Cod. *J. Agric. Food Chem.*, 50(18), 5167–5178. <https://doi.org/10.1021/jf011693l>
- Jiménez, A. (2015). *Evaluación de la acción liberadora de una bacterina en un termogel de quitosán, administrado a un modelo de ratas, mediante la cuantificación de anticuerpos presentes en sangre periférica para determinar la capacidad de éste como agente*

adyuvante de liber. UNAM.

- Johnson A.G., Gaines S., L. M. (1956). Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med.*, 103(2), 225–246. <https://doi.org/10.1084/jem.103.2.225>.
- Kasaai, M. (2008). A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 497–508. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.009>.
- Kean T and Thanou M. (2009). Chitin and chitosan—sources, production and medical applications,. *Desk reference of Natural Polymers, their Sources, Chemistry and Applications*, 327–361. <https://doi.org/DOI:10.1039/9781849733519-00292>
- Khoshnejad M, Young PR, Toth I, M. R. (2007). Modified influenza virosomes: recent advances and potential in gene delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 14(29), 3152–3156. <https://doi.org/10.2174/092986707782793989>
- Klokkevold, P.R., Fukayama, H., Sung E.C., B. C. (1999). The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J. oral maxillofac. surg.*, 57(1), 49–52. [https://doi.org/10.1016/s0278-2391\(99\)90632-8](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(99)90632-8)
- Kochkina Z., C. S. (2000). Effect of chitosan derivatives on the development of phage infection in cultured *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologiya*, 69(2), 266–269. <https://doi.org/10.1007/BF02756202>.
- Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H., Yu, L. J. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(2), 197–202. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.04.003>
- Laborde JM, Cagliada P, C. C. (2004). PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE *Corynebacterium kutscheri* Y *Bordetella bronchiseptica* EN ANIMALES DEL LABORATORIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN DIRECTA EN PLACA. *Analecta Vet*, 24(1), 25–28.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lárez, C., Chirinos, A., Rojas Avelizapa, L. (2019). Nuevos retos en agricultura para los biopolímeros de quitina y quitosano. 1. Efectos beneficiosos para los cultivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 20(3), 118–136.
- Lárez Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15–21.
- Lawson LB, Norton EB, C. J. (2011). Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 23, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.009>.

- Lebre, F., Bento, D., Ribeiro, J., Colaço, M., Borchard, G., Pedroso De Lima, M. C., & Borges, O. (2017). Association of chitosan and aluminium as a new adjuvant strategy for improved vaccination. *International Journal of Pharmaceutics*, 527(1–2), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.028>
- Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler C M, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsagué X, & C. S. (2012). Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, doubleblind. *The Lancet oncology*, 13(1), 89–99. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70286-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70286-8).
- Lenth, R. (2019). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.3.4*. <https://cran.r-project.org/package=emmeans>.
- Li, H., Willingham, S. B., Ting, J. P.-Y., y Re, F. (2008). Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *Journal of Immunology*, 181(1), 17–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.17>
- Li, X., Min, M., Du, N., Gu, Y., Hode, T., Naylor, M., ... Chen, W. R. (2013). Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2013/387023>.
- Liu H, Du Y, Wang X, S. L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol.*, 95(2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022>.
- Liu X., Guan Y., Yang D., Li Z., D. Y. K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(7), 1324–1335. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L)
- Lizárraga-Paulín, E., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., & Miranda-Castro, S. P. (2011). Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6439–6446. <https://doi.org/https://doi.org/10.4314/ajb.v10i34>.
- Llombart M., Chiner E., y S. C. (2006). Neumonía necrosante por *Bordetella bronchiseptica* en una mujer inmunocompetente. *Archivos de Bronconeumología.*, 42(5), 255–256.
- Lo Re III V., Brennan P., Wadlin J., Weaver R., and N. I. (2001). Infected Branchial Cleft Cyst Due to *Bordetella bronchiseptica* in an Immunocompetent Patient. *Patient. Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4210–4212. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4210-4212.2001>
- M.G., M. G. (2002). *Aislamiento y caracterización de Bordetella bronchieptica de origen canino*.
- Maeda Y, K. Y. (2004). Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. *J Nutr.*, 134(4), 945–950. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/134.4.945>

- Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., ... Mitsuoka, T. (1993). Hypocholesterolemic Effect of Chitosan in Adult Males. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(9), 1439–1444. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1439>
- Mak, T.W. y Saunders, M. (2006). *The immune response: basic and clinical principles*. Elsevier/Academic;
- Mannering SA, McAuliffe L, Lawes JR, Erles K, B. J. (2009). Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. *Vet Microbiol.*, 135(3–4), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.058>.
- Mattoo, S.; Cherry, J. D. (2005). Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Rev., Clin. Microbiol.*, 18(2), 326–382. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.326-382.2005>.
- McKee, A. S., MacLeod, M. K. L., Kappler, J. W., & Marrack, P. (2010). Immune mechanisms of protection: Can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biology*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-34>
- Megía González, R. (2020). *Vacunas: ¿Qué son y cómo funcionan?* Genotipia. <https://www.vaccines.gov/es/básicos/tipos>
- Mejía-Martínez, K., Lemus-Flores, C., & Zambrano-Zaragoza, J. F. (2010). Estudio comparativo en la respuesta inmune humoral de IgM E IgG en cerdo Criollo Mexicano y comercial. *Archivos de Zootecnia*, 59(226), 177–184. <https://doi.org/10.4321/s0004-05922010000200003>
- Meyer, R. C., & Beamer, P. D. (1973). *Bordetella bronchiseptica* infections in germ free swine: an experimental pneumonia. *Vet. Pathol.*, 10(6), 550–556. <https://doi.org/10.1177/030098587301000608>
- Miranda, S., Lizárraga, E. (2012). Is Chitosan a New Panacea? Areas of application. The Complex World of polysaccharides. En *INTECH* (pp. 3–46).
- Miranda Castro Susana. (2016). *Generan en la UNAM Microesferas de quitosán para descontaminar aguas residuales*. http://www.agua.unam.mx/noticias/2016/unam/not_unam_enero03.html https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_005.html.
- Miranda, S. P., Cárdenas, G., López, D., & Lara-sagahon, A. V. (2003). Comportamiento de películas de Quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(4), 331–336.
- Mochizuki, M., Yachi, A., Ohshima, T., Ohuchi, A., & Ishida, T. (2008). Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(6), 563–569. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.563>
- Mohamed, S. H., Arafa, A. S., Mady, W. H., Fahmy, H. A., Omer, L. M., & Morsi, R. E. (2018). Preparation and immunological evaluation of inactivated avian influenza virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Biologicals*, 51(June 2017), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.10.004>

- Molina GG, Rosales E, Bárcenas MG, M. C. J. (2006). Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains from canine origin. *Vet. Méx*, 37(3), 313–325.
- Molina González, M.G., Torres Márquez, M.E., Monsalvo Reyes, C.A., De la Torre Almaraz, R., Barcena Morales, G., Montaraz, J. A. (2014). The identification of *Bordetella bronchiseptica* from canine isolates of sequencing 16S ribosomal DNA. *African Journal of Microbiology Research*, 8(19), 1964–1969. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5749>
- Molina López, J., Monjarrez Zavala, Arteaga Garibay Ramón Ignacio, G. C. (2015). Microbiología Bacteriología y Virología. En S. A. de C. M. P. 294-302. Méndez editores (Ed.), *Microbiología Bacteriología y Virología* (Segunda ed).
- Molina Zerpa, J. A., Colina Rincón, M., Rincón, D., & Vargas Colina, J. A. (2017). Efecto del uso de quitosano en el mejoramiento del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L. variedad sd20a). *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 151–165. <https://doi.org/10.22490/21456453.2041>
- Montaraz Crespo, J. A. (1987). *Bordetella bronchiseptica*: su relacion con la rinitis atrofica porcina. *Ciencia Veterinaria* 4, 1, 203–223. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol4/CVv4c7.pdf>
- Montaraz JA, Novotny P, Y. J. (1985). Identification of 68- kilodalton protective antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*, 47(3), 744–751. <https://doi.org/10.1128/iai.47.3.744-751.1985>
- Montes Barqueros, N. (2018). *Técnicas de inmunodiagnóstico* (Primera ed). Editorial Síntesis.
- Mora-Montes, H.M., Netea, M.G, Ferwerda, G. Lenardon, M. D., Brown, G. D., Mistry, A. R., ... Gow, N. A. R. (2011). Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin,. *Infection and Immunity*, 79(5), 1961–1970. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/IAI.01282-10>.
- Moran, H. B. T., Turley, J. L., Andersson, M., & Lavelle, E. C. (2018). Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials*, 184, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.054>
- Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhay S, Baras B, Jacob V, Planty C, Elouahabi A, Harvengt P, Carlsen H, Kielland A, Chomez P, Garçon N, V. M. M. (2011). Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity, *Vaccine*, 29(13), 2461–2473. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.011>.
- Morris, Q.H.; Martínez M.C.; Abdala, D.R.; Campos, O. D. (1999). ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS. *Rev. Cubana Invest. Biomedicas*, 18(2), 130–137.
- Muhammad, A., Kassmannhuber, J., Raucher, M., Falcon, A. A., Wheeler, D. W., Zhang, A. A., Lubitz, P., & Lubitz, W. (2019). Subcutaneous Immunization of Dogs with *Bordetella bronchiseptica* Bacterial Ghost Vaccine. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01377>
- Murillo, M., Espuelas, S., Prior, S., Vitas, A., Renedo, M., Goñi, M., Irache, J., & Gamazo, C. (2001). Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de

