



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 ASOCIADOS A *Mycoplasma hyorhinis*.**

**BELÉN ALMENDRA SOTO CASTRO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico  
Veterinario Departamento de  
ciencias biológicas.

PROFESOR GUÍA: SERGIO BUCAREY VIVANCO

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDEF ID19I10135

SANTIAGO, CHILE

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 ASOCIADOS A *Mycoplasma hyorhinis*.**

**BELÉN ALMENDRA SOTO CASTRO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico  
Veterinario Departamento de  
ciencias biológicas.

Nota Final .....

Prof. Guía  
Profesor Corrector  
Profesor Corrector

SERGIO BUCAREY VIVANCO  
ANDRÓNICO NEIRA CARRILLO  
VÍCTOR NEIRA

Firma .....  
Firma .....  
Firma .....

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDEF ID19I10135

SANTIAGO, CHILE

2022

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradecer a mi mamá y papá por el apoyo incondicional durante todos mis procesos, por siempre creer y confiar en mí. A mi familia por brindarme su cariño y amor.

A Christopher, mi gran compañero, por animarme, apoyarme, escucharme y contenerme en cada momento.

A Mariela por acompañarme y apoyarme durante todos estos años y sobre todo en este último tiempo.

A María José mi amiguita de la universidad, la mejor compañera de estudio y trabajos, gracias por su compañerismo, cariño y apoyo durante todos estos años de carrera, sobre todo en el desarrollo de este proyecto, sin su ayuda hubiera sido todo mucho más difícil.

A mi profesor guía, el Dr. Sergio Bucarey por entregarme su apoyo y confianza para realizar este proyecto. Por la ayuda, las correcciones y el tiempo entregado.

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO	7
PATÓGENO	8
I. Patogenia	9
II. <i>M. hyorhinis</i>	10
a) Características generales	10
b) Epidemiología	12
c) Presentación clínica	13
d) Diagnóstico	14
INMUNIDAD	15
I. Linfocitos	17
II. Inmunidad del cerdo	18
VACUNAS	19
I. Quitosano	20
II. Quitosano Sulfatado (QS)	22
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
I. Protocolo y manejo de <i>Mus musculus</i>	25
II. Medición del título de anticuerpos antígeno-específicos contra <i>M. hyorhinis</i>	31
ELISA Indirecto	31
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	33

I. Observación de efectos adversos	33
II. Medición de inmunogenicidad	34
III. Análisis estadísticos	34
Resultados	35
a) Resultados obtenidos de los grupos QCIN/QSIN:	35
b) Resultados obtenidos de los grupos QCIP/QSIP:	37
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	44
ANEXOS	45
BIBLIOGRAFÍA	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Diseño experimental.....	29
<b>TABLA 2.</b> Diseño de inmunización y extracción de muestras.....	30
<b>TABLA 3.</b> Test RM-ANOVA 2 way del grupo QCIN.....	45
<b>TABLA 4.</b> Múltiples comparaciones del grupo QCIN.....	45
<b>TABLA 5.</b> Test RM-ANOVA 2 way del grupo QSIN.....	45
<b>TABLA 6.</b> Múltiples comparaciones del grupo QSIN.....	45
<b>TABLA 7.</b> Test RM-ANOVA 2 way de los grupos QCIN y QSIN.....	45
<b>TABLA 8.</b> Múltiples comparaciones de los grupos QCIN y QSIN.....	46
<b>TABLA 9.</b> Test de Friedman del grupo QCIP.....	46
<b>TABLA 10.</b> Múltiples comparaciones del grupo QCIP.....	46
<b>TABLA 11.</b> Test de Friedman del grupo QSIP.....	46
<b>TABLA 12.</b> Múltiples comparaciones del QSIP.....	46



## RESUMEN

La producción porcina se ve afectada por una enfermedad multifactorial llamada "Complejo Respiratorio Porcino" (CRP) que genera graves pérdidas económicas. En esta enfermedad participan diversos patógenos primarios y secundarios, uno de éstos es el agente secundario *Mycoplasma (M.) hyorhinis*. Éste se ha convertido en un patógeno de gran interés de estudio debido a que ha sido comúnmente detectado en lechones con CRP.

A pesar de que en el mercado existen diversas vacunas para combatir los diferentes patógenos del CRP, no existen vacunas contra *M. hyorhinis*, quedando los animales expuestos a este patógeno.

Para esta memoria de título se evaluó la inmunogenicidad de una vacuna experimental microencapsulada con quitosano, conjugadas con antígenos de *M. hyorhinis*, en modelo murino. Para esto, se utilizaron dos formulaciones, una con micropartículas (MPs) de quitosano comercial (QC) conjugada con antígenos de *M. hyorhinis*; y otra con MPs de quitosano sulfatado (QS) conjugada con antígenos del mismo patógeno. Se utilizó la especie *Mus musculus*, cepa BALB/c (n=18), y se inoculó por dos vías de administración, la vía intranasal (IN) y la vía intraperitoneal (IP). Para las mediciones de título de anticuerpos antígeno-específico contra *M. hyorhinis* se montó un ensayo ELISA indirecto casero. En el análisis estadístico de los resultados se utilizó el software Prism-GraphPad™, en donde los datos fueron sometidos a pruebas de distribución normal para luego ser analizadas con el test de ANOVA de medidas repetidas o el test de Friedman, según correspondiera.

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

Los principales resultados encontrados fueron que la formulación de MPs de QS con aplicación IN fue capaz de inducir anticuerpos específicos contra antígenos de *Mycoplasma hyorhinis* 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. hyorhinis* y de esta manera, la administración vía mucosa nasal puede ser una estrategia efectiva para inducir altos títulos de anticuerpos contra este patógeno.

## ABSTRACT

Swine production is affected by a multifactorial disease called "Porcine Respiratory Complex" (PRC) that generates important economic losses. Various primary and secondary pathogens participate in this disease, one of which is the secondary agent *Mycoplasma hyorhinis*. This has become an important pathogen because it has been commonly detected in pigs with PRC.

Although there are several vaccines on the market to combat the different PRC pathogens, there are no vaccines against the *M. hyorhinis*. Therefore, pigs are exposed to be infected.

For this title memory, the immunogenicity of an experimental vaccine microencapsulated with chitosan, conjugated with *M. hyorhinis* antigens, was evaluated in a murine model. For this, two formulations were used: one with microparticles (MPs) of commercial chitosan (QC) conjugated with *M. hyorhinis* antigens; and another with MPs of sulfated chitosan (QS) conjugated with antigens of the same pathogen. The species *Mus musculus*, strain BALB/c (n=18) was used, and it was inoculated by two routes of administration, the intranasal route (IN) and the intraperitoneal route (IP). For measurements of antigen-specific antibody titer against *M. hyorhinis*, an indirect ELISA assay was set up. In the statistical analysis of the results, the Prism-GraphPad™ software was used, where the data were subjected to normal distribution tests and then analyzed with the ANOVA test of repeated measures or the Friedman test, as appropriate.

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 hyorhinis* antigens more efficiently than the QC MPs formulation, showing a significant increase in antibody titer over time, which it was boosted 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. Simultaneously, when the safety of these vaccine formulations in IP form was evaluated, adverse effects associated with QC were observed, causing necrotic dermatitis, but this did not happen with the QS formulation. Regarding 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 the delivery of *M. hyorhinis* antigens and, in this way, administration via the nasal mucosa can be an effective strategy to induce high titers of antibodies against this pathogen.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existe un gran consumo de carnes, siendo de preferencia el consumo de carne de cerdo. En América Latina, el consumo de dicha carne ha aumentado con rapidez en los últimos años, debido a una mayor producción interna, una mejora en la calidad y precios relativamente favorables. Un ejemplo de esto es Chile, donde en el año 2020 la Asociación Gremial de Productores de Cerdos de Chile (ASPROCER) menciona que el consumo per cápita de carne de cerdo es de 13,8 kg, equivalente a un 19% del consumo total de carnes. En el año 2018 y 2019 Chile ocupó el 5º puesto como exportador mundial de carne de cerdo, alcanzando para el año 2020 un aumento en un 25% en toneladas y 39% en valor.

Este mercado se ve afectado por enfermedades que generan un gran impacto negativo por las graves pérdidas económicas a los productores de la industria porcina de todo el mundo. Los responsables de esto son patógenos como virus, bacterias y/o parásitos, dentro de estos agentes se encuentran los responsables del Complejo Respiratorio Porcino (CRP). El CRP es un proceso dinámico de naturaleza multifactorial, que frecuenta las empresas porcinas intensivas. Causa graves pérdidas por los daños en los tejidos del sistema respiratorio de los animales afectando su fisiología, generando alta morbilidad y mortalidad en varias etapas del ciclo de vida del animal, sobre todo en cerdos de recría y engorda. Dentro de los factores importantes que interactúan en la aparición de este complejo son los factores ambientales (temperatura, concentración de amoníaco, ventilación), estado inmunológico del hospedero y la virulencia de diversos agentes infecciosos, tales como Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV), *Mycoplasma spp.*, entre otros.

Distintas especies de *Mycoplasma*, con especificidad de hospedero porcino, han sido altamente prevalentes y persistentes en los planteles porcinos a nivel mundial, e incluso, se han encontrado infecciones concomitantes entre estos agentes en la mayoría de los animales que presentan signos clínicos asociados a CRP. Dentro del género *Mycoplasma*, se encuentra la especie *Mycoplasma hyorhinis*, que es responsable de cuadros de poliserositis, neumonía y artritis en los lechones, el cual recientemente se ha considerado como un patógeno ubicuo del tracto respiratorio alto en cerdos, importante en cerdos recién destetados, y

concomitante a otras infecciones como *Mycoplasma hyopneumoniae*, sin embargo, no se ha establecido el papel exacto que cumple en la etiología del CRP.

En la actualidad existen diferentes tipos de vacunas con diferentes tecnologías. Se encuentran las vacunas vivas modificadas que estimulan la inmunidad humoral como la celular de una manera más potente y prolongada. Por otro lado, están las vacunas inactivadas, éstas son más seguras puesto que no tienen riesgo de virulencia específica, sin embargo, poseen una eficiencia y duración menor, sobre todo la relativa a la inmunidad celular. Debido a lo anteriormente mencionado, se les añade un adyuvante para aumentar la duración y la exposición antigénica. Un ejemplo de esto es el quitosano, un polisacárido de origen natural, que se caracteriza por tener la capacidad de bioadhesión. De esta manera potencia la absorción de los antígenos mediante su utilización como micropartículas. La vacunación es esencial para el control del CRP, y en el mercado nacional e internacional se cuenta con vacunas comerciales para combatir patógenos del CRP (principalmente PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*). Sin embargo, no existen en el mercado vacunas contra *M. hyorhinis*, dejando así a estos animales expuestos a la infección por este patógeno.

Por todo lo planteado anteriormente, es necesario la elaboración de un eficiente y nuevo modelo de vacuna cuya tecnología permita prevenir el contagio y persistencia de este agente en los planteles porcinos.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO

El CRP corresponde en la actualidad a uno de los cuadros clínicos más complejos, importantes y de mayor repercusión negativa en la producción de cerdos a nivel internacional. El CRP es muy frecuente en las explotaciones intensivas de esta especie animal, causando grandes pérdidas económicas a los productores debido a la ineficiencia en la conversión del alimento, lo que se traduce en un retraso de la ganancia de peso en el tiempo (Gutiérrez, 2014).

