

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

López B.J.A.<sup>1</sup>, Quintanar-Guerrero.D<sup>2</sup>., Romero R.A.<sup>3</sup>, Suarez G.F.<sup>4</sup> Ciprián C.A.<sup>1</sup> Mendoza E.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Coordinación de Posgrado; <sup>2</sup>Posgrado en Tecnología Farmacéutica; <sup>3</sup>Laboratorio de Biología Molecular. Posgrado -FES-Cuautitlán, UNAM; <sup>4</sup>Facultad de Medicina Veterinaria UNAM.

### Introducción.

La pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad altamente contagiosa que se asocia en particular con cerdos en crecimiento, posee un extraordinario interés económico que se traduce, según los casos, por los altos porcentajes de mortalidad y más importante aún, por las mermas en las producciones, alargamiento en el periodo de cebo, altos costos en medicamentos, asistencia veterinaria (1). Sin embargo los animales que sobreviven a la enfermedad adquieren resistencia contra todos los serotipos por esta razón se pensó en utilizar a las toxinas Apx como inmunógeno, un factor producido por la bacteria *in vivo* que se sabe es fuertemente inmunogénico. Es ya del conocimiento general que la ruta de administración de un inmunógeno influye en como y donde se expresa una respuesta inmune. El concepto de un sistema inmune integral de las mucosas ha sido ya establecido por diversos estudios utilizando la vía de administración oral (2). El desarrollo de métodos de inmunización por vía oral podría entonces ser de gran importancia para el control de esta enfermedad. Para inmunizar a través de esta vía es necesario el uso de un sistema que transporte y proteja el inmunógeno hasta los sitios de reconocimiento inmunológico en el intestino del animal. El monooleato de glicérido o monooleína un lípido anfifílico que forma al contacto con el agua fases de transición. Estas características permitirían a la monooleína funcionar como un sistema de acarreo y protección para moléculas proteicas que sería administrado por vía oral (3).

### Material y Métodos.

Las Toxinas Apx se obtuvieron de crecimientos de 12 horas de los serotipos 1 y 3 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en caldo BHI adicionado de extracto de levadura. Los sobrenadantes conteniendo las toxinas Apx se enriquecieron utilizando la filtración tangencial, la cromatografía de exclusión de peso molecular y se concentraron por liofilización. El proceso de enriquecimiento se evaluó mediante las técnicas de cuantificación de proteínas por el método de Bradford, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y Westernblott. Para demostrar la existencia de las tres toxinas se utilizó el isoelectroenfoque. La formación del gel de monooleína y el efecto de la inclusión de las toxinas Apx en su fase cúbica se observó mediante microscopia de luz polarizada. La liberación de las toxinas del gel se estudio mediante pruebas de disolución *in vitro*

### Resultados.

Bandas cercanas al marcador de 100 KDa nos hacen especular sobre la presencia en los sobrenadantes de las toxinas Apx, el ensayo de Westernblott comprobó la existencia de estas y mediante la prueba de isoelectroenfoque se pudo demostrar que cada serotipo producía dos diferentes toxinas. La microscopia de luz polarizada demostró que la inclusión de 400 µg de toxina Apx no modificaban la formación de la fase cúbica del monooleato de glicérido. Las pruebas de disolución *in vitro* permitieron establecer que el 65 % de las toxinas eran liberadas después de 4 horas.

### Referencias Bibliográficas.

1. Mendoza,S. Ciprian, A.(2001).Tercer Ciclo Nacional "Enfermedades respiratorias del cerdo". Ed.UNAM. México DF.75-84,100-111
2. Hensel,A.(1995)..Infection and Immunity.63:3048-3053.
3. Ganem-Quintanar. (2000). A review of the pharmaceutical applications.Drug Development and Industrial Pharmacy.26:809-820..