- formulaciones galénicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 45(4), 19–34.
- Muzzarelli, R., Muzzarelli, C. (2005). Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Advances in Polymer Science*, 186, 151–209. <https://doi.org/10.1007/b136820>
- Muzzarelli, A. (1977). *Chitin*. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-02740-5>.
- Muzzarelli, R. A. A. (2010). Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. *Marine Drugs*, 8(2), 293–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md8020292>
- Nelson, RW., Couto, C. (2014). Small animal internal medicine. En *Elsevier* (Quinta edi).
- Ner, Z. (2003). Bordetella bronchiseptica infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr Transplant*, 7(5), 413–417.
- Ngom A, Boulanger D, Ndiaye T, Mboup S, Bada-Alambédji R, Simondon F, A.-A. A. (2006). Domestic animals as carriers of Bordetella species in Senegal. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 6(2), 179–182. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.6.179>.
- Nicholls EF, Madera L, H. R. (2010). Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1213, 46–61. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05787.x>
- Nichols, W.S. y Nakamura, R. M. (1984). Antibody patterns in autoimmune disease. *Lab Management*.
- Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki I, Tokura S, A. I. (1984). Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, 2(1), 93–99. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)90039-1](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)90039-1).
- Novotny P., Kobisch M., Cownley K., Chubb A. P., M. J. A. (1985). Evaluation of Bordetella bronchiseptica vaccine in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked-immunosorbent assay. *Infect. Immun.*, 50, 190–198.
- Nwe N., S. W. (2002). Chitosan isolation from the chitosan-glucan Complex of fungal cell Wall using amyolytic enzymes. *Biotechnology Letters*, 24(18), 1461–1464. <https://doi.org/10.1023/A:1019898715518>
- O'Hagan, D. T., Ott, G. S., Van Nest, G., Rappuoli, R., & Del Giudice, G. (2013). The history of MF59 adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Review of Vaccines*, 12(1), 13–30. <https://doi.org/10.1586/erv.12.140>
- O'Hagan, D. T., Wack, A. Podda, A. (2007). MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant for flu vaccines in humans: what did we learn during its development? *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 82, 740–744. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100402>.
- O'Hagan, D.T., y Valiante, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 727–735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrd1176>
- O'Hagan, D. T., MacKichan, M. L., & Singh, M. (2001). Recent developments in adjuvants

