



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Evaluación de la inmunogenicidad en modelo murino de una
vacuna experimental basada en micropartículas de quitosano
sulfatado conjugadas con antígenos *Mycoplasma
hyopneumoniae***

María José Rossel Medina

Memoria para optar al

Título Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas

PROFESOR GUÍA: SERGIO BUCAREY

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

Proyecto FONDEF ID19I10135

SANTIAGO, CHILE

AÑO 2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Evaluación de la inmunogenicidad en modelo murino de una
vacuna experimental basada en micropartículas de quitosano
sulfatado conjugadas con antígenos *Mycoplasma
hyopneumoniae***

María José Rossel Medina

Memoria para optar al

Título Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas

Nota Final

Prof. Guía	SERGIO BUCAREY VIVANCO	Firma
Profesor Corrector	ANDRÓNICO NEIRA -CARRILLO	Firma
Profesor Corrector	GALIA RAMÍREZ TOLOZA	Firma

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDEF ID19I10135

SANTIAGO, CHILE

AÑO 2022

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me apoyaron en este largo proceso universitario, especialmente a mis padres, a mi hermano y mi pareja, que siempre estuvieron dispuestos a escucharme y a ofrecerme consuelo cuando las cosas no salían como uno quisiera.

Agradecer a mis amigas incondicionales que siempre están ahí y dispuestas a ayudar en todo momento.

También es importante agradecer por el tiempo y disposición al profesor guía, por toda la ayuda entregada, las correcciones y la disposición en ayudar en todo momento.

A Belén, mi amiguita de la carrera y compañera en este último proceso, que sin ella, no hubiese sido posible esta tesis y por hacer este proceso más ameno y acogedor.

Por último agradecerle a la vida por darme la oportunidad de haber tenido a mi hija peluda, Canela, que sin ella no hubiese descubierto mi profesión, y se que ahora está en el cielo de los perritos esperándome para volver a estar juntas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO.....	7
IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO.....	8
PÉRDIDAS ECONÓMICAS.....	10
VACUNAS EXISTENTES.....	10
INMUNIDAD POR VACUNAS.....	12
A. Vía parenteral.....	12
B. Vía no parenteral.....	12
QUITOSANO.....	13
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
A. Utilización de roedores.....	17
B. ELISA indirecto: Título de anticuerpos antígeno-específicos contra	
M. hyopneumoniae.....	22
C. Análisis estadístico de los resultados.....	24
RESULTADOS.....	25
A. Observación de efectos adversos.....	25
B. Análisis de inmunogenicidad.....	27
DISCUSIÓN.....	33

CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

En las producciones porcinas hay enfermedades que ocurren al inicio de la vida de los lechones, una de ellas, se conoce como el “Complejo Respiratorio Porcino” que causa pérdidas millonarias generando muertes prematuras. Esta enfermedad es de naturaleza multifactorial y el principal agente es el *Mycoplasma hyopneumoniae*, causante de la Neumonía enzoótica porcina. Este agente afecta al aparato mucociliar del sistema respiratorio generando inmunosupresión y enfermedad respiratoria severa y crónica.

Para el combate de este agente existen diversas vacunas en el mercado sin embargo, ninguna de ellas ha generado un control real de la patología.

El objetivo de esta memoria fue evaluar, en modelo murino, la inmunogenicidad y seguridad de micropartículas (MPs) de quitosano sulfatado (QS) y quitosano comercial (QC) conjugadas con antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Las variables críticas estudiadas corresponden la medición del título de anticuerpos antígeno-específicos y perfil de seguridad, en ratones BALB/c (n=18), tras la administración de MPs de QS y QC conjugadas con antígenos, por vía intranasal (IN) e inyectable intraperitoneal (IP), bajo dos formatos de volúmenes de administración.

Las pruebas realizadas correspondieron a análisis de ELISA indirecto (*in house*) para evaluar la inducción de anticuerpos específicos contra este patógeno. Para el análisis de los resultados se utilizó el software Prism - GraphPad™ y el tratamiento estadístico fue evaluado por medio del ANOVA de medidas repetidas.

Paralelamente se evaluó la inducción de lesiones en el sitio de inyección, la temperatura corporal y el consumo de alimento.

Lo principales resultados encontrados fueron que la formulación de MPs de QS con aplicación IN fue capaz de inducir anticuerpos específicos contra antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* más eficientemente que la formulación de MPs de QC, manifestando un aumento significativo del título de anticuerpos en el tiempo, el cual fue potenciado con la administración de un refuerzo a las cuatro y seis semanas. También, se evidenció que la administración IP de MPs de QS induce de

forma significativa la producción de anticuerpos comparado con QC, sin embargo, los niveles de anticuerpos alcanzados fueron menores respecto al formato de administración IN. Simultáneamente cuando se evaluó la seguridad de estas formulaciones vacunales en forma IP, se evidenciaron efectos adversos asociados al QC, provocando una dermatitis necrótica pero esto no sucedió con la formulación de QS. Con respecto al consumo diario de alimento y temperatura corporal, estas variables no marcaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ensayados.

Conclusión: Estos resultados demostraron que es factible utilizar MPs de QS como un sistema simple y seguro para la entrega de antígenos de *M. hyopneumoniae* y de esta manera, la administración vía mucosa nasal puede ser una estrategia efectiva para inducir altos títulos de anticuerpos contra este patógeno.

Palabras claves: Micropartículas, quitosano, quitosano sulfatado, *Mycoplasma hyopneumoniae*.

ABSTRACT

In swine production there are diseases that occur at the beginning of the life of piglets, one of most important is known as the "Porcine Respiratory Complex" that causes economic losses generating premature deaths. The nature of this disease is multifactorial and the major agent is *Mycoplasma hyopneumoniae*, which causes enzootic swine pneumonia. This agent affects the mucociliary apparatus of the respiratory system, generating immunosuppression and severe and chronic respiratory disease.

There are several vaccines on the market to combat this agent, however none of them has generated a real control of the infectious pathology.

The objective of this thesis was to evaluate, in a murine model, the immunogenicity and safety of microparticles (MPs) made of sulfated chitosan (QS) and commercial chitosan (QC) conjugated with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens.

The critical variables studied corresponded to the measurement of the titer of antigen-specific antibodies and safety profile, in BALB/c mice (n=18), after administration of QS and QC microparticles conjugated with antigens, intranasally (IN) and injectable (IP), under two volume formats.

The tests carried out corresponded to indirect in house ELISA analysis to evaluate the induction of specific antibodies against this pathogen. For the analysis of the results, the Prism - GraphPad™ software was used and the statistical treatment was evaluated by repeated measures ANOVA.

In parallel, the induction of lesions at the injection site, body temperature and food consumption were evaluated.

The main results found were that the QS MPs formulation with IN application was able to induce specific antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens more efficiently than the QC MPs formulation, showing a significant increase in the antibody titer over time. Which was enhanced with the administration of a booster at four and six weeks. Also, it was shown that the IP administration of QS MPs significantly induces the production of antibodies compared to QC, however the levels of antibodies achieved were lower compared to the IN administration format.

At the same time, when evaluating the safety of these vaccines, regard to IP formulations, some adverse effects associated with QC were observed, causing necrotic dermatitis, but this did not occur with the QS formulation. With respect to daily food consumption and body temperature, these variables did not show significant differences between the different treatments tested.

Conclusion: These results demonstrate that it is feasible to use QS MPs as a simple and safe system for delivering of *M. Hyopneumoniae* antigens and, in this way, its administration, via the intranasally mucosa, can be an effective strategy to induce high titers of antibodies against this pathogen.

Keywords: Microparticles, chitosan, sulfated chitosan, *Mycoplasma hyopneumoniae*.

INTRODUCCIÓN

La carne de cerdo es la carne de mayor consumo mundial, cuya demanda va en aumento año tras año gracias al aumento de los ingresos per cápita en los países en vías de desarrollo. ODEPA menciona que, en Chile, en el año 2012, la producción de carne de cerdo representó el 40% de la producción total de carnes, es decir, 583.673 toneladas de varas. Aumentando la producción un 10.6% respecto al año anterior.

Sin embargo, en la industria porcina, las infecciones producidas por bacterias y virus son una permanente amenaza para la salud de esta especie, causando grandes bajas en la productividad y con ello provocando pérdidas económicas para los productores de la industria porcina.