El CPR es una de las principales causas de problemas respiratorios, se producen daños en los tejidos y funcionamiento del sistema respiratorio, generando alta morbilidad y mortalidad en varias etapas de la vida del cerdo, sobre todo en animales en desarrollo y engorda con mayor incidencia entre las 12 a 20 semanas de edad (Velasco, 2012). Se trata de un proceso complejo multifactorial, donde se ven involucrados factores como las condiciones ambientales, el estado inmunitario del animal, la alimentación de estos y las diferentes interacciones entre patógenos primarios y secundarios, donde la mayor parte de éstos pueden formar parte de la microbiota normal del tracto respiratorio (Ayllón *et al.*, 2019).

Los agentes primarios como: *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, PCV2, son los que se instalan inicialmente en el sistema respiratorio del cerdo provocando las primeras lesiones y generando la infección. Estos predisponen una co-infección con patógenos secundarios que se encuentran en la flora bacteriana del epitelio respiratorio como saprofitos y que aprovechan el desequilibrio para generar mayor daño y complicar los signos de la enfermedad. En los agentes secundarios podemos encontrar *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, entre otros (Zhang, 1994; Brockmeier *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2019).

El aparato respiratorio dispone de una serie de mecanismos de defensa que lo protegen de agresiones externas. El aparato mucociliar lo constituyen los cilios de las células epiteliales, además de las secreciones de las células caliciformes y las glándulas serosas y mucosas de la lámina propia-submucosa. El aparato mucociliar también tiene la función de transportar mediadores de inmunidad específica como IgA e IgM, e inespecíficas con efectos bactericidas y bacteriostáticos, como la lisozima y la  $\beta$ -lisina. La zona nasofaríngea filtra y elimina

las partículas de hasta 10  $\mu\text{m}$ . Por su parte, la zona traqueo-bronquial filtra partículas de entre 10 y 2.5  $\mu\text{m}$  y la zona pulmonar (bronquios y sacos alveolares) puede permitir el paso de partículas de hasta 0.65  $\mu\text{m}$ . Todas estas partículas son eliminadas por el aparato mucociliar. La mayoría de las bacterias que pueden provocar CRP tienen un tamaño entre 0.5 – 2.0  $\mu\text{m}$ , por lo que el aparato respiratorio debe disponer de otros mecanismos de defensa, como macrófagos pulmonares y la secreción de citocinas y quimiocinas (Ayllón *et al.*, 2019).

El mecanismo de la enfermedad respiratoria porcina comienza con un evento estresante como por ejemplo el transporte, alimentación o ambiente inadecuados. Estas condiciones afectan a las defensas naturales de epitelios, las funciones celular, etc. Debido a la disminución de las defensas, ocurre una infección viral, la cual frecuentemente corresponde a infecciones mixtas. Esta invasión viral compromete las defensas inmunitarias y no inmunitarias favoreciendo a la infección bacteriana, causando finalmente una neumonía severa (Ayllón *et al.*, 2019).

## **PATÓGENO**

El género *Mycoplasma spp* pertenece a la clase *Mollicutes*, se caracterizan por ser bacterias de tamaño pequeño (0,3 a 0,8  $\mu\text{m}$ ), esféricas y carentes de pared celular. Debido a la ausencia de pared celular, esta clase de bacterias presenta varias características específicas, tales como alta sensibilidad al estrés osmótico, a la desecación y a los detergentes y resistencia a los antibióticos cuya diana se encuentra en la síntesis de peptidoglicanos (betalactámicos y glicopéptidos) (Rosales, 2013; García, 2013).

Los microorganismos pertenecientes a la clase *Mollicutes* se distinguen desde el punto de vista genético de otras bacterias por poseer genomas pequeños (580 - 220 Kb) y un contenido bajo de guanina y citosina (23 - 41%) en su ADN genómico. Presentan un bajo número de genes (entre 600 - 700), capaces a su vez de sintetizar aproximadamente unas 400 proteínas. Esta reducida capacidad metabólica hace que los *Mollicutes* lleven una forma de vida de tipo parasitario (Rosales, 2013). Poseen una membrana plasmática trilaminar, citoplasma con ribosomas, gránulos citoplasmáticos y un núcleo constituido por moléculas bicatenarias de DNA y RNA (Andrada *et al.*, 2001). A diferencia de las membranas bacterianas, las membranas de los *Mollicutes* contienen colesterol, y en su mayoría

contienen fosfolípidos y glucoproteínas, que junto con las proteínas constituyen los determinantes antigénicos más importantes (Poveda *et al.*, 2002).

Debido a lo anteriormente mencionado el crecimiento de estas bacterias requiere de medios de cultivo complejos debido a su restringida capacidad metabólica y de síntesis. Los medios de cultivo para estas bacterias deben incluir precursores de ácidos nucleicos, vitaminas, aminoácidos y para aquellos géneros que lo necesiten, colesterol (Rosales, 2013; García, 2013).

La membrana celular de *Mycoplasma* es permeable selectiva que envuelve al citoplasma y está formada por una bicapa de fosfolípidos con proteínas de membrana insertadas en ella. Dos tercios de la membrana plasmática están formados por proteínas, siendo el tercio restante lípidos de membrana. La mayoría de las proteínas presentes en la membrana de estas bacterias se encuentran ancladas a la parte externa de la membrana plasmática. Un tipo característico de estas proteínas de membrana son las lipoproteínas, que pueden modificar su secuencia, incrementando la variabilidad antigénica de estos organismos y jugando un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del organismo hospedador (Rosales, 2013).

## **I. Patogenia**

Los *Mycoplasma* patógenos, suelen causar infecciones de tipo crónicas. La selección constante de subpoblaciones celulares, en lugar de la adaptación de una población completa, podría explicar la naturaleza crónica de las infecciones causadas por estas bacterias. A pesar de la clara asociación entre *Mycoplasma* y enfermedad en animales, plantas e insectos no existe mucha información sobre los mecanismos exactos que influyen en la patogenicidad de ciertos *Mycoplasma* (Rosales, 2013).

Dentro de los posibles factores de patogenicidad descritos, se encuentra la producción de peróxido de hidrógeno y radicales superóxido como productor metabólicos de desecho, capaces de causar daño oxidativo en la membrana de las células del hospedador (Rosales, 2013).

Otro de los mecanismos posibles por los que estas bacterias pueden causar enfermedad, es por la presencia de ureasas, que pueden dar lugar a la producción de amoníaco, la presencia de fosfolipasa A<sub>2</sub> en ureaplasmas, que influencia el

metabolismo de la prostaglandina, generando problemas durante la gestación. Otro posible mecanismo es la capacidad de fusionarse parcialmente con las células hospedadoras, incrementando el daño causado por los radicales superóxido. Y por último, el papel que la cápsula externa de polisacárido juega en reducir la capacidad de fagocitosis en el organismo hospedador, favoreciendo por lo tanto la colonización de los micoplasmas (Rosales, 2013).

Existe la presencia de proteínas capaces de modificar la estructura de estas bacterias, de forma reversible y alterar de esta forma su composición antigénica. Esta variabilidad permite a este patógeno obtener una mayor capacidad de colonización y de adaptación al medio a través de la variación de su arquitectura de superficie celular (Rosales, 2013).

## **II. *M. hyorhinis***

### **a) Características generales**

Dentro del género *Mycoplasma*, podemos encontrar a la especie *M. hyorhinis*, este es un microorganismo ubicuo en cerdos. Su hábitat natural son las membranas mucosas del tracto respiratorio superior y las tonsilas. Se encuentra en un alto porcentaje en cavidades nasales normales en cerdos adultos y cerdos en crecimiento. Se puede producir fácilmente una propagación descendente hacia los pulmones, por lo que se considera a *M. hyorhinis* parte del complejo etiológico de las neumonías entre los lechones (Kobisch, 1996; Sibila *et al.*, 2021; Ustulin *et al.*, 2021).

*M. hyorhinis* al igual que todas las bacterias del mismo género, presenta un tamaño de genoma relativamente pequeño, variado entre 829 y 839 Kb (Rosales, 2013).

En comparación con *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* es relativamente fácil de aislar, siendo considerado como un *Mycoplasma* de crecimiento rápido. Para el aislamiento son necesarios de tres a cinco días, pero los cultivos establecidos crecen en uno o dos días. *M. hyorhinis* fermenta la glucosa, no utiliza arginina ni hidroliza la urea. En medio sólido se pueden observar colonias típicas de *Mycoplasma* con morfología de "huevo frito" tras incubación a 37°C entre 2 a 5 días, con un diámetro final de 0.5 a 1mm (Kobisch, 1996; Rosales, 2013).

*M. hyorhinis* presenta un sistema de mecanismo de variación antigénica que le proporciona la capacidad al microorganismo de modificar su repertorio antigénico y características estructurales de superficie con el fin de evadir la acción del sistema inmune del organismo hospedador. Gracias a los mecanismos que regulan este sistema, *M. hyorhinis* es capaz de variar rápidamente, adaptándose a diferentes condiciones del medio u hospedador y dando lugar a la selección de poblaciones resistentes a la respuesta humoral (Rosales, 2013).

Es considerada como una bacteria contaminante aislada frecuentemente del tracto respiratorio de cerdo. Debido a que se adhiere al epitelio ciliar del tracto respiratorio superior, es común aislarlo en este lugar en cerdos sanos y de las tonsilas de cerdos con pleuritis, peritonitis, pericarditis y artritis, y frecuentemente se recupera de lesiones pleurales, pericárdicas y sinoviales (Aragón *et al.*, 2015; Beltrán *et al.*, 2015; Rosales, 2013). *M. hyorhinis* es un invasor secundario, también común, en la pulmonía porcina causada por el PRRSV y PCV2 (Ustulin *et al.*, 2021), que produce, ocasionalmente, inflamación de las membranas serosas del cuerpo del cerdo y de las articulaciones (Anón, 2020). Es un microorganismo que frecuentemente actúa como patógeno y que puede causar poliserositis y retardo en el crecimiento y reduce la eficiencia alimenticia (Aragón, 2015).

Recientemente, *M. hyorhinis* se ha considerado como un patógeno importante en cerdos recién destetados en las granjas de Estado Unidos y Europa (Clavijo *et al.*, 2012 a y b). Sin embargo, su papel etiológico no se ha establecido del todo, a pesar de que se han encontrado aislados de *M. hyorhinis* con diferentes grados de patogenicidad causando neumonías asociadas a CRP (Ross y Whittlestone, 1983).

Interesantemente, en una publicación de Sibila *et al.*, 2014, se presentó un estudio cuyo objetivo fue evaluar la prevalencia de *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis* en lavados broncoalveolares (BALF) de muestras procedentes de animales vivos, con y sin signos de CRP procedentes de diferentes explotaciones europeas. Para ello se tomaron de varias granjas, muestras de BALF de 5 animales de 10 semanas de edad que presentaran problemas respiratorios (animales enfermos) y de 10 cerdos sanos de la misma edad. Esos animales sanos se muestrearon de nuevo a las 20 semanas de edad. Este procedimiento se llevó a cabo en 7 granjas europeas diferentes. Las muestras se procesaron por medio de

un método de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) y una prueba de PCR-nested para *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*. Los resultados mostraron en términos generales que la detección de *M. hyopneumoniae* fue menor a las 10 semanas de edad (27/105, 26%) que a las 20 semanas de edad (30/58, 52%). Sólo 8 de cada 58 (14%) animales fueron positivos a *M. hyopneumoniae* por qPCR en ambos puntos de muestreo. La detección de *M. hyopneumoniae* fue mayor en aquellos animales que presentan problemas respiratorios (11/35, 31,4%) que en animales sanos (16/70, 22,8%) ( $p > 0,05$ ). La carga bacteriana de los animales positivos qPCR que muestran problemas respiratorios media (5,93 [8,60 máx.; 3,89 min]) no fue significativamente diferente de la de los sanos (6,09 [7,98 máx.; 4,24 min]). Por el contrario, la detección de *M. hyorhinis* fue ligeramente superior a las 10 semanas de edad (65/105, 62%) que a las 20 semanas de edad (30/58, 52%). Por último, 23 de 58 (40%) animales fueron positivos a *M. hyorhinis* en ambos puntos de muestreo. La detección de *M. hyorhinis* fue mayor en los animales sanos (46/70, 65%) que aquellos animales que presentaron problemas respiratorios (19/35, 54%) ( $p > 0,05$ ). La carga bacteriana de QPCR animales sanos positivos media (5,91 [8,53 máx.; 4,37 min]) no fue significativamente diferente de los animales que presenten problemas respiratorios (6,19 [8,37 máx.; 4,41 min]) (Sibila *et al.*, 2014).