- for vaccines against infectious diseases. En *Biomolecular Engineering* (Vol. 18, Número 3, pp. 69–85). [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00101-0)
- O'Hagan DT, V. N. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov.*, 2(9), 727–735. <https://doi.org/10.1038/nrd1176>
- O'Hagan Derek. (2007). New Generation Vaccine Adjuvants. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020177>
- Olivera, N. (2014). Proteínas recombinantes útiles para la prevención de la infección por bordetella pertussis. *IBBM Universidad Nacional de la Plata*.
- Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, D. G. (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.*, 369(9580), 2161–2170. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60946-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60946-5)
- Park IK, Lee YK, Kim MJ, K. S. (2002). Effect of surface treatment with chitooligosaccharide on shelf-life of baguette. *J. chitin chitosan*, 7, 214–218.
- Park SI, Stan SD, Daeschel MA, Z. Y. (2005). Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. . . *J. food sci.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07189.x>.
- Park SM, Youn SK, Kim HJ, A. D. (1999). Studies on the improvement of storage property in meat sausage using chitosan-I. *J. Korean soc. food sci. nutr.*, 28, 167–171.
- Parvez, S., Rahman, M. M., Khan, M. A., Khan, M. A. H., Islam, J. M. M., Ahmed, M., Rahman, M. F., & Ahmed, B. (2012). Preparation and characterization of artificial skin using chitosan and gelatin composites for potential biomedical application. *Polymer Bulletin*, 69(6), 715–731. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0761-7>
- Photchanacha, S., Singkaew, J. and Thamthong, J. (2006). Effects of chitosan seed treatment on *Colletotrichum* sp. and seedling growth of chili cv. ' Jinda'. *Acta Horticulturae.*, 712 II, 585–590. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.712.70>
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R. C. T. (2018). *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-137.*
- Pioline, R.M. and Harvill, T. E. (2006). The *Bordetella bronchiseptica* type III secretion inhibits gamma interferon production that is required for efficient antibody – mediated bacterial clearance. *Infert. Inmmun.*, 2, 1043–1049.
- Podda, A. (2001). The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine, *Vaccine*. *Vaccine*, 19(17–19), 2673–2680. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00499-0](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00499-0)
- Porporatto, C., y Correa, S. G. (2007). *La modulación del sistema inmune de mucosas con polisacáridos*. 41(2), 203–212.
- Prabaharan, M., & Mano, J. F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery

- systems. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 12(1), 41–57. <https://doi.org/10.1080/10717540590889781>
- Qin C, Du Y, Xiao L, Li Z, G. X. (2002). Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int J Biol Macromol.*, 31(1–3), 111–117. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(02\)00064-8](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(02)00064-8). PMID: 12559434.
- R., T. H. (2012). La exposición al aluminio y su relación con el ambiente y la salud. *Tecnogestión: una mirada al ambiente*, 9(1), 12–31.
- Rath B, Wall J, S. D. (2008). Persistent *Bordetella bronchiseptica* Pneumonia in a Immunocompetent Infant and Genetic Comparison of Clinical Isolates with Kennel Cough Vaccine Strains. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 905–908.
- Razdan, A., & Pettersson, D. (1994). Effect of chitin and chitosan on nutrient digestibility and plasma lipid concentrations in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 72(2), 277–288. <https://doi.org/10.1079/bjn19940029>
- Reddy, M.V., Arul, J., Angers, P. and Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1208–1216. <https://doi.org/10.1021/jf981225k>
- Reed, S. G., Orr, M. T., & Fox, C. B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 19(12), 1597–1608. <https://doi.org/10.1038/nm.3409>
- Relyveld, E. H., Bizzini, B., & Gupta, R. K. (1998). Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids, Vaccine. *Vaccine*, 16(9–10), 1016–1023. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00288-0](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00288-0)
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer. Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>
- Ritz, C., Batsy F. Streibig, J., Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., Oñate, A. (2006). *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch. Med. Vet.*, 38(1), 7–18. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2006000100002>
- Robinson, D.N, Peppas, N. A. (2002). Preparation and characterization of pH responsive poly (methacrylic acid-g-ethylene glycol) nanospheres. *Macromolecules*, 35(9), 3668–3674.
- Rodas, M. M. (2013). *slideshare*. https://es.slideshare.net/cerna91/prueba-de-aglutinacion?next_slideshow=1
- Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Rivero-González, D., Bosques-molina, E., Barrera-Necha, L.L., Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307–317.
- Rodríguez Jara A. E., M. T. A. M. (2016). “Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de