Dentro de las enfermedades que comúnmente afectan a estos planteles se encuentra el Complejo Respiratorio Porcino (CRP) en que se ven involucrados diversos agentes tales como *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Circovirus porcino tipo 2*. Tales agentes se instalan en el sistema respiratorio del cerdo generando inmunodepresión y predisponiendo al animal a infecciones secundarias con otros agentes infecciosos oportunistas.

M. hyopneumoniae es el agente etiológico primario causante de neumonía enzoótica de porcina, enfermedad crónica del aparato respiratorio, que en primera instancia coloniza el tracto respiratorio produciendo adherencia a las células ciliadas de la tráquea, bronquios y bronquiolos, generando pérdida de estos cilios y por consiguiente colonización masiva del aparato respiratorio.

En Chile este patógeno ha sido comúnmente aislado que se detecta por pruebas serológicas como ELISA en el cual identifica la presencia de anticuerpos contra ese patógeno en particular.

En el mercado nacional e internacional existen vacunas comerciales para combatir los diferentes patógenos del CRP pero no hay ninguna vacuna combinada que contemple más de 3 patógenos.

Es por estos motivos que se hace imprescindible contar con un nuevo modelo de vacuna que cuente con el agente bacteriano involucrado con adecuada

eficacia, por lo tanto, se plantea la utilización de nueva tecnología como la microencapsulación del QS conjugado con el patógeno *M. hyopneumoniae*.

Para ello, en este proyecto de tesis se demostrará, en modelo murino, la inmunogenicidad de una vacuna experimental contra el agente *M. hyopneumoniae* mediante la cuantificación de anticuerpos contra antígenos específicos de *M. hyopneumoniae*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO

El CRP es una naturaleza multifactorial, en donde, las condiciones ambientales de los planteles porcinos, el estado inmunológico del hospedero y la acción conjunta de varios agentes patógenos juegan un papel importante en la manifestación clínica de esta enfermedad, causando graves pérdidas económicas por los daños que produce en los tejidos del sistema respiratorio, afectando a su metabolismo y gatillando muertes prematuras (Espinosa *et al.*, 2008).

Los agentes patógenos involucrados se pueden dividir en virus, bacterias y parásitos. Dentro de los primeros mencionados se encuentra el *Circovirus porcino* tipo 2, *Virus de la influenza porcina* y *Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino*. Por otro lado, dentro de los agentes bacterianos se encuentran *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* entre otros patógenos bacterianos. Por último, se destaca la participación de parásitos como *Ascaris suum* y *Metastrongylus spp.*

M. hyopneumoniae se considera uno de los principales patógenos asociados a CRP, y su presencia impacta fuertemente en los planteles porcinos, ya que va en desmedro de la ganancia de peso diaria y disminuye la velocidad de crecimiento (Flores *et al.*, 2006).

La patogenia de este CRP varía dependiendo del tipo de agente involucrado, pero los reportes indican que una vez perdido el equilibrio hospedero, ambiente y agente se llevan a cabo una serie de daños a nivel pulmonar predisponiendo al animal a infecciones secundarias, generando más complicaciones y menor sobrevivencia del animal (Espinosa *et al.*, 2008).

Los signos clínicos asociados al CRP son diversos debido a los múltiples agentes involucrados y además no existe un periodo de incubación totalmente identificable. La signología principal es la tos y a ello se le suma apatía generalizada, anorexia, fiebre persistente, disnea, letargia y emaciación rápida (Flores *et al.*, 2006).

IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO

Mycoplasma hyopneumoniae es una bacteria que pertenece a la clase *Mollicutes*, que se caracteriza por ser una bacteria pequeña, esférica y con ausencia de pared celular (García *et al.*, 2015). Además, cuenta con membrana trilaminar que contiene colesterol, citoplasma con ribosomas, gránulos citoplasmáticos y un núcleo constituido por moléculas bicatenarias de DNA y RNA. El genoma es pequeño de 893-920 pares de kilobases, por ende, codifica un número limitado de genes (Andrade *et al.*, 2001).

Estudios realizados con anterioridad detallan la existencia de gran diversidad genómica de estas bacterias y además han demostrado diferentes características en la virulencia de las cepas aisladas (Nathues *et al.*, 2011).

Este patógeno no es capaz de sobrevivir durante mucho tiempo fuera del hospedero, sin embargo, en aerosoles aumenta su supervivencia y puede seguir siendo infeccioso un máximo de 31 días en agua a 2 - 7°C (Villarreal, 2010).

La patogénesis de la infección por *M. hyopneumoniae* comienza con la colonización del tracto respiratorio. Allí la bacteria se adhiere a células ciliadas epiteliales de la tráquea, bronquios y bronquiolos (García *et al.*, 2015). La adhesión provoca ciliostasis, pérdida de cilios, daño en la primera barrera de defensa del aparato respiratorio e incrementando la multiplicación del patógeno y con ello la colonización total del aparato respiratorio (Thacker, 2004). Este patógeno altera la capacidad fagocítica de los macrófagos, estimulándolos a producir citoquinas proinflamatorias que inducen a una respuesta inflamatoria y daño pulmonar progresivo (Thacker *et al.*, 2012).

Esta infección se ha descrito en casi todos los países que tienen industria porcina de forma intensiva, además se destaca que en la etapa de recría y engorda es donde hay más prevalencia. Esto sucede porque los lechones son destetados y trasladados a los corrales de recría, por tanto, tienden a disminuir la cantidad de anticuerpos, por ende, quedan más susceptibles de presentar cuadros respiratorios asociados al CRP (Andrada *et al.*, 2004).

Una enfermedad característica por infección por *M. hyopneumoniae* es la “Neumonía Enzoótica Porcina” causando una signología multisistémica,

inmunosupresión que facilita infecciones oportunistas y síntomas respiratorios. Tales síntomas son la tos no productiva, crónica y persistente, reducción en la ganancia diaria de peso y bajo índice de conversión alimentaria. Además se destacan signos clínicos como pirexia, dificultad respiratoria, disnea y muerte prematura (Thacker *et al.*, 2012).

La edad susceptible a la infección es de 14-20 semanas de vida, sin embargo, estudios demuestran que sobre las 6 semanas de vida del cerdo puede contraer este patógeno (Villarreal, 2010).

Dentro de las lesiones macroscópicas, se destaca la bronconeumonía catarral crónica distribuida cráneo-ventral, afectando principalmente a lóbulos apicales del pulmón. En la fase inicial de la infección, se ven lesiones color rojo oscuro y cuando la enfermedad entra en fase aguda hay presencia de exudado muco-purulento de las vías aéreas y dilatación de los lóbulos pulmonares. En cambio, cuando la enfermedad es de curso crónico se ve una reducción de las lesiones pulmonares debido al colapso de los alvéolos y presencia de enfisema alveolar compensado (García *et al.*, 2015).

La transmisión de *M. hyopneumoniae* ocurre principalmente por vía aérea, contacto directo con secreciones respiratorias de cerdos portadores. También estudios plantean que la transmisión persiste en planteles por 3 motivos: el primero de ellos, es que la madre es portadora y le transmite el patógeno a sus lechones por vía aérea, contacto directo con animales infectados por hacinamiento en planteles porcinos y el último mecanismo es por la entrada constante de nuevos lechones al sistema productivo (Calsamiglia *et al.*, 2000).

Sin embargo, dinámica de la infección difiere entre los distintos rebaños, debido a que ésta infección depende de las diferentes condiciones ambientales, condiciones de manejo, alojamiento y el tipo de sistema productivo, siendo de máxima importancia el potencial de las cerdas en la diseminación de *M. hyopneumoniae*, no sólo por la transmisión del agente a la descendencia, sino que debido al mantenimiento de la infección dentro de la producción (Calsamiglia *et al.*, 2000).

Se ha reportado una seroprevalencia del 81% en cerdos de 50 granjas de engorda (Maes *et al.*, 1999). Un estudio transversal realizado en 2578 cerdas de 67 rebaños en el noroeste de Alemania demostró que el 65% de las cerdas fueron seropositivas a micoplasmosis (Villareal, 2010).

PÉRDIDAS ECONÓMICAS

Las pérdidas económicas ligadas a CRP y *M. hyopneumoniae* señalan que los animales que presentan el cuadro respiratorio presentan una disminución del consumo de alimento, disminuyendo la ganancia de peso diaria (GPD) deteriorando así la conversión alimenticia (CA) (Villareal, 2010). Por consiguiente, el animal pesa menos y con ello se vende a menor precio

Sin embargo, cuando el CRP es severo, la tasa de mortalidad y la tasa de desecho se elevan significativamente, además la GPD se reduce hasta el 50%. Por tanto se duplican las pérdidas económicas (Ramírez, 2017).