Debido a lo anteriormente mencionado, podemos concluir que *M. hyorhinis* es un patógeno comúnmente detectado, considerándose también ubicuo y concomitante a la infección de otros patógenos como el patógeno primario *M. hyopneumoniae*.

### **b) Epidemiología**

Esta bacteria es de distribución mundial, encontrándose en cualquier lugar donde haya producción intensiva porcina. Es un microorganismo patógeno que afecta principalmente a lechones, donde generalmente la transmisión se produce por contacto directo de la secreción nasal entre madres o cerdos adultos y lechones justo después del nacimiento. Una vez en que esta bacteria se encuentra en el tracto respiratorio, es capaz de propagarse de forma hematogena dando lugar a las características lesiones serofibrinosas afectando pleura, peritoneo y pericardio, además de procesos artríticos (Beltrán *et al.*, 2015; Kobisch, 1996; Rosales, 2013).

Además de su hábitat natural colonizando el tracto respiratorio superior del cerdo, *M. hyorhinis* es aislado en otros sitios, relacionándolo así con otras

patologías como por ejemplo, en pulmones de cerdos con lesiones compatibles con neumonía enzoótica, el porcentaje de aislamiento se sitúa alrededor de un 70%, mientras que en animales sanos el porcentaje disminuye hasta un 53% (Rosales, 2013).

Rosales, 2013 menciona que, aunque la capacidad de *M. hyorhinis* para causar enfermedad clínica como agente causal único, incluyendo neumonía, otitis, artritis y poliserositis, ha sido ampliamente demostrada en diferentes estudios, la asociación de este microorganismo con otros patógenos respiratorios porcinos representa un factor altamente importante a considerar, debido a la posible implicación en la potenciación de los diferentes cuadros clínicos. Por otro lado, Anón 2020 menciona que, la enfermedad de *M. hyorhinis* aparece más frecuentemente en grupos de cerdos que ya tienen otras enfermedades, como pulmonía o enteritis, y en donde hay tensión considerable ocasionada por pobres condiciones ambientales o por un manejo deficiente.

En los últimos años, diversos análisis de muestras de matadero y de animales infectados clínicamente enfocados principalmente al estudio del CRP, han aportado una mayor claridad sobre el rol de *M. hyorhinis* en procesos neumónicos naturales en el cerdo. Sin, embargo, ya existía estudios de los años 90' en donde, enfocado principalmente al análisis de casos de neumonía enzoótica, se encontró una estrecha relación entre *M. hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *M. hyorhinis*, al ver cómo pulmones con resultados positivos para estos tres patógenos presentaban las lesiones macroscópicas de mayor grado, además de encontrar un alto porcentaje de pulmones neumónicos donde *M. hyorhinis* era el único agente causal detectado (Rosales, 2013).

### **c) Presentación clínica**

En condiciones naturales, los cuadros de neumonía causados por *M. hyorhinis* se asimilan a los observados en casos de Neumonía Enzoótica Porcina, pudiendo apreciarse una bronconeumonía catarral crónica de distribución craneoventral, afectando principalmente a los lóbulos apicales, cardíacos e intermedio y la porción craneal de los lóbulos diafragmáticos (Rosales, 2013).

En los casos de poliserositis, la enfermedad se presenta normalmente en animales de tres a diez semanas de edad, y de forma ocasional en animales adultos, apareciendo entre tres y diez días tras la exposición a *M. hyorhinis*. Los principales

signos clínicos incluyen fiebre moderada (40°C - 40.6°C), cojera, inapetencia, dificultad para moverse, artritis y dificultad respiratoria. Entre tres y seis meses tras el inicio de la infección se observa una reducción en los procesos inflamatorios articulares (Rosales, 2013).

#### **d) Diagnóstico**

Debido a la similitud de las lesiones causadas por *M. hyorhinis* con las presentes en infecciones causadas por otros agentes infecciosos, el poder diagnóstico de casos clínicos causados por esta bacteria basado en la evaluación patológica es limitado, por lo que necesita apoyarse necesariamente en el uso de técnicas de laboratorio para alcanzar un resultado fiable (Kobisch, 1996; Rosales, 2013).

## INMUNIDAD

El sistema inmune es esencial para la vida del animal, ya que, es el encargado de proteger a los individuos frente a la invasión microbiana. Existen diversos mecanismos para asegurar la protección contra los microorganismos. Dentro de estos se incluyen las barreras físicas, donde rechazar la entrada de estos microorganismos sugiere ser la protección más efectiva, ya que sin ésta una buena defensa es prácticamente imposible; ejemplos de barreras físicas son la piel y otras superficies corporales como el tracto respiratorio y gastrointestinales (Campos - Granados, 2014; Palomo *et al.*, 2009; Tizard, 2009).

Las barreras físicas no son completamente efectivas por sí mismas, por lo que un microorganismo invasor que sea persistente en el tiempo podría sobrepasar esta barrera. Es en ese momento en el que comienza a participar la inmunidad innata, ésta se encarga de actuar de manera rápida (minutos - horas) con el fin de bloquear la invasión microbiana antes de dar lugar a la enfermedad. Está constituida por un conjunto de diversos tipos celulares y factores solubles encargados de la resistencia del huésped ante agentes infecciosos con los cuales nunca éste ha tenido contacto (Tizard, 2009). Una vez que ocurre la invasión microbiana en un tejido ocurre un conjunto de reacciones denominada inflamación, esto genera un aumento del flujo sanguíneo y del acumulo de células que pueden atacar y destruir al patógeno (Campos- Granados, 2014). Estas células, llamadas neutrófilos y macrófagos, pueden destruir a la mayoría de organismos invasores y así evitar su diseminación a lugares no infectados del organismo. En conjunto actúa el sistema del complemento, formado por enzimas que son activadas por la presencia del patógeno y que van a dar lugar a la destrucción microbiana (Palomo *et al.*, 2009; Tizard, 2009).

El sistema inmune innato no tiene ningún tipo de memoria y cada infección es tratada de la misma manera. Por tanto, la intensidad y duración de procesos como la inflamación se mantienen inalteradas, independientemente de lo frecuente que se encuentre a un patógeno determinado. Pero, por otra parte, siempre está listo para actuar inmediatamente en cuanto se detecte un patógeno (Tizard, 2009).

La inmunidad innata no puede ofrecer la solución definitiva para la defensa del organismo. Es necesario contar con un sistema de defensa que pueda reconocer y destruir a los patógenos y aprender de ese proceso, de manera que, en

el caso de que volviera a invadir el organismo, se pudiera destruir de forma más eficiente. La inmunidad adquirida, es una inmunidad prolongada efectiva, que mientras más frecuentemente se encuentre un individuo con un determinado patógeno, más efectiva serán sus defensas frente a ese microorganismo. Este mecanismo tarda varios días en ser eficaz, a pesar de esto, su respuesta resulta increíblemente efectiva. Es un sistema complejo y sofisticado que proporciona el último nivel de defensa del organismo (Campos - Granados, 2014; Tizard, 2009).

Una diferencia entre la inmunidad innata y adquirida es el uso de los receptores para reconocer microorganismos invasores extraños. La inmunidad innata utiliza receptores pre-existentes que pueden unirse a moléculas y patrones moleculares que se encuentran habitualmente en muchos microorganismos distintos. Por otro lado, las células de la inmunidad adquirida producen de forma aleatoria un enorme número de receptores estructurales únicos. Estos receptores pueden combinarse con una ingente serie de moléculas extrañas. Debido a que la capacidad de unión de estos receptores se genera al azar, no están predestinados para reconocer una determinada molécula extraña, pero colectivamente pueden reconocer casi a cualquier microorganismo invasor. La inmunidad adquirida reconoce patógenos externos, los destruye y desarrolla memoria de este encuentro, de tal manera, si el animal vuelve a encontrarse con el mismo organismo una segunda vez, la inmunidad adquirida responderá más rápidamente y de forma más eficaz (Tizard, 2009).

La inmunidad adquirida posee dos ramas principales que protegen al organismo, una rama defiende frente a los patógenos extracelular o exógenos como la mayoría de las bacterias y hongos, protozoos y parásitos helmintos, esto se realiza mediante proteínas denominadas anticuerpos que favorecen la destrucción de estos patógenos, este tipo de respuesta se llama respuesta inmune humoral. Por otro lado, una rama que protege frente a los microorganismos que se originan o viven dentro de las propias células del organismo (intracelulares o endógenos), como lo son virus y bacterias o protozoos intracelulares, son atacados por células especializadas que destruyen células infectadas o anómalas, este tipo de respuesta se conoce como respuesta inmune mediada por células (Campos - Granados, 2014; Tizard, 2009).

## I. Linfocitos

Los linfocitos cumplen un papel fundamental en la defensa del organismo. Se dividen en tres grupos funcionales diferentes: las células Natural Killer (NK), que no expresan marcadores de células T ni células B, y desempeñan un papel importante en la inmunidad innata; los linfocitos T, que regulan la inmunidad adquirida de tipo celular; y los linfocitos B, que son responsables de la producción de anticuerpos, es decir, responsables de la inmunidad adquirida de tipo humoral. Dentro de estos tres tipos principales hay un gran número de subpoblaciones celulares, cada una con diferentes características y funciones (Campos - Granados, 2014).

Existen invasores extraños que penetran el cuerpo libremente y proliferan en los fluidos extracelulares. Los linfocitos B son los encargados de destruir estos invasores mediante la producción de anticuerpos (Tizard, 2009).

Los linfocitos B se encuentran en la corteza de los nódulos linfáticos, en la zona marginal del bazo, en la médula ósea, por todo el intestino en las placas de Peyer, y unos pocos circulan en la sangre. Poseen una gran cantidad de receptores de unión al antígeno idénticos sobre su superficie. Por lo tanto, cada linfocito B solo puede unirse y reaccionar frente a un único antígeno. Los receptores de antígeno son generados al azar durante el desarrollo del linfocito B. Si un linfocito B encuentra un antígeno que pueda unirse a sus receptores, con la co-estimulación apropiada, reaccionará secretando moléculas de receptor a los fluidos corporales, donde se llaman anticuerpos. Cada linfocito B produce anticuerpos con la misma especificidad de la de sus receptores. Esta especificidad es el resultado de una serie de reorganizaciones genéticas al azar, que deben realizarse con éxito para que el linfocito B sobreviva. Además, durante una respuesta inmune tiene lugar un segundo proceso de selección en el que los receptores de los linfocitos B son modificados por mutaciones somáticas al azar o por conversión génica. Solo los linfocitos B con receptores capaces de ligar un antígeno con una alta afinidad, sobrevivirán para convertirse en células de memoria (Tizard, 2009).