- Bordetella bronchiseptica aislada en perros. En *Facultad de Ciencias agropecuarias: Vol. 1,2*.
- Roitt, I. (1991). *Essential Immunology* (B. S. Publications (Ed.); Seventh ed). Publications, Blackwell Scientific. University college.
- Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJT, A. P. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*, 9(10), 1149–1176. <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Roller S, C. N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. j .food microbial.*, 47(1–2), 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00006-9).
- Romanowski B1, Schwarz TF, Ferguson LM, Peters K, Dionne M, Schulze K, Ramjattan B, Hillemanns P, Catteau G, Dobbelaere K, Schuind A, D. D. (2011). Immunogenicity and safety of the HPV-16/18 AS04- adjuvanted vaccine administered as a 2-dose schedule compared with the licensed 3-dose schedule: results from a randomized study. *Human Vaccines*, 7(12), 1374–1386. <https://doi.org/10.4161/hv.7.12.18322>
- Romero, E. (2011). *Obtención de hidrogel de quitosano a partir del micelio de Aspergillus niger y su estudio en la liberación controlada de cefalexina*.
- Roycroft AN, Tsounakou E, C. V. (2007). Serological evidence of Mycoplasma cynos infection in canine infectious respiratory disease. *Mar*, 120(3–4), 358–362.
- Ruardy TG, Moorlag HE, Schakenraad JM, Van Der Mei HC, B. H. (1997). Growth of fibroblasts and endothelial cells on wettability gradient surfaces. *J. Colloid interf- sci.*, 188, 209–217. <http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1997.4769>.
- Sáenz, V., Hernáez, E., Sanz, L. (2003). Liberación controlada de fármacos en Hidrogel. *Rev. Iberoam. Polim.*, 4(1), 21–91.
- Sagoo, S, Board, R, R. S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, 19(2–3), 175–182. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/fmic.2001.0474>
- Salas, T., Martínez, B., Godínez, R., Núñez del Arco, A. M. C. (2008). Evaluation of humoral and cellular immune response in a murine model using vesicles outer membrane of Brusella ovis in chitosan nanoparticles. *Asian Chitin J.*, 4, 59–66.
- Salcedo Bellido, I. (2013). *Nanocomposites de quitosano y montmorillonita como promotores de la permeabilidad celular de oxitetraciclina*.
- Salud, S. de. (2008). *Manual de Vacunación 2008-2009*. federal g. manual de vacunación 2008-2009. 20 ed. méxico. dependencia del gobierno del df
- Salvador L, Miranda S P, A. N. and L. V. (1999). Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 43, 18–23. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=47543204>. ISSN 1870- 249X.
- Santos-López, G. (2013). *Propiedades Funcionales básicas de materiales porosos nanoestructurados de quitosano*.

- Scherließ, R., Buske, S., Young, K., Weber, B., Rades, T., Hook, S. (2013). In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. *Vaccine*, 31, 4812–4819.
- Schijns, V. (2006). Unraveling the immunologists dirty little secret. *Immunopotentiators in modern vaccines*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-012088403-2/50002-2>.
- Schijns VE. (2000). Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Current opinion in immunology*, 12, 456–463.
- Schlosser, A., Thomsen, T., Moeller, J. B., Nielsen, O., Tornøe, I., Mollenhauer, J., ... Holmskov, U. (2009). Characterization of FIBCD1 as an acetyl group-binding receptor that binds chitin. *Journal Immunology*, 183(6), 3800–3809. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901526>
- Schmidt K, Thakur R, Jiang G, F. D. (2008). Rapid Methods Automat. *Microbiol.*, 8(21).
- Schultze Viola., D'Agosto Vicente., Wack Andreas., Novicki Deborah., Zorn Juergen, H. R. (2008). Safety of MF59™ adjuvant. *Vaccine*, 26(26), 3209–3222. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.093>.
- Seetharaman, J., Kfanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S. H., & Rini, J. M. (1998). X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13047–13052. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/JBC.273.21.13047>.
- Seferian, P. G. y, & Martinez, M. L. (2000). Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine*, 19(6), 661–668. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00248-6)
- Senel, S, McClure, S. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv drug Deliv Rev*, 56(10), 1467–1480. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.007>.
- Seubert, A., Monaci, E., Pizza, M., O'Hagan, D. T., & Wack, A. (2008). The Adjuvants Aluminum Hydroxide and MF59 Induce Monocyte and Granulocyte Chemoattractants and Enhance Monocyte Differentiation toward Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 180(8), 5402–5412. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5402>
- Shibata, Y., Metzger, W.J, Myrvik, Q. N. (1997). Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *Journal of Immunology*, 159(5), 2462–2467. <https://doi.org/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278339>
- Sierra González Gustavo y Tamargo Santos Beatriz. (2011). Adyuvantes Inmunológicos Para Vacunas Humanas : Estado actual, Tendencias Mundiales y en Cuba. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba.*, 1(2).
- Singh, M, Kazzaz, J, Ugozzoli, M, Chesko, J, O'Hagan, D. (2004). Charged polylactide co-glycolide microparticles as antigen delivery systems. *Expert Opin Biol Ther.*, 4, 483-491.
- Singh, M, O'Hagan, D. (1999). Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol*, 17, 1075-1081.