En el área de producción porcina, las infecciones producidas por virus y bacterias son una permanente amenaza para la salud de los cerdos afectando negativamente a la productividad. Por esto mismo, se plantea que la pérdida económica por cerdo afectado del complejo respiratorio porcino es de 7.29 USD, perjudicando la rentabilidad del sistema productivo (Ramírez, 2017).

Nuevos estudios indican que las pérdidas asociadas a la Neumonía enzoótica porcina van en orden de los 200 millones de dólares, no solo de manera directa sino que también hay pérdidas asociadas al concepto de medicamentos, y manejos en el ambiente.

Es por esta razón que se necesita desarrollar nuevas medidas de prevención que sean efectivas, de fácil administración y de bajo costo.

VACUNAS EXISTENTES

Actualmente se encuentran registradas, en Chile, 22 vacunas dirigidas a atacar patógenos asociados a CRP, 9 contra *M. hyopneumoniae*, 9 contra *Circovirus*

porcino tipo 2; y 4 vacunas combinadas contra *M. hyopneumoniae* y *Circovirus porcino tipo 2* (SAG, 2021).

A nivel nacional, entre las vacunas más utilizadas contra el CRP se encuentran: Ingelvac® MycoFLEX contra *M. hyopneumoniae* de Boehringer Ingelheim. Recientemente ha ingresado al mercado europeo la vacuna Porcilis PCV M Hyo del laboratorio MSD Animal Health, vacuna veterinaria que contiene antígeno de la subunidad del *Circovirus porcino tipo 2* (PCV2) y una cepa inactivada (muerta) de la bacteria *M. hyopneumoniae*. Todas estas vacunas están disponibles como emulsión inyectable y actualmente se están estudiando rutas alternativas de administración que sustituyan o complementen a la vía clásica parenteral (EMA, 2014).

Ingelvac MycoFLEX de Boehringer Ingelheim está autorizada desde 2008 por la FDA americana y desde 2010 a nivel europeo por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2014). Esta administración combinada consiste en mezclar 1 ml de Ingelvac CircoFLEX y 1 ml de Ingelvac MycoFLEX y administrar en una única inyección parenteral con un mínimo volumen de inoculación de 2 ml (EMA, 2014).

Por otra parte, en varios estudios de campo y experimentales, las lesiones producidas por PCV2 se ha atribuido, también, a una estimulación del sistema inmunológico y al estrés del animal. En primer lugar se señaló a la vacunación frente a *M. hyopneumoniae* como una de las causas que pueden estimular la replicación de PCV2. En segundo lugar, dicha estimulación ha sido atribuida a adyuvantes concretos más que a la vacuna misma. Nuevas propuestas de vacunas plantean, entonces, el uso de un nuevos adyuvantes y sistemas de entrega con lo cual se evite la estimulación exacerbada del sistema inmune del animal, lo cual es considerado, en el caso, de tratar este tipo de patógenos, como un efecto adverso (Sibila *et al.*, 2014).

Respecto a la real efectividad de las vacunas contra *M. hyopneumoniae* disponibles en el mercado, siempre ha sido discutida a nivel de campo, sin embargo, no existen estudios publicados que lo confirmen. De esta manera, existe la necesidad de explorar nuevas alternativas de vacunas para combatir este patógeno altamente persistente en los plantales (Centeno *et al.*, 2019).

INMUNIDAD POR VACUNAS

La utilización de las vacunas es una herramienta médica y veterinaria más efectiva para el control de ciertos patógenos, cuyo objetivo principal es estimular el sistema inmunológico del hospedador para contrarrestar el efecto de la infección.

Una de las maneras para identificar la real efectividad de las vacunas es la medición de IgM e IgG principalmente, sin embargo no es el único método.

Existen diferentes tipos de vacunas como: las vacunas vivas modificadas cuyo objetivo es estimular la inmunidad humoral sin provocar enfermedad, ya que modifican su inmunogenicidad y el antígeno pierde la capacidad de replicarse en el hospedero, vacunas inactivadas son las más seguras ya que no hay riesgo de virulencia pero tiene poca reacción en la inmunidad celular (Tizard, 2009).

Existen diferentes vías de administración para una vacuna, tales como:

A. Vía parenteral

La mayoría de las vacunas son administradas por las siguientes vías: intramuscular (IM), subcutánea (SC) e intradérmica (ID). Cada una de ellas presentan una inmunogenicidad relativa que depende de muchos factores como el tipo de vacunas y el adyuvante utilizado.

Cualquiera sea la vía de administración, cuando se produce la inoculación, se rompe la integridad de la primera barrera de defensa de los seres vivos, la piel. Este evento genera que se liberen mediadores solubles de las células epiteliales, que actúan como mediadores quimiotácticos, que dan la señal de que hay un evento invasor. Estos mediadores atraen diferentes tipos celulares, entre ellos, las células dendríticas que actúan como células presentadoras de antígeno (APC). Y una vez que interactúan y capturan el antígeno, migran a los ganglios linfáticos regionales que serán presentados al linfocito T CD4+ y activan así una respuesta.

B. Vía no parenteral

Una buena estrategia de protección frente a patógenos es generar inmunidad a nivel de mucosas (oral, nasal, digestiva o genitourinaria) debido a que es la vía de ingreso común para casi todos los patógenos. Otra ventaja es la de disminuir el dolor a la inoculación, hay menos reacciones adversas a la vacuna y

además es de fácil administración. Por tanto, ha habido gran auge en buscar inoculaciones no parenterales que estimulen efectivamente a la mucosa y al sistema inmune (CAV, 2021).

El sistema inmunitario asociado a mucosas (MALT) tiene un modo similar al descrito con anterioridad, sin embargo, en las mucosas hay mayor presencia de enzimas que degradan estos antígenos.

Es característico que en la mucosa nasal, el aparato mucociliar sea el encargado de eliminar microorganismos patógenos.

En la mucosa nasal, se encuentran las células M, que actúan como centinelas, es decir, son las encargadas de transportar al tejido linfóide asociado a la nasofaringe (TLAN), que son un equivalente al ganglio linfático regional. Además en TLAN hay linfocitos B y T que se encargaran de transmitir esta respuesta a los diferentes ganglios linfáticos gatillando una respuesta efectiva en el organismo (CAV, 2021).

QUITOSANO

El quitosano es un polisacárido natural derivado de la desacetilación de quitina, este último es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, y se obtiene a partir de caparazones de los crustáceos, exoesqueleto de insectos y paredes celulares de algunas bacterias y hongos (Espinosa *et al.*, 2019). En su estructura química presenta un grupo amino primario y grupos hidroxilos libres.

Es un compuesto inocuo, biodegradable, soluble en soluciones de pH ácido, y tiene la capacidad de mucoadhesión y alta viscosidad. Estas características hacen que el quitosano sea un buen candidato como adyuvante de depósito para vacunas parenterales porque permite una liberación más prolongada del antígeno, además de tener la capacidad de traspasar las uniones estrechas intercelulares (Gálvez, 2017).

La utilización de este compuesto natural ha generado gran interés en la industria farmacéutica ya que entre algunas ventajas como la capacidad de poder

modificar el tamaño de la partícula generando MPs, protege al antígeno de la degradación enzimática y también tiene la posibilidad de regular la liberación de antígenos (Gálvez, 2017).

Islam *et al.* 2012, destacan que el quitosano presenta carga catiónica, debido al grupo amino de su estructura química, y esto sería favorable con la interacción de las superficies de mucosas, ya que estas últimas tienen carga eléctrica negativa. Además, en el mismo estudio, destacan la propiedad no tóxica de este compuesto pudiéndose aplicar de manera efectiva en la vacunas no parenterales con vía mucosa porque en un ambiente acuoso, como lo son las mucosas, este compuesto forma una capa similar a un gel favoreciendo la interacción de estos polímeros con la glicoproteína de las mucosa. Acerca de esta particularidad, dichos autores destacan que podría ser ventajosa para la administración de vacunas nasales, porque reduce la eliminación rápida de la vacuna y además forma una película para la activación del sistema inmune asociado a mucosas (TLAN).

Estudios han demostrado que MPs de quitosano presentan actividad inmunoestimuladora, es decir, aumenta la acumulación y activación de macrófagos y polimorfonucleares o neutrófilos, induciendo a la liberación de citoquinas y aumentando la respuesta a anticuerpos (Cortés, 2009).