Cada linfocito B está recubierto por entre 200.000 y 500.000 receptores de antígenos idénticos, llamados BCR (receptores antigénicos del linfocito B, muchos más que los receptores de los linfocitos T. Cada BCR está formado por varias cadenas peptídicas que pueden dividirse en dos componentes: el de unión al antígeno y el de transducción de la señal de activación. Sin embargo, el BCR puede

unirse a los antígenos cuando es liberado de la superficie del linfocito B. Los anticuerpos son, simplemente, las formas solubles del BCR secretadas por los linfocitos B en los fluidos corporales; todos ellos pertenecen a la familia de proteínas denominadas inmunoglobulinas (Tizard, 2009).

Para su activación completa, los linfocitos B requieren varias señales. Por lo tanto, aunque la unión del antígeno al BCR resulta un paso esencial en la respuesta del linfocito B, normalmente es insuficiente para generar la formación de anticuerpos. La activación completa de un linfocito B requiere co-estimulación por los linfocitos T colaboradores que, a su vez, deben haber sido estimulados por la presentación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno: una célula dendrítica, un macrófago o; incluso, un linfocito B. Así pues, el linfocito B puede capturar y procesar el antígeno, presentarlo al linfocito T colaborador y entonces, recibir la co-estimulación del mismo linfocito T. Por lo tanto, los linfocitos B desempeñan dos funciones simultáneas: responden al antígeno mediante la producción de anticuerpos y, a la vez, actúan como células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T colaboradores proporcionan al linfocito B las señales de co-estimulación procedentes de las citoquinas, así como las de la interacción con sus receptores de superficie (Tizard, 2009).

## **II. Inmunidad del cerdo**

El cerdo posee diferencias anatómicas y celulares con respecto a otras especies, como por ejemplo una estructura de nódulos linfáticos "invertidos", por lo que tienen una linfa casi acelular (Goyache, 2018).

El cerdo presenta una respuesta inflamatoria equilibrada que está muy bien regulada. Estos animales son buenos respondedores a los antígenos ambientales y producen altos niveles de respuesta tanto humoral como celular a los antígenos. Desde la década de los ochenta, los diversos estudios sobre la inmunología del cerdo, han ampliado considerablemente la determinación de las particularidades del sistema inmunológico porcino. Es así, como se conoce que los cerdos poseen una baja proporción de células T CD4:CD8, generalmente menos de 1:1 en el animal adulto, quienes, además tienen una abundante (60%) población de células T doble-positivas (CD4+/CD8+) en circulación. En animales jóvenes (4-12 meses) más del 50% de los linfocitos T de la sangre son  $\gamma/\delta$  positivos, aunque esta cantidad desciende en adultos. Algunos linfocitos T  $\gamma/\delta$  porcinos pueden funcionar como

células presentadoras de antígeno utilizando las moléculas del CMH de tipo II de su superficie (Goyache, 2018; Tizard, 2009).

## **VACUNAS**

La práctica de la vacunación va evolucionando debido a los progresos en las tecnologías y a la aparición de nuevas enfermedades y cepas infecciosas. Actualmente, los veterinarios disponen de varias guías y recomendaciones sobre vacunación para poder ofrecer una medicina veterinaria de alta calidad a sus pacientes. La inmunoprofilaxis activa o vacunación implica el intento de mejorar o maximizar una respuesta inmune específica en un animal para protegerlo contra las enfermedades infecciosas. La rapidez de desarrollo de la inmunidad después de la vacunación dependerá del animal, la vacuna y la enfermedad. Generalmente, tarda unos días en empezar a desarrollarse, sobre todo, cuando se trata de una primera exposición al antígeno. El punto clave de la vacunación es generar células de memoria (B y T) que sean responsables de una respuesta inmune rápida y eficiente durante un contacto secundario con antígenos específicos (León, 2011).

De manera rutinaria, la medición de los títulos de anticuerpos séricos, generalmente IgG e IgM, representa el método disponible para valorar la eficacia y duración de la protección vacunal. Cabe destacar que los anticuerpos sólo representan una porción de la respuesta inmune global (León, 2011).

Tecnológicamente, existen diferentes tipos de vacunas, por un lado, están las vacunas vivas modificadas, las cuales se atenúan de manera que retengan la inmunogenicidad y la capacidad de replicarse en el huésped sin provocar enfermedad, estimulan la inmunidad humoral como la celular de una manera más potente y prolongada que las vacunas muertas. Por otro lado, están las vacunas inactivadas, las cuales están compuestas por agentes desnaturalizados sin destrucción de su inmunogenicidad, éstas son más seguras puesto que no tienen riesgo de virulencia específica, sin embargo, no emulan una infección natural y, por lo tanto, poseen una eficiencia y duración menor, sobre todo la relativa a la inmunidad celular.

En cuanto a las vacunas antibacterianas, cuando éstas contienen bacterias inactivadas se denominan bacterinas. Al igual como se mencionó anteriormente, este tipo de vacunas genera una inmunidad de duración relativamente corta,

permaneciendo normalmente no más de un año, y a veces durante un período de tiempo considerablemente inferior. Una forma de mejorar las bacterinas es añadir antígenos inmunógenos purificados a las bacterias inactivadas (Tizard, 2009).

Debido a lo anteriormente mencionado y con el fin de maximizar la eficiencia de las vacunas, se han añadido moléculas denominadas adyuvantes. Los adyuvantes pueden incrementar ampliamente la respuesta orgánica de las vacunas, como también aumentan la duración y alcanzar un grado de inmunoestimulación comparable al de las vacunas vivas modificadas. Estas propiedades permiten que se pueda inocular una menor cantidad de antígeno o reducir el número de dosis. Si bien los mecanismos de acción de los adyuvantes son poco conocidos, estos actúan mediante uno de los siguientes mecanismos: adyuvantes de liberación prolongada sencillamente protegen a los antígenos de la degradación rápida, prologando las respuestas inmunes; adyuvantes que liberan eficazmente el antígeno a las células presentadoras de antígeno, mejorando su presentación; adyuvantes inmunoestimulantes que aumentan la producción de citoquinas, estimulando selectivamente las respuestas Th1 o Th2 proporcionando la co-estimulación apropiada (León, 2011; Tizard, 2009).

Los adyuvantes deben su resultado a que crean un efecto de depósito sobre los antígenos, producen un reclutamiento de células inmunorreactivas, potencian la actividad de las células inmunes y aumentan la exposición antigénica. Existen los adyuvantes sintéticos y naturales, entre estos últimos se destaca el quitosano (León, 2011).

### **I. Quitosano**

El quitosano es un polímero de origen natural, que se obtiene a partir de la quitina, es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, y se obtiene mediante la desacetilación parcial de la quitina (polisacárido). La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. En los últimos años se ha encontrado una gran cantidad de aplicaciones para este biopolímero, especialmente en diversas áreas de la biomedicina, como la regeneración de tejido óseo y dental, curación de heridas, transportador de fármacos y adyuvante de vacunas, entre otros (Amar, 2012; Expósito, 2010; Gálvez, 2017)

La elección de este polímero se debe a sus múltiples propiedades físico-químicas, dentro de las cuales destacan la biocompatibilidad, mucoadhesión, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, capacidad inmunopotenciadora, carencia de toxicidad, entre otros. Las propiedades que determinan sus propiedades funcionales son su grado de desacetilación (porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano) y el peso molecular promedio (Amar, 2012; Cortés, 2009; Expósito, 2010).

El quitosano es de interés como adyuvante ya que es un vehículo para la encapsulación del fármaco (tiene la capacidad de modificar el tamaño de la partícula), protegiendo al antígeno de la degradación enzimática y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio, distintas posibilidades de administración, y biodegradabilidad (Cortés, 2009; Expósito, 2010).

Se ha reportado que el uso de este polímero en suspensión o en sistemas de micropartículas (MPs), posee actividad inmunoestimuladora, aumenta la acumulación y activación de macrófagos y polimorfonucleares, induce la liberación de citoquinas, aumenta la respuesta de anticuerpos y mejora la hipersensibilidad tipo retardada. Además, permite el transporte de estos fármacos al lugar de acción terapéutica, el incremento de su vida media y su liberación controlada en el tiempo. Por otro lado, al ser partículas pequeñas, presentan una relación superficie-volumen alta (Cortés, 2009; Expósito, 2010).

En cuanto a la mucoadhesión, ésta aumenta el tiempo de permanencia y el contacto entre la membrana y la formulación, lo cual permite una liberación del principio activo de forma sostenida en el tiempo, reduciendo así la necesidad de varias dosis (Expósito, 2010). Las propiedades mucoadhesivas del quitosano se deben principalmente a la interacción electrostática que se generan entre sus grupos amino protonados y la capa de mucus. El mucus está compuesto por una glicoproteína llamada mucina, la cual tiene cargas negativas debido a la presencia de residuos de ácido siálico. La unión entre el quitosano y la capa de mucus depende de la cantidad de ácido siálico presente en la mucina y del grado de desacetilación del quitosano o grupos amino libres. Por lo tanto, no solo actúa como potenciador de la absorción de macromoléculas, sino también como un sistema bioadhesivo de entrega. Por otro lado, el pH también influye en las propiedades mucoadhesivas del quitosano, ya que, a pH ácido este polímero se encuentra

cargado positivamente debido al valor de su pKa 6,5 (Castillo, 20017; Expósito, 2010; Gálvez, 2017).

El efecto positivo de este polímero sobre la liberación de fármacos a través de los epitelios se debe a una combinación entre sus propiedades mucoadhesivas y su capacidad para abrir las uniones estrechas (*Tight Junction*) entre células epiteliales, facilitando así el transporte de fármacos, sobre todo fármacos macromoleculares, a través del epitelio. Lo anteriormente mencionado le otorga al quitosano la propiedad de ser promotor de la absorción de fármacos (Expósito, 2010).

Finalmente, la capacidad inmunopotenciadora se debe principalmente por la viscosidad, peso molecular y por la presencia de la unidad monomérica N-acetil-D-glucosamina en su estructura (Amar, 2012).

Se ha descrito que la vacunación mucosa tiende a producir una respuesta inmune tanto sistémica como local. De hecho, formulaciones de MPs de quitosano cargadas con antígeno no solo mejoran su captación por parte del sistema de células presentadoras de antígenos, macrófagos y células M, sino que también inducen una elevada respuesta de anticuerpos a nivel local o sistémico. Además, estas MPs de quitosano cargadas con antígenos no solo promueven la inducción de citoquinas citotóxicas (linfocitos T CD8+ o linfocitos T citotóxicos) respecto a inmunizaciones que consideran el uso de antígeno libre; sino que también mejoran su eficiencia de encapsulación y regulan su liberación desde las MPs (Gálvez, 2017).

## **II. Quitosano Sulfatado (QS)**

Con el fin de superar posibles factores que pueden afectar a las propiedades del quitosano, se ha propuesto la funcionalización de éste polisacárido. Este método consiste principalmente en la conjugación química de un grupo funcional determinado, promoviendo sinérgicamente las propiedades mucoadhesivas del quitosano, y al mismo tiempo mejorando su permeabilidad, estabilidad y permitiendo un mayor control sobre la liberación de las macromoléculas microencapsuladas (Gálvez, 2017).

Una forma de funcionalización del quitosano es mediante la sulfonación de este polímero con un grupo funcional sulfato, a través de la cual se espera que el quitosano modificado exhiba mejores propiedades mucoadhesivas por el incremento

de la afinidad por la mucina, como también propiedades anticoagulantes, antimicrobianas y antioxidantes (Castillo, 2017; Gálvez, 2017). Además, posee una capacidad mimética al receptor celular heparán sulfato, por lo cual se ha propuesto como bloqueador y vehículo para distintos patógenos, que utilicen el receptor heparán sulfato como mecanismo de invasión celular (Bucarey *et al.*, 2017).