- Singh M, Kazzaz J, Ugozzoli M, Malyala P, Chesko J, O. D. (2006). Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems. *Curr. Drug Deliv.*, 3(1), 115–120. <https://doi.org/DOI: 10.2174/156720106775197565>
- Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2002). Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*, 19(6), 715–728. <https://doi.org/10.1023/A:1016104910582>
- Sisti Federico, Fernández Julieta, Rodríguez María Eugenia, Lagares Antonio, guiso nicole y H. D. F. (2002). Instituto de Bioquímica y Biología molecular y. *Infect Immun.*, 70(4), 1791–1798. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1791-1798.2002>
- SM, R. T. and H. (1994). Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. . . *J Mater Sci*, C34, 375–437. <https://doi.org/DOI:10.1080/15321799408014163>
- Soares, K. S. R., Gláucia-Silva, F., Daniele-Silva, A., Torres-Rêgo, M., de Araújo, N. K., de Menezes, Y. A. S., ... Fernandes-Pedrosa, M. de F. (2018). Antivenom Production against Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Using Cross-Linked Chitosan Nanoparticles as an Immunoadjuvant. *Toxins*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/toxins10040158>
- Sonia, T.A., Sharma, C. P. (2011). Chitosan and Its Derivatives for Drug Delivery perspective Chitosan for biomaterials I. *Adv Polym Sci*, 243, 23–54. https://doi.org/10.1007/12_2011_117
- Stadelman, W. J. (1986). The preservation of quality in shell eggs. In: “Egg Science and Technology”. *Egg science and technology.*, 63–73. https://doi.org/10.1007/978-1-349-09142-3_4
- Stephenson, E. H., Trahan, C. J., Ezzell, J. W., Mitchell, W. C., Abshire, T. G., Oland, D. D., & Nelson, G. O. (1989). Efficacy of a commercial bacterin in protecting Strain 13 guineapigs against *Bordetella bronchiseptica* pneumonia. *Laboratory Animals*, 23(3), 261–269. <https://doi.org/10.1258/002367789780810581>
- Stephenson, I., Bugarini, R., Nicholson, K. G., Podda, A., Wood, J. M., Zambon, M. C., & Katz, J. M. (2005). Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: A potential priming strategy. *Journal of Infectious Diseases*, 191(8), 1210–1215. <https://doi.org/10.1086/428948>
- Straw, BE, Maclacblan, W T, Corbett, PB Carter, H. M. S. (1985). Comparison of tissue reactions produced by Haemophilus pleuropneumoniae vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med*.
- Stuart-Harris C.H. (1969). Future influenza virus vaccines. *Bull. WHO*, 41(3), 617–621.
- Suárez Vega D., Velasco de Maldonado G, Y. G. J. (2017). Histomorfometría de la regeneración ósea obtenida con sistema liposoma-membrana de quitosano en un modelo experimental. *Rev. virtual Soc. Parag. Med. Int.*, 4(1), 12–34.
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food biotechnology*, 6, 257–272. <https://doi.org/10.1080/08905439209549838>
- Sun, B., Yu, S., Zhao, D., Guo, S., Wang, X., & Zhao, K. (2018). Polysaccharides as vaccine