Cuando el quitosano se funcionaliza con grupos funcionales sulfatos ($-SO^3$) se esperan propiedades gelificantes muy similares a quitosano sin la sulfonación, sin embargo, se presentan propiedades anticoagulantes, antimicrobianas y antioxidantes (Islam *et al.* 2012), además la particularidad principal es que tiene una capacidad mimética con el receptor heparán sulfato (HS) que se desempeña en el mecanismo de invasión de distintas infecciones (Bucarey *et al.*, 2017).

Por tanto, se espera que las MPs funcionalizadas con grupos sulfatos tengan una acción de transportador y bioadhesión de mucosas.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Esta tesis se enmarca dentro del proyecto FONDEF ID19110135, el cual se propone desarrollar un sistema de microencapsulación, específico contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, elaborado en base a QS, que presenta un mimetismo con HS, receptor celular del patógeno. Con ello, se espera obtener un efecto quelante específico contra antígenos asociados a la bacteria. Convirtiéndola en una vacuna eficaz contra *Mycoplasma hyopneumoniae* de administración tanto para vía parenteral y vía mucosa.

Cabe recalcar que, con este nuevo sistema de microencapsulación, a futuro, se abren nuevas alternativas de prevención y disminución de impactos económicos de las enfermedades que aquejan los sectores productivos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inmunogenicidad de una vacuna microencapsulada contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inmunizar ratones BALB/c, por dos vías de administración, con antígenos microencapsulados de *M. hyopneumoniae*.
2. Evaluar, en los animales inmunizados, la inducción de anticuerpos específicos contra antígenos asociados a *M. hyopneumoniae* a distintos tiempos post-inmunización por técnica de ELISA indirecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Utilización de roedores

Todo procedimiento general concerniente al trato de los animales (es decir toma de muestras, tratamientos y eutanasia) fueron realizados por Médicos Veterinarios y realizado de acuerdo con lo estipulado en la guía de principios y directrices internacionales para el uso de animales en investigaciones Biomédicas, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas (NRC, 1999).

La supervisión de los ensayos clínicos en ratones, para evaluar posibles efectos secundarios de los compuestos a utilizar, se realizó utilizando como referencia inicial la guía de elección de criterios de punto final para animales de experimentación descritos en la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NRC, 1999).

Para llevar a cabo la evaluación de la inmunogenicidad de una vacuna experimental contra *Mycoplasma hyopneumoniae* se utilizaron 18 hembras adultas de la especie *Mus musculus*, de la cepa BALB/c de ocho semanas de edad, los cuales fueron comprados en el Instituto de Salud Pública (ISP), comuna de Ñuñoa, Chile. Los roedores fueron mantenidos en la unidad de roedores de laboratorio ECOVET (UMA) de 20,8 m², provisto de un extractor de aire con capacidad de 420m³/h, y aire acondicionado de 12.000 BTU, mantenido a 22±2 °C, 50±10 % de humedad y manejo de fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad. Los *M. musculus* fueron divididos en 2 jaulas acrílicas (16,5 x 30 x 12 cm) compartidas por 3 individuos hembras con un peso de 20 a 30 gramos aproximadamente. La jaula consta con sustrato de viruta de madera de 10 cm de profundidad. Tanto el agua como el alimento fueron *ad libitum*, siendo este último preparado comercial Prolab® RMH 3000 Nutrición Constante TM. Se contempló también el uso de trozos de madera, cartones y tubos de PVC, entre otros, para el enriquecimiento ambiental y bienestar de los individuos. La limpieza de los habitáculos se realizó con una frecuencia de una vez por semana, sin remover toda la viruta para mantener olores conocidos.

Los individuos fueron tratados con las formulaciones desarrolladas en el Laboratorio BIOVETEC, utilizando MPS de QC y QS, conjugadas con antígenos asociados a *M. hyopneumoniae* (Figura 1 A y B).

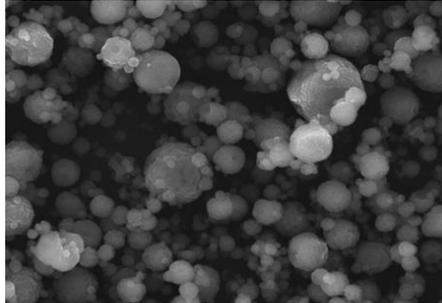


Figura 1A. Microfotografías SEM de QC + *M. hyopneumoniae*. Se observan partículas con diferentes texturas de superficie, se observan partículas con rugosidades y otras con concavidades esferoidales, los tamaños fluctúan entre los 0,5 y 5 μm . Fotografía tomada con microscopio de barrido JEOL modelo JSM-IT300LV acoplado a un detector de energía dispersiva de Rayos X. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

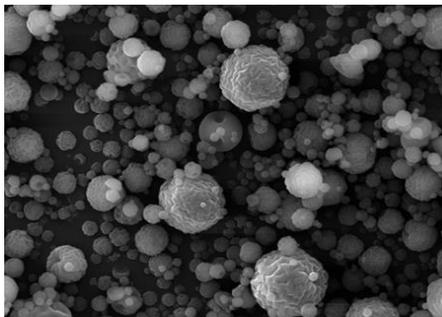


Figura 1B. Microfotografías SEM de QS + *M. hyopneumoniae*. Se muestra coexistencia de partículas esféricas con concavidades de superficie lisa y de superficie rugosa, que poseen tamaños aproximados de 0,75 – 9 μm . Fotografía tomada con microscopio de barrido JEOL modelo JSM-IT300LV acoplado a un detector de energía dispersiva de Rayos X. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Las dosis y vías de administración fueron:

- Vía Intranasal (IN): 20 µl de la suspensión (1 mg / ml), administradas utilizando punta de pipeta de 20 µl, alternando de fosa nasal (Fig. 2).
- Vía Intraperitoneal (IP): 300 µl de la suspensión (1 mg / ml), utilizando jeringas de 1 ml con agujas de 27G (Fig. 3).

El diseño experimental y los distintos tratamientos de inmunización se muestran a continuación (tabla 1).

Tabla 1. Diseño experimental.

GRUPO	Nº ANIMALES	TRATAMIENTO	VIA DE ADMINISTRACION
1	3	Formulación QC10X	Intraperitoneal
2	3	Formulación QS10X	Intraperitoneal
3	3	Formulación QC10X	Intranasal
4	3	Formulación QS10X	Intranasal
5	3	Control positivo 10 µg de bacterina <i>M. hyopneumoniae</i>	Intraperitoneal
6	3	Control negativo PBS	Intraperitoneal

La vacunación y la toma de muestra estuvo guiada bajo supervisión de un médico veterinario con conocimiento en manejo de animales bajo condiciones de laboratorio. Es importante recalcar que no se compartirán los animales con otros proyectos y la manipulación de estos se realizó bajo condiciones que no exponen a sufrimiento innecesario.

La cola fue lavada con una solución antimicrobiana de clorhexidina al 2% para desinfectar el área y ver el vaso sanguíneo. Luego con aguja de 27G estéril se hizo una punción en el área que se ubica desde un tercio a lo largo de la cola, desde la punta de esta, y se colectaron 0,1 ml de sangre mediante tubo capilar (Fig. 4). Una vez tomada la muestra, se limpió la zona inoculada con alcohol 70% y se realizó hemostasis aplicando presión con los dedos sobre la cola durante 30

segundos. La toma de muestra se hizo cada dos semanas desde la primera vacunación hasta completar 4 tomas de muestras, como se muestra a continuación (tabla 2). El suero obtenido fue almacenado a -80°C , hasta su utilización, que se midió la cantidad y tipo de anticuerpos específicos IgG por medio de ELISA indirecto.

Tabla 2. Diseño de inmunización y extracción de muestra

SEMANAS	1	2	3	4	5	6	7	8	11
INMUNIZACIÓN	X			X		X			
TOMA DE MUESTRA	X	X			X		X		X



Fig. 2. Administración de vacunas: Vía Intranasal (IN). Foto tomada en la unidad de roedores del laboratorio ECOVET.



Fig. 3. Administración de vacunas: Vía Intraperitoneal (IP). Foto tomada en la unidad de roedores del laboratorio ECOVET



Fig. 4. Obtención de muestra: Punción de vena de la cola. Foto tomada en la unidad de roedores del laboratorio ECOVET

B. ELISA indirecto: Título de anticuerpos antígeno-específicos contra *M. hyopneumoniae*

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) ocupa una enzima como marcador para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El ELISA indirecto ocupa dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, este último, irá conjugado a la enzima.