Por otro lado, al funcionalizar quitosano con grupos azufrados como el grupo funcional sulfato, se generan puentes disulfuro (enlaces covalentes) entre la mucina y el quitosano, aumentando la mucoadhesividad. Se potencia la unión dependiente de ácido siálico y grupos amino libres del quitosano explicados anteriormente (Castillo, 2017).

Sin duda la vacunación es esencial para el control del CRP, existiendo en el mercado diversas opciones de planes vacunales, especialmente para combatir las patologías provocadas por el PCV2 y por *Mycoplasma hyopneumoniae* (Abella *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2019). Actualmente en Chile, se encuentran registradas 22 vacunas contra patógenos asociados a CRP. Sin embargo, no hay opciones vacunales contra *M. hyorhinis* (SAG, 2021).

Este último punto toma importancia, ya que, como se mencionó, se ha demostrado que *M. hyorhinis* es un agente activo en la participación del CRP, generando lesiones específicas en lechones y como consecuencia grandes pérdidas económicas para el plantel.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar experimentalmente, en modelo murino, la inmunogenicidad de una vacuna microencapsulada en base a quitosano funcionalizado contra *Mycoplasma hyorhinis*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Inmunizar ratones BALB/c con antígenos de *M. hyorhinis* microencapsulados con quitosano comercial y funcionalizado con grupos sulfatos por dos vías de administración.
2. Evaluar en los animales inmunizados la inducción de anticuerpos específicos contra antígenos asociados a *M. hyorhinis*, a distintos tiempos post-inmunización por técnicas de ELISA indirecto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

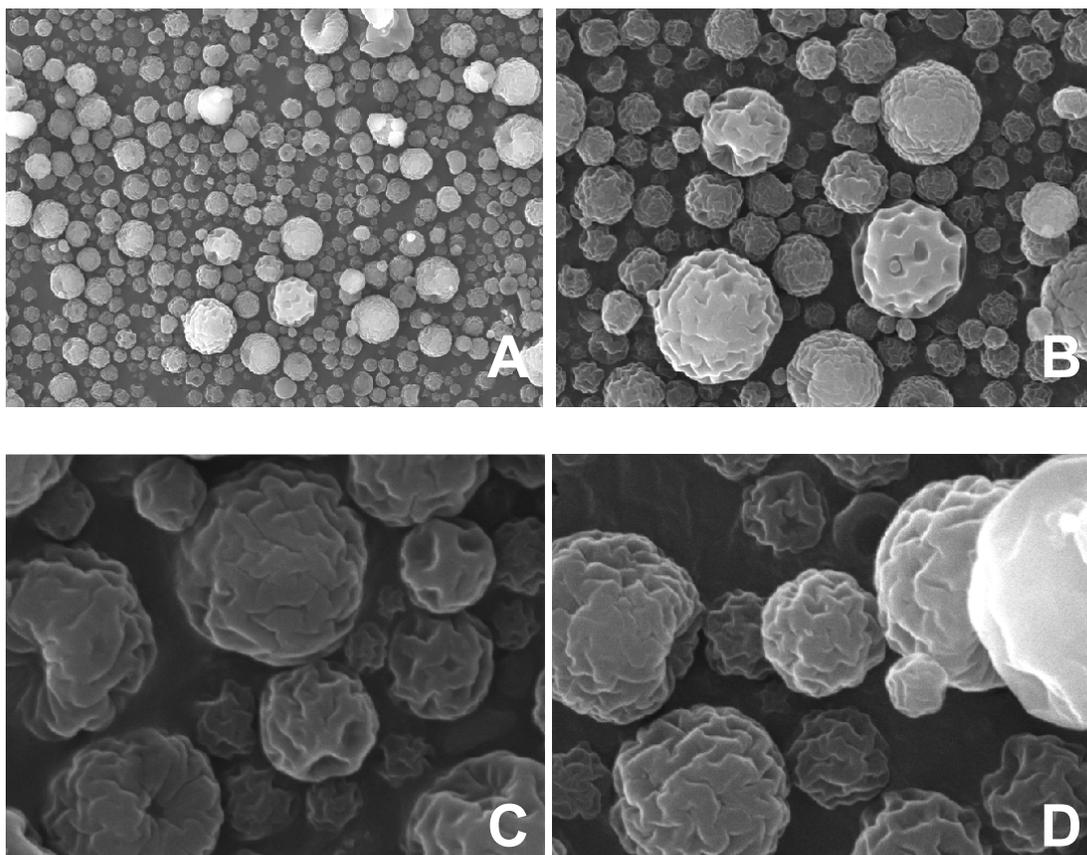
### I. Protocolo y manejo de *Mus musculus*

Todos los procedimientos que conciernen al trato de los animales involucrados en esta investigación, tanto tomas de muestras, tratamientos y eutanasia, fueron realizados por Médicos Veterinarios y realizado de acuerdo a lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigaciones Biomédicas, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas (Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996), (Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993).

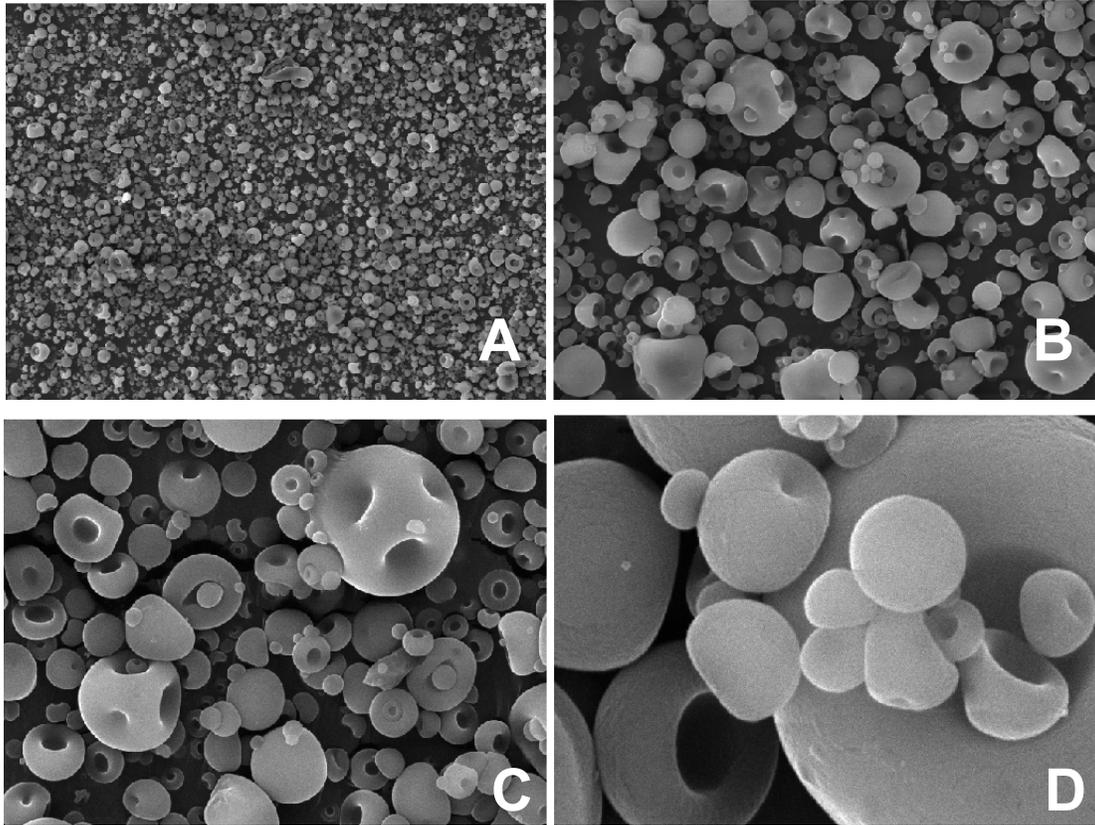
Para llevar a cabo la evaluación de la inmunogenicidad de una vacuna de *M. hyorhinis* se utilizaron 18 hembras adultas de la especie *Mus musculus*, de la cepa BALB/c de ocho semanas de edad, las cuales fueron compradas en el Servicio de Salud Pública (ISP), comuna de Ñuñoa, Chile. Los roedores fueron mantenidos en la Unidad de Manejo animal de ECOVET-FAVET de 20,8 m<sup>2</sup>, provisto de un extractor de aire con capacidad de 420 m<sup>3</sup>/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* se dividieron en 6 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 contó con sustrato de viruta de madera de 10 cm de profundidad. Tanto el agua como el alimento se administraron de forma *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. hyorhinis* (Figura 1 y 2). Las siguientes fotografías fueron tomadas 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 1.** Microfotografías SEM de Qc + *M. hyorhinis*. Se observan distintas magnificaciones (A, B, C, D), y 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  $\mu\text{m}$ . Fotografía tomada en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.



**Figura 2.** Microfotografías SEM de Qs + *M. hyorhinis*. Se observan distintas magnificaciones (A, B, C, D), además, se muestra coexistencia de partículas esféricas con concavidades de superficie lisa con concavidades, las cuales poseen tamaños aproximados de 0,75 – 9  $\mu\text{m}$ . Fotografía tomada en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Las dosis y vías de administración utilizadas en el proyecto:

- Vía Intranasal (IN): 20  $\mu$ l de la suspensión (1 mg / ml), administradas utilizando punta de pipeta de 20  $\mu$ l, alternando de fosa nasal. (Figura 3.)



**Figura 3.** Inoculación de vacunas por vía intranasal (IN). Fotografía tomada en la unidad de roedores del laboratorio ECOVET.

- Vía Intraperitoneal (IP): 300 µl de la suspensión (1 mg / ml), utilizando jeringas de 1 ml con agujas de 27G. (Figura 4.)



**Figura 4.** Inoculación de vacunas por vía intraperitoneal (IP). Fotografía tomada en la unidad de roedores del laboratorio ECOVET.

El diseño experimental y los distintos tratamientos de inmunización se detallarán a continuación (Tabla 1):

**Tabla 1.** Diseño experimental.

GRUPO	N° DE ANIMALES	TRATAMIENTO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
1	3	QC10X	Intraperitoneal
2	3	QS10X	Intraperitoneal
3	3	QC10X	Intranasal
4	3	QS10X	Intranasal
5	3	Control positivo 10 µg bacterina de <i>M. hyorhinis</i>	Intraperitoneal
6	3	Placebo	Intraperitoneal

La vacunación y la toma de muestra estuvieron bajo la guía y supervisión de un Médico Veterinario con conocimiento en manejo de animales bajo condiciones de laboratorio. Es importante recalcar que todos los protocolos para el trabajo experimental con animales en esta memoria, han sido visados por el Comité

Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (**CICUA ID19I10135**).

La toma de muestra se realizó en el primer tercio de la cola (Figura 5), la cual fue lavada con una solución antimicrobiana de clorhexidina 2% para desinfectar el área y ver el vaso sanguíneo. Luego con aguja de 27G estéril se realizó la punción en el área ya mencionada recolectando 0,1 ml de sangre mediante tubo capilar. Una vez tomada la muestra, se realizó la limpieza de la zona inoculada con alcohol 70% y posteriormente, se procedió a la hemostasis aplicando presión con los dedos sobre la cola durante 30 segundos. La muestra fue tomada cada dos semanas desde la primera vacunación, hasta la octava semana (Tabla 2).