- adjuvants. *Vaccine*, 36(35), 5226–5234. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.040>
- Suzuki, S.; Okawa, Y.; Okura, Y.; Hashimoto, K.; Suzuki, M. (1982). *Immunoadjuvant Effect of Chitin and Chitosan*. In *Chitin and Chitosan*. 210–212.
- Szymańska, E., et al. (2014). *Influence of Unmodified and β -Glycerophosphate CrossLinked*.
- Tang, Dc., DeVit, M. y Johnston, S. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 356(6365), 152–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/356152a0>.
- Tao, W., Zheng, H. Q., Fu, T., He, Z. J., & Hong, Y. (2017). N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride: An immune-enhancing adjuvant for hepatitis E virus recombinant polypeptide vaccine in mice. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 13(8), 1818–1822. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1331191>
- Team, R. C. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>. Package pwr:
- Troyano Suárez, Nuria, et al. (2013). Hiperfosfatemia y Envejecimiento en Sistemas Renales y Cardiovasculares. . . *Papel De Ilk*.
- Tsiptsias C, Tsvintzelis I, Papadopoulou L, P. C. A. (2009). novel method for producing tissue engineering scaffolds from chitin, chitin-hydroxyapatite, and cellulose. *Mater. Mater. Sci. Eng. C.*, 29(1), 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.06.003>
- Uberos Fernández, J. (2013). Adyuvantes en vacunas. *30 De Septiembre*, 5. <http://ibvacunas.com/2013/09/30/859/>
- Ueland, K. (1990). Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. *Vet Rec.*, 126(19), 481–483.
- Ulanova M., Tarkowski A., H.-Z. M. y H. L. (2001). The common Vaccine Adjuvant Aluminum Hydroxide Up-Regulates Accessory Properties of Human Monocytes via an Interleukin-4-Dependent Mechanism. *INFECTION AND IMMUNITY*, 69(2), 1151–1159. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.1151-1159.2001>
- Vaccine, S., & Levesque, P. M. (2005). Mechanism of Adsorption of Three Recombinant Streptococcus Pneumoniae ND ES SC ACKNOWLEDGEMENTS. *Human Vaccines*, 1(2), 70–73.
- Valladares-Carranza, B., Ortega-Santana, C., Velazquez-Ordoñez, V., Zamora-Espinosa, J. L., Peñuelas-Rivas, C. G., Castro-Maruri, J., Talavera-Rojas, M., Alonso-Fresan, M. U., & Zaragoza-Bastida, A. (2011). *Bordetella bronchiseptica* como un riesgo importante de salud publica. Estudio clínico patológico en conejos. *Revista Electronica de Veterinaria*, 12(10).
- Vasanthakumari, R. (2007). *Textbook of microbiology* (N. D. B. Publications (Ed.)).
- Velásquez, C. L. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista Científica UDO Agrícola*, 8(1), 1–22.

- Vogel, F. (2000). Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis*, 30(3), S 266-270.
- Wang, Chunming, et al. (2011). Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker— Genipin with therapeutic model cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97(1), 58–65.
- Wang, M.Z.; Qiang, J.C.; Fang, Y.; Hu, D.D.; Cui, Y.L.; Fu, X. G. (2000). Preparation and properties of chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) semi-IPN hydrogels. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 38(3), 474–481.
- Weese, JS. y Fulford, M. (2011). Companion Animal Zoonoses. *Wiley-Blackwell*.
- Wernli, D. Emonet, S, Schrenzerl, J. Harbarth, S. (2011). Evaluation of eight cases of confirmed *Bordetella bronchiseptica* infection and colonization over a 15-year period. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(2), 190–203.
- Wild, D. (2008). The Immunoassay Handbook. Pittsburgh. *Elsevier*.
- Woolfrey, B.F. and J.A. Moody. (1991). Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev*, 4(3), 243–255.
- Zaldívar, D., Péniche, C., Gallardo, A., & Román, J. S. (1993). Biocompatible hydrogels of controlled hydrophobicity from copolymers of N-vinyl-2 -pyrrolidone and furfuryl methacrylate. *Biomaterials*, 14(14), 1073–1079. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90208-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90208-J)
- Zeligs, J.B., Zeligs, J.D. and Bellanti, A. J. (1986). Functional and ultrastructural changes in alveolar macrophages from rabbits colonized with *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.*, 3, 702–706.
- Zhang, C.; Yu, S.; Gran, B.; Rostami, A. (2005). Glucosamine abrogates the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of Th2 response. *J. Immunol.*, 175, 7202–7208.