Para la determinación de anticuerpos específicos contra *M. hyopneumoniae* en los sueros de animales inmunizados con MPs de QS y QC conjugadas con antígenos en concentración 10X (1 mg/mL), se realizó un ensayo de ELISA indirecto. Se evaluó la inducción de anticuerpos en animales inmunizados con MPs, en dos vías de administración diferentes, con la finalidad de determinar el comportamiento inmunogénico de las ratas.

Este tipo de método tiene diferentes pasos los cuales, a grandes rasgos, son los siguientes: Primeramente, se debe fijar el antígeno a la placa. Posteriormente se bloquean los sitios activos remanentes. Luego se añade el anticuerpo primario que se va a unir al antígeno formando el "Complejo antígeno-anticuerpo". Más tarde se debe añadir el anticuerpo secundario, el cual se debe unir al complejo mencionado anteriormente. Para finalizar se debe añadir un sustrato que hará reaccionar a la enzima generando cambios de color visibles y permitir la cuantificación y detección del antígeno de interés.

Por lo tanto, para este propósito, se utilizaron placas de ELISA sensibilizadas con antígenos totales de *M. hyopneumoniae*. Para este procedimiento, se diluyó 400 µg/mL de antígenos de *M. hyopneumoniae* en tampón de cobertura (50mM Na₂CO₃, 50mM Na₂HCO₃). Luego se dispuso 50 µL en cada pocillo de la placa de microtitulación de 96 pocillos, y se cubrió con parafilm para incubar toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 200 µL de buffer de lavado (PBS, Tween 20 0,05%) por pocillo y se bloqueo los sitios de unión inespecíficos adicionando 200 µL de tampón de bloqueo por pocillo (leche descremada 5% en PBS, Tween 20 0,05%), cubriendo, posteriormente, con parafilm e incubando dos horas a 4°C. A continuación, se realizaron cuatro lavados con 200 µL de buffer de lavado por pocillo. Posteriormente se utilizó los sueros de los ratones, disponiendo cada una de las muestras en triplicado en una dilución de 1:500 µL en una solución

de dilución (leche descremada 0,5% en PBS, Tween 20 0,05%), incubándolas a 37°C durante dos horas. Como control negativo se utilizaron pocillos sin el anticuerpo primario (suero de ratones) y como control positivo suero de ratones inmunizados con 10 µg de bacterina de *M. hyopneumoniae*. A continuación, se realizaron cuatro lavados con 200 µL de buffer de lavado por pocillo. Posteriormente se procedió a incubar las placas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL, UK) en una dilución 1:2500 en tampón de bloqueo. La placa se incubó por dos horas a 37°C. Luego, se realizan cuatro lavados con buffer de lavado. Para el revelado de la unión del complejo antígeno-anticuerpo, se utilizó el “kit” 1-Step™ Turbo TMB-ELISA (ThermoScientific, USA), el cual contiene un sustrato (3,3',5,5' tetrametilbenzidina, TMB) para la peroxidasa de rábano (HRP). Se adicionaron 50 µL de solución de sustrato por pocillo y se incubó por 5 minutos a 37°C hasta la aparición de la coloración (Fig. 4). Finalmente, se detuvo la reacción con 50 µL por pocillo de solución de parada (1M H₂SO₄) .Los valores de la absorbancia se midieron a 450 nm, usando el equipo “Microplate Reader” modelo 3550 (Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA).

C. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico se realizó usando el software Prism - GraphPad™. La distribución normal de las variables en cada grupo y tratamiento fue evaluada por medio del ANOVA de medidas repetidas que estudia el efecto de una misma revisión repetida en el tiempo.

RESULTADOS

A. Observación de efectos adversos

A los 10 minutos inoculados los roedores con QC vía IP, presentaron decaimiento general con síntomas evidentes de dolor en los tres roedores, con muecas de dolor severo y posición cifótica.

A partir del día 22 del ensayo (al día siguiente del primer refuerzo), los grupos de animales que fueron inoculados vía intraperitoneal con MPs de QC presentaron lesiones corporales en el sitio de inoculación.

En la figura 5 se muestran las imágenes de los individuos que recibieron tratamiento con MPs de QC vía IP. Un individuo presentó una lesión grave y otro una lesión leve, coincidentes con dermatitis necrótica de aspecto alopecico y costroso. Sólo un individuo inoculado con MPs de QS intraperitoneal presentó solo una lesión leve.

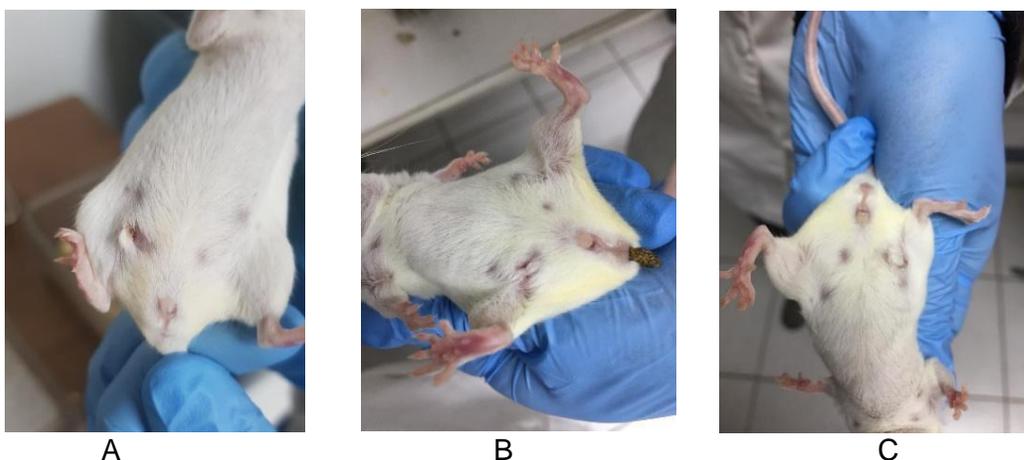


Fig. 5. Lesiones post-inoculación con MPs de QC IP. **A:** Lesión grave con QC a los 22 días, **B:** Lesión grave con QC a los 27 días, **C:** Lesión leve con QC a los 22 días.

A los 23 días de la primera inoculación se evidenció una leve irritación nasal en dos animales inoculados vía IN con QC (Fig. 6).



Fig. 6. Lesiones post-inoculación con MPs de QC IN.

Complementariamente, se realizaron mediciones en la temperatura corporal y consumo de alimento sin evidenciar cambios representativos debido a las inoculaciones.

La variación del consumo diario de alimentos no demostró ninguna correlación respecto el tiempo medido en días (Pearson r 0,01428 para QS IP; -0,3047 para QC IP; -0,5804 para QS IN; -0,02746 para QC IN). Este consumo varió entre 6,9 y 16,2 gramos diarios.

B. Análisis de inmunogenicidad

Los resultados obtenidos en la experimentación fueron sometidos al software Prism - GraphPad™. En este programa se realizó el análisis estadístico usando el método Shapiro Wilk para determinar una distribución normal y además se utilizó el método de Turkey para comparar los diferentes resultados de las concentraciones de anticuerpos en los diferentes grupos.

Cabe destacar que dentro de estos análisis se desecharon aquellos ELISA indirectos que no presentan una distribución normal y los que se contaminaron por la manipulación durante este proceso de experimentación.

Para poder analizar todos estos resultados se debe conocer que se tomó como referencia la tabla N°2 “Diseño y extracción de muestras”. En donde en el eje x se destaca la vacunación a la primera semana, el primer refuerzo en la semana 4 y el último refuerzo en la semana 6.

Es por este motivo que uno de los primeros análisis obtenidos es el que se representa en el gráfico N°1 en donde se observa la variación de absorbancia medida a 450 nm de los grupos QC administrado por vía IN (QC IN) y el grupo control negativo (Grupo control -).

Los resultados muestran que la formulación QC IN presenta una mayor absorbancia que el grupo control negativo. Además entre ambos grupos hay diferencia significativa ($p < 0.0001$).