**Figura 5.** Obtención de la muestra en el lugar de la punción realizada en el primer tercio de la cola del roedor. Fotografía tomada en la unidad de roedores del laboratorio ECOVET.

**Tabla 2.** Diseño de inmunización y extracción de muestras.

EDAD (SEM)	8	9	10	11	12	13	14	15	16
semana (año 2021)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inmunización	IN +IP			IN +IP Booster 21 días		IN Booster 36 días			
Toma de muestra	X	X			X		X		X

## **II. Medición del título de anticuerpos antígeno-específicos contra *M. hyorhinis***

Para poder cuantificar el título de anticuerpos totales contra *M. hyorhinis* de manera más sensible, se montó y estandarizó un ensayo de ELISA indirecto (es importante destacar que no existen kits comerciales para detectar anticuerpos contra estos antígenos en modelo murino). En esta oportunidad se evaluó la inducción de anticuerpos en animales inmunizados con MPs de QS y QC conjugadas con antígenos de *M. hyorhinis* en dos concentraciones, con la finalidad de evidenciar la inducción de anticuerpos específicos, además de los controles positivos y negativos.

### **ELISA Indirecto**

Se utilizaron placas de ELISA sensibilizadas con antígenos totales de *M. hyorhinis*.

1. Para este procedimiento, se diluyó la proteína recombinante en tampón de cobertura (50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50mM Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>), para obtener una concentración final de 40 µg/mL de Ag de *M. hyorhinis*. Luego se administró 50 µL en cada pocillo de la placa de microtitulación de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc, Denmark), y se cubrieron con *parafilm* para incubar toda la noche a 4°C.

2. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 200 µL de buffer de lavado (PBS, Tween 20 0,05%) por pocillo y se bloquearon 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 37°C. A continuación, se realizaron cuatro lavados con 200 µL de buffer de lavado por pocillo, para luego utilizar los sueros de los ratones, disponiendo cada una de las muestras en triplicado en una dilución de 1:500 en una solución de dilución (leche descremada 0,5% en PBS, Tween 20 0,05%, incubándolas a 4°C durante toda la noche). Como control negativo se utilizaron pocillos sin el anticuerpo primario (suero de ratones) y como control positivo suero de ratones inmunizados con la bacteria de *M. hyorhinis*.

3. Al siguiente día, se realizaron cinco lavados con 200 µL de buffer de lavado por pocillo. A continuación, 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 realizaron 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 (Thermo Scientific, 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. Finalmente, se detuvo la reacción con 50 µL por pocillo con solución de parada (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Los valores de la OD se medirán a 450nm usando el equipo “Microplate Reader” modelo 680 (Bio-Rad®, Hércules, CA, EUA).

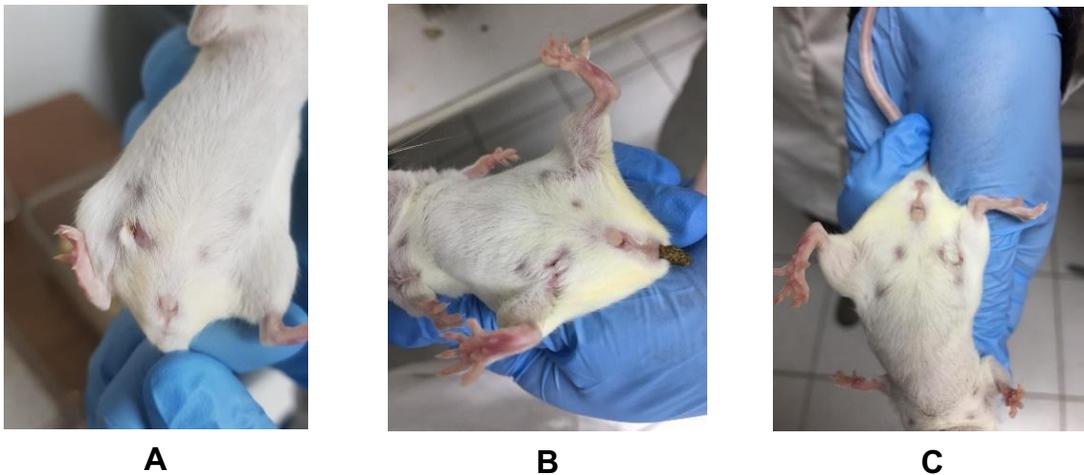
## ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### I. 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 6 se muestran las fotografías 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.



**Figura 6.** 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 (Figura 7).



**Figura 7.** 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.

## **II. Medición de inmunogenicidad**

Los resultados de inmunogenicidad obtenidos por medio de análisis de Elisa indirecto, fueron ingresados, ordenados, graficados y analizados estadísticamente con el software Prism - GraphPad™. La distribución normal de las variables en cada grupo y tratamiento fue evaluada por medio del test de Shapiro Wilk. Para el análisis de las varianzas con distribución normal, es decir  $p$ -value  $>$  al nivel de significancia de 0.05, se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas (RM-ANOVA), en conjunto con la correlación de Tukey para comparar y ajustar las variables de título de anticuerpos, entre los distintos grupos. Para aquellos resultados que no presentaron una distribución normal, es decir  $p$ -value  $\leq$  al nivel de significancia de 0.05, se utilizó la prueba de Friedman, en conjunto con el test Dunn para corregir las comparaciones múltiples.

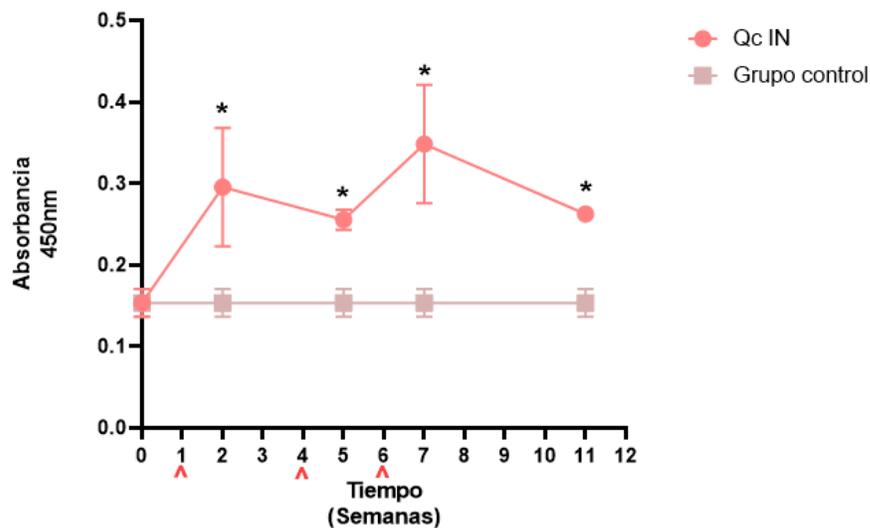
## **III. Análisis estadísticos**

Para los siguientes análisis, cabe destacar que fueron descartados aquellos Elisa indirecto que fueron contaminados durante la manipulación del proceso de elaboración de éstos.

En primer lugar se realizará un análisis de los resultados de los test Elisa indirecto en donde se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (KPL, UK). Es importante señalar, para que estos resultados sean estadísticamente significativos  $p\text{-value} \leq 0.05$ .

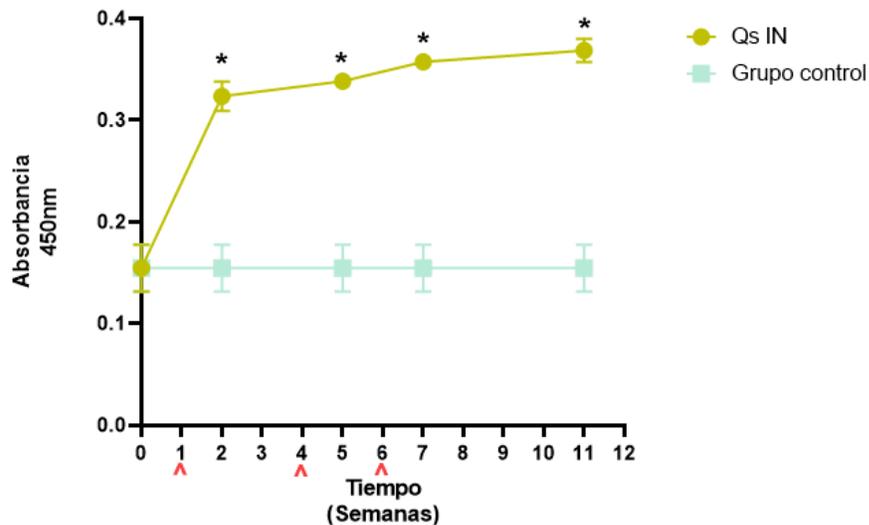
## Resultados

- a) **Resultados obtenidos de los grupos QCIN/QSIN:** Los siguientes datos presentaron una distribución normal ( $p\text{-value}$ : 0.5) y corresponden a los obtenidos del grupo QCIN, estos fueron analizados por la prueba RM-ANOVA de dos vías. La Figura 8 corresponde a los resultados de la absorbancia (medida a una longitud de onda de 450 nm) en el tiempo del grupo anteriormente mencionado, comparado con el grupo control sin inmunizar. Estos datos presentan valores estadísticamente significativos (Anexo: Tabla 3.), por otro lado, el grupo inmunizado con QC por vía intranasal presenta diferencias significativas (Anexo: Tabla 4.) con respecto al grupo control sin inmunizar en cada uno de los tiempos.



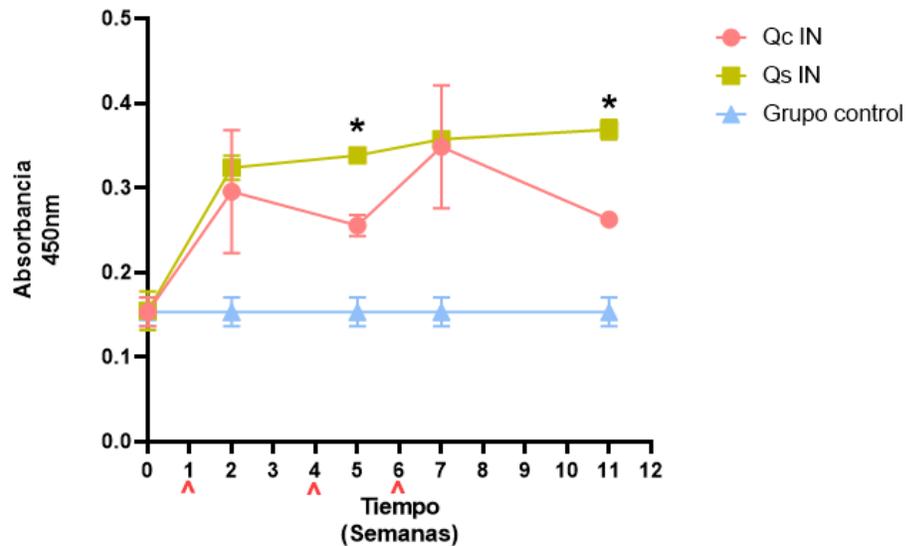
**Figura 8.** Inmunización con quitosano comercial por vía intranasal. Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm vs tiempo en semanas. Los asteriscos muestran los puntos donde se observan diferencias significativas entre QCIN y el grupo control sin inmunizar ( $p\text{-value} < 0.05$ ). Los (^) muestran los tiempos en donde se realizaron la inoculación inicial, 1º refuerzo, 2º refuerzo (respectivamente).