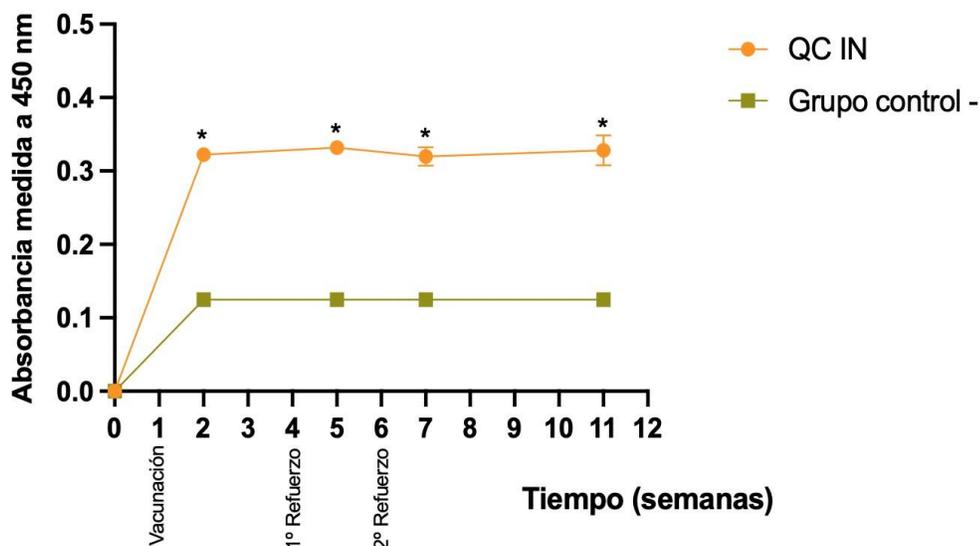


Gráfico N°1. Resultado de la absorbancia de ELISA indirecto *Mycoplasma hyopneumoniae* incubado con anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL, UK); los sueros se utilizaron a una dilución de 1:500 μ L. Se compara el grupo QC IN y grupo control -. El símbolo (*) indica que hay diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.0001$).

Por otro lado, también se midió la absorbancia del grupo QS con vía de administración IN (QS IN) y el grupo control negativo (Grupo control -), y los análisis muestran diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.0001$).

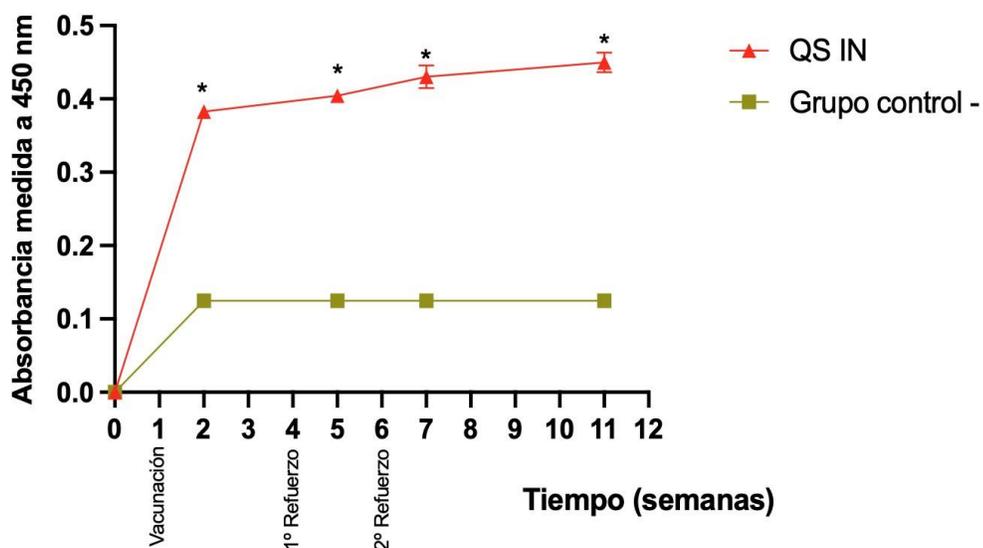


Gráfico N°2. Resultado de la absorbancia de ELISA indirecto *Mycoplasma hyopneumoniae* incubado con anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL, UK); los sueros se utilizaron a una dilución de 1:500 μ L. Se compara el grupo QS IN y grupo control -. El símbolo (*) indica que hay diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.0001$).

En función de comparar las formulaciones mencionadas anteriormente, se realizó un análisis de varianza con los siguientes grupos: formulación QC vía IN (QC IN) y QS vía IN (QS IN). Los resultados obtenidos son los que se muestran con el gráfico N°3, en donde en cada medición se presenta una diferencia significativa cuando se comparan ambos grupos ($p < 0.0001$).

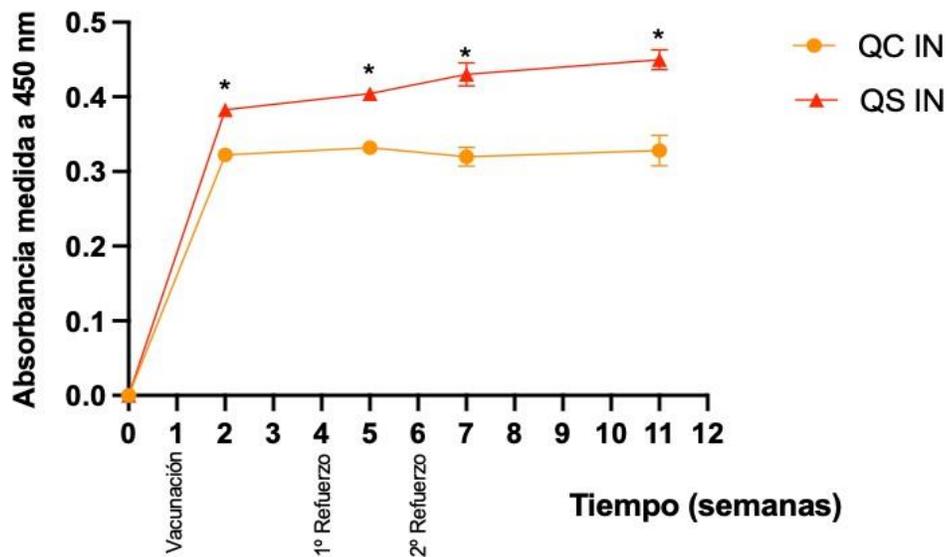


Gráfico N°3. Resultado de la absorbancia de ELISA indirecto *Mycoplasma hyopneumoniae* incubado con anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL,UK); los sueros se utilizaron a una dilución de 1:500 μ L. Se compara el grupo QC IN y el grupo QS IN. El símbolo (*) indica las mediciones con diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre ambos grupos.

Otra medición es la obtenida en el gráfico N°4, el que muestra la absorbancia obtenida en el grupo QC con administración IP (QC IP) y con control

negativo (Grupo control -). Cuando se comparan estos dos grupos, presentan diferencias significativas ($p < 0.0001$).

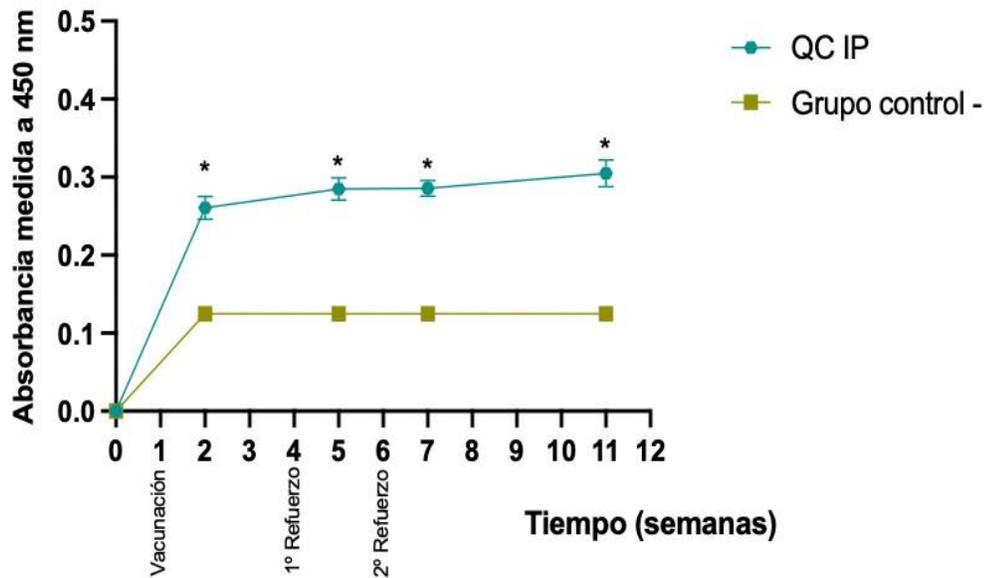


Gráfico N°4. Resultado de la absorbancia de ELISA indirecto *Mycoplasma hyopneumoniae* incubado con anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL,UK); los sueros se utilizaron a una dilución de 1:500 μ L. Se compara el grupo QC IP y grupo control -. El símbolo (*) indica las mediciones con diferencias significativas ($p < 0.0001$) respecto al control.