Para el análisis de los resultados del grupo QSIN (Figura 9), se empleó la prueba de Friedman, ya que los datos no presentaban una distribución normal ( $p$ -value  $<0.05$ ). Los resultados de esta prueba demuestran valores estadísticamente significativos (Anexo: Tabla 5.). Por otro lado, en el test de múltiples comparaciones se observa que existen diferencias significativas (Anexo: Tabla 6) entre el grupo quitosano sulfatado por vía intranasal (QSIN) y el grupo control sin inmunizar en cada uno de los tiempos.



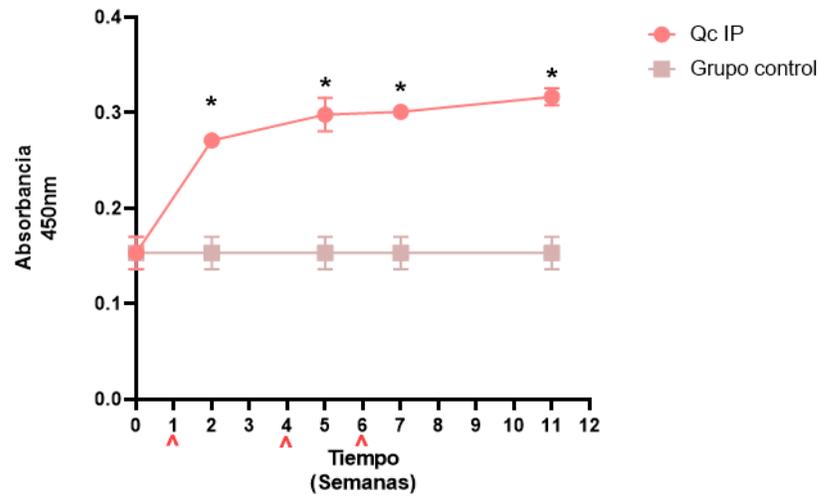
**Figura 9.** Inmunización con quitosano sulfatado por vía intranasal. Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm vs tiempo en semanas. Los asteriscos muestran los puntos donde se observan diferencias significativas entre QSIN y el grupo control sin inmunizar ( $p$ -value  $<0.05$ ). Los (^) muestran los tiempos en donde se realizaron la inoculación inicial, 1º refuerzo, 2º refuerzo (respectivamente).

Por último, con el fin de comparar la respuesta entre QC y QS por la misma vía de administración y el grupo control sin inmunizar, se realizó el análisis en un solo gráfico (Figura 10). Para este análisis se utilizó la prueba RM-ANOVA de dos vías. Los datos presentaron una distribución normal ( $p$ -value: 0.1), y fueron estadísticamente significativos entre cada tipo de variación (Anexo: Tabla 7.). En la Figura 10, podemos observar que existen diferencias significativas (Anexo: Tabla 8) entre ambos tipos de formulaciones. El grupo QSIN presenta una mayor respuesta en la formación de Ac contra *M. hyorhinis* en dos puntos en el tiempo, siendo estos puntos la semana N°5 y la semana N°11.



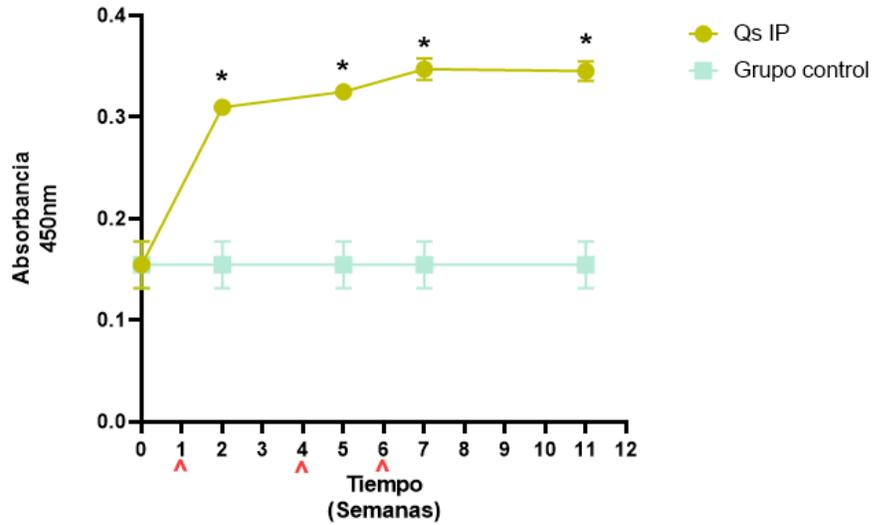
**Figura 10.** Comparación de inmunización con quitosano comercial vs quitosano sulfatado por vía intranasal. Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm vs tiempo en semanas. Los asteriscos muestran los puntos donde se observan diferencias significativas entre QSIN y QCIN ( $p$ -value  $< 0.05$ ). Los (^) muestran los tiempos en donde se realizaron la inoculación inicial, 1º refuerzo, 2º refuerzo (respectivamente).

**b) Resultados obtenidos de los grupos QCIP/QSIP:** Ninguno de los datos a continuación presentaron una distribución normal ( $p$ -value  $< 0.05$ ), por lo que se utilizó la prueba de Friedman. La Figura 11 corresponde a los resultados de la absorbancia en el tiempo del grupo QCIP en comparación con el grupo control sin inmunizar, estos datos presentan valores estadísticamente significativos (Anexo: Tabla 9.). El test de múltiples comparaciones muestra que existe una diferencias significativas (Anexo: Tabla 10) entre el grupo quitosano comercial y el grupo control sin inmunizar en cada uno de los tiempos.



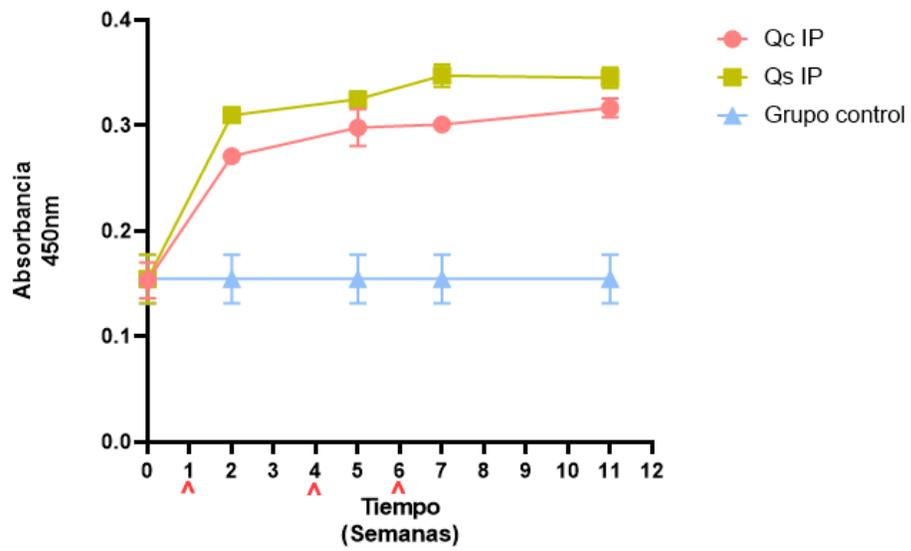
**Figura 11.** Inmunización con quitosano comercial por vía intraperitoneal. Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm vs tiempo en semanas. Los asteriscos muestran los puntos donde se observan diferencias significativas entre QCIP y el grupo control sin inmunizar ( $p$ -value  $< 0.05$ ). Los (^) muestran los tiempos en donde se realizaron la inoculación inicial, 1º refuerzo, 2º refuerzo (respectivamente).

Los datos del grupo QSIP se pueden observar en la Figura 12, también es estadísticamente significativo (Anexo: Tabla 11.). Al realizar el test de múltiples comparaciones se puede observar, al igual que los grupos anteriores, que existe una diferencia significativa (Anexo: Tabla 12) entre el grupo QCIP y el grupo control sin inmunizar en cada uno de los tiempos.



**Figura 12.** Inmunización con quitosano sulfatado por vía intraperitoneal. Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm vs tiempo en semanas. Los asteriscos muestran los puntos donde se observan diferencias significativas entre QSIP y el grupo control sin inmunizar ( $p$ -value  $< 0.05$ ). Los (^) muestran los tiempos en donde se realizaron la inoculación inicial, 1° refuerzo, 2° refuerzo (respectivamente).

En último lugar, en función de comparar la respuesta entre QC y QS por la misma vía de administración y el grupo control sin inmunizar, se realizó el análisis en un solo gráfico (Figura 13). Si bien ambas formulaciones manifiestan diferencias significativas con el control sin inmunizar, los datos no presentaron una distribución normal, por lo cual no fue posible hacer pruebas estadísticas *a posteriori* para determinar mayores diferencias entre los dos grupos de formulaciones.



**Figura 13.** Comparación de inmunización con quitosano comercial vs quitosano sulfatado por vía intraperitoneal. Los resultados se expresan como absorbancia a 450nm vs tiempo en semanas. Los (^) muestran los tiempos en donde se realizaron la inoculación inicial, 1° refuerzo, 2° refuerzo (respectivamente).

## DISCUSIÓN

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

Las variables críticas estudiadas corresponden 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 hyorhinis* 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.

Hasta la fecha, diversos estudios proponen que la especie *M. hyorhinis* cumple un papel importante como agente etiológico secundario en el Complejo Respiratorio Porcino, e incluso como agente etiológico primario en cuadros de enfermedad respiratoria en cerdos. Sin embargo, aún queda mucho por investigar y entender sobre la importancia de este patógeno y de su comportamiento.

Este último punto toma interés al momento de crear avances y mejoras con respecto al manejo y control de enfermedades en los animales, ya que, debido a la escasez de conocimiento este progreso se ve limitado, quedando así los individuos vulnerables y expuestos a estos patógenos.

Como se mencionó anteriormente, para el control de enfermedades como el Complejo Respiratorio Porcino, es esencial un plan vacunal que pueda combatir a los patógenos involucrados en esta enfermedad. Si bien, en Chile existen diversas opciones, especialmente para combatir a los patógenos primarios del CRP, no existen opciones vacunales contra *M. hyorhinis* (SAG,2021).

Es por todo esto, que para este estudio se evaluó la respuesta en la formación de anticuerpos contra dicho patógeno de 2 formulaciones de vacunas experimentales basadas en MPs de quitosano conjugadas con antígenos asociados a *M. hyorhinis*. Una de las formulaciones corresponde a MPs de quitosano sulfatado (QS) conjugadas con antígenos asociados a *M. hyorhinis*, administrada por las vías intranasal e intraperitoneal, y una segunda formulación con micropartículas de

quitosano comercial (QC) conjugadas con antígenos asociados al mismo patógeno, administrada por las vías intranasal e intraperitoneal. Utilizando para ambas formulaciones ratones de la cepa BALB/c como modelo experimental.

Con el fin de alcanzar un mayor grado de inmunoestimulación y potenciar la eficiencia de las vacunas inactivadas se ha empleado el uso de diversos adyuvantes. Por consiguiente, es que en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones sobre un polímero natural para ser utilizado como adyuvante de vacunas, el polisacárido catiónico llamado quitosano. Esto se debe a las múltiples propiedades que presenta este polisacárido, dentro de las cuales destacan la biocompatibilidad, mucoadhesividad, flexibilidad, baja toxicidad, biodegradabilidad y capacidad inmunopotenciadora (Castillo, 2017; Lárez, 2015; León, 2011). Estas propiedades son consistentes con los resultados obtenidos en esta memoria, donde se pudo observar que todos los animales inoculados con ambos tipos de formulaciones de MPs de quitosano, fueron capaces de montar una respuesta asociada a la formación de anticuerpos contra *M. hyorhinis*.