El gráfico N° 5 compara la absorbancia del grupo QS con vía de administración IP (QS IP) y el grupo control negativo, dando como resultados diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.0001$).

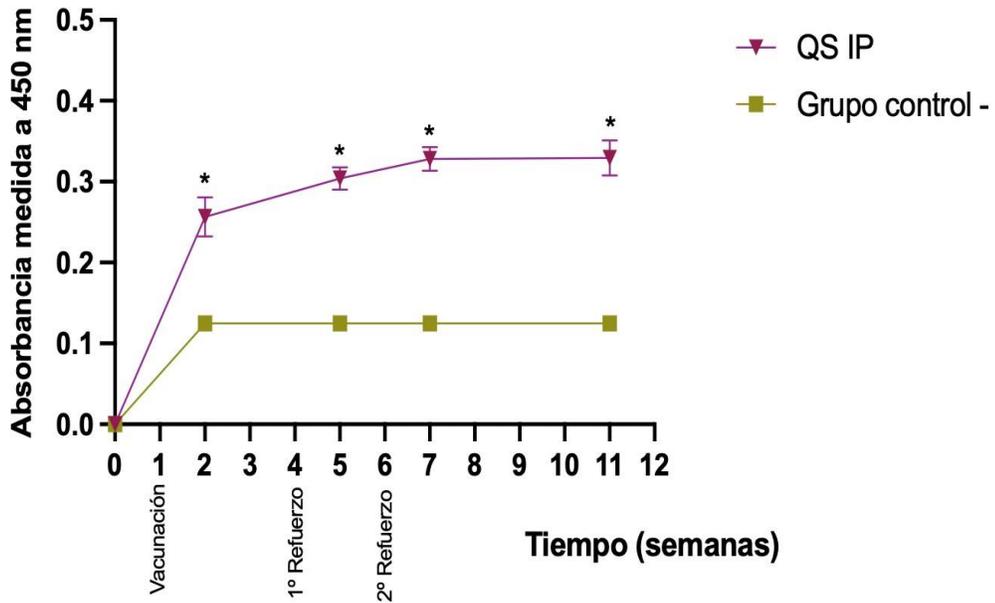


Gráfico N°5. Resultado de la absorbancia de ELISA indirecto *Mycoplasma hyopneumoniae* incubado con anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL,UK); los sueros se utilizaron a una dilución de 1:500 μ L. Se compara el grupo QS IP y grupo control -. El símbolo (*) indica las mediciones con diferencias significativas ($p < 0.0001$) respecto al control.

El último análisis es para comparar las formulaciones con la misma vía de administración. Se utilizan los grupos QC vía IP (QC IP) y grupo QS vía IP (QS IP). Es importante destacar que la única medición que presenta diferencia significativa entre los grupos es la correspondiente a la semana 7 ($p < 0.0007$).

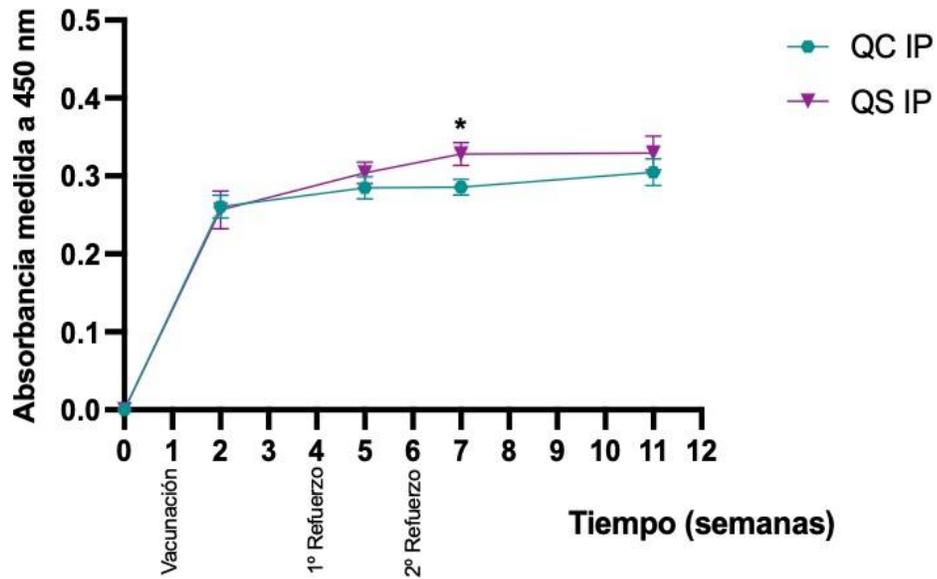


Gráfico N°6. Resultado de la absorbancia de ELISA indirecto *Mycoplasma hyopneumoniae* incubado con anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL,UK); los sueros se utilizaron a una dilución de 1:500 μ L. Se compara el grupo QC IP y QS IP. El símbolo (*) indica las mediciones con diferencias significativas ($p < 0.0007$) entre ambos grupos.

DISCUSIÓN

En esta memoria, se evaluó, en modelo murino, la inmunogenicidad de un prototipo de vacuna MPs contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Las variables críticas estudiadas corresponden a la medición del título de anticuerpos antígeno-específicos, en ratas BALB/c, tras la administración de MPs de QS y QC conjugadas con antígenos *Mycoplasma hyopneumoniae*, por vía IP e IN, bajo dos formatos distintos.

Las pruebas realizadas corresponden a análisis ELISA indirecto para evaluar la inducción de anticuerpos específicos contra dicho antígeno. Además, dado que se encontraron efectos adversos posterior a las inoculaciones, se evaluó la presencia de lesiones en el sitio de inyección, la temperatura corporal y el consumo de alimento de estos roedores.

En la actualidad hay diversos proyectos que buscan crear vacunas comerciales para animales de producción con el fin de controlar ciertos patógenos que implican pérdidas económicas para esta industria. Y en las producciones porcinas se ha buscado alternativas de vacunación vía no parenteral como la oral o nasal para reducir los gastos asociados al personal e insumos y con ello la reducción de incidencia de enfermedades.

Es por esto que a lo largo de los años los investigadores se han enfocado en encontrar moléculas adyuvantes de vacunas que estimulan el sistema inmunitario de la mucosa de forma apropiada (Islam *et al.*, 2012). Una de las claves para el éxito de una formulación vía mucosa es generar una correcta inmunogenicidad asegurando la llegada del antígeno al sitio de acción, proteger al antígeno de la degradación enzimática del aparato mucociliar y que este sea capaz de estimular al tejido linfoide asociado a nasofaringe (TLAN) (CAV, 2021). Los resultados de este proyecto muestran que hay diferencias significativas en la administración vía IN comparado con el grupo control (gráfico N°1), esto podría deberse a la correcta formulación del adyuvante de vacuna logrando que el antígeno sea captado por las células M del TLAN para así generar una respuesta inmune específica que sea significativa.

Otros resultados obtenidos en este proyecto demuestran que la formulación QS presenta mayor inducción de anticuerpos específicos contra *M. hyopneumoniae* que la formulación QC (gráfico N°3), manifestando un aumento significativo del título de anticuerpos en el tiempo, el cual fue potenciado con la administración de un refuerzo a las semanas cuatro y seis. Esto podría deberse a que este polímero sulfatado cumple con ciertas características que lo identifican como un buen vehículo de este modelo de vacunas. Cuando al quitosano se le añade el grupo sulfato, este presenta un mimetismo estructural con el receptor heparán sulfato (HS) (Bucarey *et al.*, 2017), generando un efecto quelante, caracterizado por tener una liberación más lenta y controlada del antígeno en el sitio de acción, reclutamiento y acción tanto de macrófagos como células dendríticas, presentación del antígeno, activación de citoquinas y modulación de la respuesta del sistema inmunológico (Gálvez, 2017), dando como resultado vacunas con respuestas más rápidas, fuertes y de mayor duración en el tiempo (Islam *et al.*, 2012).

Paralelamente, con el objetivo de evaluar la seguridad de estas formulaciones vacunales vía IP, se evidenciaron efectos adversos asociados al QC (dermatitis necrótica), pero no así al utilizar QS. Con respecto al consumo diario de alimento y temperatura corporal, estas variables, no marcaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ensayados. Por tanto, en este estudio, se evidencia que al funcionalizar el quitosano, el QS proporciona un sistema seguro de vacunación, sin efectos adversos y generando respuesta antigénica.

Un punto importante de destacar en el ámbito de la seguridad de este modelo de vacuna, es que la vía de administración IN generó una leve irritación en fosas nasales con la formulación QC, pero no hubo efectos secundarios en formulación QS, lo que demuestra que al funcionalizar el quitosano proporciona un modelo seguro de vacuna para una entrega controlada de antígenos a nivel de mucosas, y por tanto esto sería una buena alternativa y estrategia para inducir anticuerpos vía nasal.

Estos resultados demostraron que es factible utilizar MPs como sistema simple y seguro para la entrega de antígenos de *M. hyopneumoniae*, y de esta manera, su administración, vía inyectable y nasal, puede ser una estrategia efectiva para inducir altos títulos de anticuerpos contra dichos antígenos.

Esta premisa podría ser de gran utilidad para generar nuevas tecnologías utilizando MPs de QS para vacunas con vías de administración alternativas.

CONCLUSIONES

- Es factible utilizar micropartículas de quitosano sulfatado como sistema simple y seguro para la entrega de antígenos de *M. hyopneumoniae*.
- Todos los grupos de roedores que fueron inmunizados con la formulación de micropartículas de quitosano sulfatado conjugadas con el antígeno, en distintos formatos, fueron capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos contra *M. hyopneumoniae*.
- Entre todos los formatos probados, la formulación con quitosano sulfatado con ruta de administración vía intranasal fue capaz de inducir la formación de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* de forma más eficiente.

BIBLIOGRAFÍA

ANDRADA, M.; RODRIGUEZ, F.; RAMIREZ, G.; SARRADELL, J.; LORENZO, H. 2004. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Comp Pathol. vol. 130 (4): 306- 312.

ANDRADE, G.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.; YOSHIHARA, E.; KANO, F.; AMARAL, C. 2001. Seroprevalence of marginale in dairy cattle and studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. RevBrasParasitolVet. vol. 21 (3): 342- 344.

BRANDAN, N.; AQUINO, J.; CODUTTI, A. 2007. Respuesta inmunitaria. Corrientes, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste, Fac Medicina, Depto. Cs de la salud. 19 p.

BUCAREY, S.; NEIRA-CARRILLO, A.; NEIRA, V. 2017. Vaccine for treating and controlling infectious pathologies that use heparan sulphate (HS) as a cell receptor. International patent WO2017075730 (050058).

CALSAMIGLIA, M.; COLLINS, J.; PIJOAN, C. 2000. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. VetMicrobiol. 76(3):299-303.

CAMPOS-GRANADOS, C. 2014. El sistema inmune de los mamíferos: Las defensas del cuerpo. Nutrición animal tropical 8(1): 80-93.

CENTENO, N., OCHOA, J.; OBREGÓN, L.; RUÍZ, F.; CHÉVEZ, J.; SCHAGEMANN, G.; PÉREZ, C.; MALAGÓN, G.; GUZMÁN, H. 2019. Evaluación de dos programas de vacunación contra el virus de PRRS (PRRSV), PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* en un sistema de producción de cerdos en México: Estudio de campo. [en línea]<<https://www.porcicultura.com/destacado/Evaluacion-de-dos-programas-de-vacunacion-contra-el-virus-de-PRRS-%28PRRSV%29%2C-PCV2-y-Mycoplasma-Hyopneumoniae-en-un-sistema-de-produccion-de-cerdos-en-Mexico%3B-Estudio-de-campo>> [consulta: 13/07/2021].

- COMITÉ ASESOR DE VACUNAS.** 2021. Inmunología y vacunas. **In:** Manual de vacunas en línea de la Asociación Española de Pediatría. <<https://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-47#5.5>> [consulta: 19-02-2022].
- CORTÉS, M.** 2009. Determinación de la inmunogenicidad provocada por quitosano como adyuvante en un modelo de vacuna peptídica anti-GnRH. Tesis Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Fac Cs Veterinarias y Pecuarias. 50 p.
- ESPINOSA, I.; MARTINEZ, S.** 2008. *Pasteurellamultocida*, *Bordetellabronchiseptica* y *Streptococcussuis* en el complejo respiratorio porcino. Rev Salud Animal. vol. 30 (3):137-145.
- ESPINOSA-CAVAZOS, K.; SAENZ, A.; CASTAÑEDA, A.** 2019. Películas de quitosano propiedades y aplicaciones. Coahuila, México. Universidad Autónoma de Coahuila. 6 p.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 2014. Porcilis PCV M Hyop (vacuna de circovirus porcino y *Mycoplasma hyopneumoniae*, inactivado). [en línea] <https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/porcilis-pcv-m-hyo-epar-medicine-overview_es.pdf> [consulta: 06/10/2021].
- FLORES, J.; CALLE, S.; FALCÓN, N.; TORRES, M.; MORALES, S.; ACOSTA, F.** 2006. Evaluación de una bacterina de dosis única contra *Mycoplasma Hyopneumoniae* en porcinos de madres no vacunadas. Rev. investig. vet. Perú. vol. 17 (2): 1-6.
- GÁLVEZ, C.** 2017. Comparación de la bioadhesion in vitro de micropartículas (MP) de quitosano sulfatado (QS), tiolado (QT) y comercial (QC) en monocapas de cultivos celulares. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. Medicina Veterinaria, U de Chile. 54 p.
- GARCÍA, B.; SEGALÉS, J.; FRAILE, L.; PÉREZ, A.; MAITI, H.; COLL, T.; SIBILA, M.** 2015. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using different lung lesion scoring systems: A comparative review. J CompPathol. vol. 154 (2): 125-134.

GUTIÉRREZ, C. 2014. La pleuroneumonía en el contexto del complejo respiratorio porcino. **In:** Discurso en recepción pública como Académico Correspondiente. León, España. 9 abril de 2014. Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León. pp. 16-38.

ISLAM, M.; FIRDOUS, J.; CHOI, Y.; CHO, CH. 2012. Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 6077-6093.

NATHUES, H.; BEILAGE, E.; KREIENBROCK, K.; ROSENGARTEN, R.; SPERGSEER, J. 2011. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vetmicrobiol*. vol. 152 (3-4): 338- 345.

NEIRA, V. 2012. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Circovirus porcino tipo 2* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en plantales de producción intensiva de cerdos en Chile. Tesis doctoral. Concepción, Chile. Ciencias Veterinaria Universidad de Concepción.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES. 1999. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 8ª ed. Ediciones UC. Washington DC, USA. 260 p.

RAMÍREZ, A. 2017. Pérdidas de producción asociadas al PRRS y medidas de erradicación [en línea] <<https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/13366/perdidas-de-produccion-asociadas-al-prrs-y-medidas-de-erradicacion.html>> [consulta: 13/07/2021].

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2021. Registro vacunas contra patógenos asociados al CRP. [en línea] <<https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/registro-de-productos-farmaceuticos-de-uso-veterinario/1770/registros>> [consulta: 18/10/2021].

SIBILA, M.; CIPRIÁN, A.; ARAGÓN, V.; DEREU, A.; SEGALÉS, J. 2014. Prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) samples in live animals with and without respiratory problems. **In:** Proceedings 23th International Pig Veterinary Society. Cancún, México. 8-11 Junio 2014. P. 98.

THACKER, E. 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Anim Health Res Rev. vol. 5 (2): 317- 320.

TIZARD, I. 2009. La defensa del organismo. **In:** Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ª ed. Elsevier. Barcelona, España. pp: 1-10.

THACKER, E.; THACKER, B.; JANKE, B. 2019. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. Vet microbiol. vol 231: 18- 23.

VILLARREAL, I. 2010. Epidemiology of *M. hyopneumoniae* infections and effect of control measures. Thesis Doctor of Veterinary Science (PhD). Faculty of Veterinary Medicine. Ghent University. 221p.

VILLARREAL, I.; MEYNS, T.; DEWULF, J.; VRANCKX, K; CALUS, D.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; MAES, D. 2011. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. Theveterinaryjournal. vol.188 (1): 48- 52.