Si bien, todos los ratones inoculados con ambos tipos de formulaciones fueron capaces de montar una respuesta asociada a la formación de anticuerpos, en los resultados de los test de ELISA indirecto se observa que los animales del grupo inoculado con la formulación de MPs de QS fueron capaces de generar una mayor respuesta en la formación de anticuerpos contra *M. hyorhinis* versus los animales del grupo que fue inoculado con la formulación de MPs de QC por ambas vías de administración, es decir, la vía intranasal e intraperitoneal (Gráfico N°3 y N°6).

Lo anterior, puede deberse a los diversos factores que afectan la bioadhesión del quitosano, entre los cuales se encuentra la presencia de enzimas y/o microorganismos que puedan degradar las MPs de quitosano, la temperatura en que se lleve a cabo este fenómeno, y el pH del medio; todos estos factores podrían afectar en la intensidad y/o duración de la unión, la solubilidad y su capacidad de hidratarse, entre otras cosas. En cambio, al momento de realizar la conjugación química de un grupo funcional determinado, se promueve sinérgicamente las propiedades mucoadhesivas del polímero, y al mismo tiempo mejorando su permeabilidad, estabilidad y permitiendo un mayor control sobre la liberación de las macromoléculas microencapsuladas. La funcionalización mediante la sulfonación de quitosano (QS) con un grupo funcional sulfato(-SO<sub>3</sub>), mejora las propiedades

mucoadhesivas del quitosano, además de presentar propiedades anticoagulantes, antimicrobianas, antioxidantes, posee una capacidad mimética al receptor celular heparán sulfato (HS) que se desempeña en el mecanismo de invasión de distintas infecciones (Gálvez, 2017).

Finalmente, el grupo de ratones inoculados con la formulación de MPs de QS por la vía de administración intranasal, fue la que presentó una mayor respuesta asociada a la formación de anticuerpos contra *M. hyorhinis* (Gráfico N°1). Estos resultados son consistentes con las propiedades descritas del quitosano, entre las cuales destacan su mucoadhesión y su capacidad de liberación y entrega de fármacos a través de las mucosas. Coinciden también, con estudios realizados donde se menciona el potencial del quitosano para mejorar la absorción de fármacos peptídicos a través de las mucosas, por otro lado, otros estudios mencionan que con la administración nasal de antígenos en soluciones de quitosano se promueve la respuesta inmune del organismo (Expósito, 2010). Como se mencionó anteriormente al funcionalizar el quitosano con la incorporación de grupos sulfato se aumentan las propiedades mucoadhesivas que éste ya posee; esta mucoadhesión aumenta el tiempo de permanencia y el contacto entre la mucosa y la formulación, permitiendo un incremento de la respuesta inmune generada, debido al reclutamiento y acción de las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos), activación de citoquinas y modulación de la respuesta del sistema inmunológico, además de una liberación del principio activo de forma sostenida en el tiempo (Castillo, 2017; Expósito, 2009; Gálvez, 2017).

A pesar de la escasa información sobre el patógeno *M. hyorhinis*, en relación a su papel dentro del CRP y su patogenicidad; y sumando a esto, los recientes estudios sobre el comportamiento y eficiencia del uso de quitosano sulfatado en vacunas por vías mucosas. Para efectos de esta memoria de título, estos resultados preliminares son satisfactorios, sin embargo, es importante señalar que se debe seguir investigando los puntos mencionados anteriormente, para así poder llevar esta investigación y experimento al modelo animal objetivo, que corresponde a los animales de producción de carne de cerdo.

## CONCLUSIONES

- + Es factible utilizar micropartículas de quitosano como sistema simple y seguro para la entrega de antígenos de *M. hyorhinis*.
- + Los animales inoculados con las formulaciones de micropartículas de Quitosano (comercial y sulfatado), lograron montar una respuesta asociada a la formación de anticuerpos contra *M. hyorhinis*.
- + La formulación de micropartículas de QS presentó una mayor respuesta en la formación de anticuerpos contra *M. hyorhinis* versus la respuesta de los animales inoculados con la formulación de QC por ambas vías de administración.
- + Los animales inoculados con la formulación de QS por vía intranasal fueron los que obtuvieron una mayor respuesta asociada a la formación de anticuerpos contra *M. hyorhinis*.

## ANEXOS

Tabla 3. Resultados del test RM-ANOVA 2 way del grupo QCIN.

Source Of Variation	P value	¿Significancia?
Interacción	0.0010	Si
Tiempo	0.0010	Si
Tipo de Quitosano	0,0035	Si

Tabla 4. Resultados del análisis de múltiples comparaciones del test RM-ANOVA 2 way del grupo QCIN.

QCIN - Grupo Control	P value	¿Significancia?
Semana 0	>0,9999	No
Semana 2	0,0004	Si
Semana 5	0,0105	Si
Semana 7	<0,0001	Si
Semana 11	0,0060	Si

Tabla 5. Resultados del test RM-ANOVA 2 way del grupo QSIN.

Source Of Variation	P value	¿Significancia?
Interacción	<0,0001	Si
Tiempo	<0,0001	Si
Tipo de Quitosano	00,0004	Si

Tabla 6. Resultados del análisis de múltiples comparaciones del test de Friedman del grupo QSIN.

QSIN - Grupo Control	P value	¿Significancia?
Semana 0	>0,9999	No
Semana 2	<0,0001	Si
Semana 5	<0,0001	Si
Semana 7	<0,0001	Si
Semana 11	<0,0001	Si

Tabla 7. Resultados del test RM-ANOVA 2 way de los grupos QCIN y QSIN.

Source Of Variation	P value	¿Significancia?
Interacción	<0,0001	Si
Tiempo	<0,0001	Si
Tipo de Quitosano	0,0001	Si

**Tabla 8.** Resultados del análisis de múltiples comparaciones del test RM-ANOVA 2 way de los grupos QCIN y QSIN.

<b>QCIN - QSIN</b>	<b>P value</b>	<b>¿Significancia?</b>
<b>Semana 0</b>	>0,9999	No
<b>Semana 2</b>	0,9967	No
<b>Semana 5</b>	0,0158	Si
<b>Semana 7</b>	>0,9999	No
<b>Semana 11</b>	0,0101	Si

**Tabla 9.** Resultados del test de Friedman del grupo QCIP.

<b>Source Of Variation</b>	<b>P value</b>	<b>¿Significancia?</b>
<b>Interacción</b>	<0,0001	Si
<b>Tiempo</b>	<0,0001	Si
<b>Tipo de Quitosano</b>	0,0003	Si

**Tabla 10.** Resultados del análisis de múltiples comparaciones del test de Friedman del grupo QCIP.

<b>QCIP - Grupo Control</b>	<b>P value</b>	<b>¿Significancia?</b>
<b>Semana 0</b>	>0,9999	No
<b>Semana 2</b>	<0,0001	Si
<b>Semana 5</b>	<0,0001	Si
<b>Semana 7</b>	<0,0001	Si
<b>Semana 11</b>	<0,0001	Si

**Tabla 11.** Resultados del test de Friedman del grupo QSIP.

<b>Source Of Variation</b>	<b>P value</b>	<b>¿Significancia?</b>
<b>Interacción</b>	<0,0001	Si
<b>Tiempo</b>	<0,0001	Si
<b>Tipo de Quitosano</b>	0,0005	Si

**Tabla 12.** Resultados del análisis de múltiples comparaciones del test de Friedman del grupo QSIP.

<b>QSIP - Grupo Control</b>	<b>P value</b>	<b>¿Significancia?</b>
<b>Semana 0</b>	>0,9999	No
<b>Semana 2</b>	<0,0001	Si
<b>Semana 5</b>	<0,0001	Si
<b>Semana 7</b>	<0,0001	Si
<b>Semana 11</b>	<0,0001	Si

## BIBLIOGRAFÍA

- **ABELLA, G.; CALLÉN, A.; FIGUERAS, S.; HERNÁNDEZ, I.; SÁNCHEZ, E.; RODRIGUEZ, V.** 2019. Complejo respiratorio porcino. PorciNews. pp: 16-20.
- **AMAR, Y.** 2012. Obtención y caracterización de un nuevo adyuvante polimérico a base de micropartículas de quitosano-carregenina para una vacuna peptídica contra la hormona liberadora de gonadotrofinas (GNRH-I). Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 22 p.
- **ANDRADA, M.; ASSUNCAO, P.; DE LA FÉ, C.; FERNÁNDEZ, A.; BÓVEDA, J.B.** 2001. Etiología de la Neumonía Enzoótica Porcina, Agentes Asociados y Epidemiología. Capitulo II. Facultad de Veterinaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Arucas. Gran Canaria. p: 31 – 45.
- **ANÓN.** 2020. Una Lesión: poliserositis, dos causas: ¿*H. parasuis* o *Mycoplasma hyorhinis*?. [en línea]. <<https://porcino.info/una-lesion-poliserositis-dos-causas-h-parasuis-o-mycoplasma-hyorhinis/>> [consulta: 15-02-2022].
- **ARAGÓN, V.; CIPRIÁN, A.; DEREU, A.; SEGALÉS, J.; SIBILA, M.** 2015. Papel del *Mycoplasma hyorhinis* en las neumonías del cerdo. **In:** Congreso Nacional AMVEC. Guanajuato, México. 29 julio - 1 agosto 2015. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. pp. 1-5.
- **AYLLÓN, S.; OLIVÉ, M.** 2019. El Complejo Respiratorio Porcino. [en línea]. España. <<https://porcino.info/complejo-respiratorio-porcino/>> [consulta: 16-01-2022].
- **BELTRÁN, F.R.; MAYA, R.M.; MIRANDA-MORALES, R.; ROJAS, T.V.; TRIGO, T.J.F.; TRUJILLO, O.M.** 2015. Aislamiento de *Mycoplasma hyorhinis* en muestras de cerdos con problemas respiratorios y articulares. **In:** Congreso Nacional AMVEC. Guanajuato, México. 29 julio - 1 agosto 2015. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. pp. 1-3.
- **BROCKMEIER, S.; HALBUR, P.; THACKER, E.** 2002. Chapter 13. Porcine Respiratory Disease Complex. In: Polymicrobial Diseases. Brogden, K.A.; Guthmiller, J.M. Washington (DC).
- **BUCAREY SERGIO, NEIRA ANDRÓNICO, NEIRA NEIRA.** PATENTE PCT/CL2016/050058: Vacuna de administración vía mucosas, para el control de las enfermedades generadas por agentes infecciosos que utilizan el

heparán sulfato (HS) como receptor celular. Presentación PCT, fecha: 3/11/2016. Solicitud (aceptada).

- **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).
- **CAMPOS-GRANADOS, C.** 2014. El sistema inmune en los mamíferos: las defensas del cuerpo. *Nutrición Animal Tropical* 8(1): 80-93.
- **CLAVIJO, M.J.; OLIVEIRA, S.; ROVIRA, A.** 2012. Development of a quantitative PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyorhinis*. **In:** Proceedings 22nd International Pig Veterinary Society Congress. Jeju, Corea. 13 junio 2012. Pp. 717.
- **CLAVIJO, M.J.; BRUNER, L.; MURRAY, D.; OLIVEIRA, S.; OLSON, S.; PEARCE, D.; ROSEY, E.; A ROVIRA, A.** 2012. *Mycoplasma hyorhinis*: qué provoca y cómo buscarlo?. **In:** Décimo quinto Foro Porcino Pfizer. Barcelona, España. 1-2 de octubre 2012.
- **CASTILLO, A.** 2017. Síntesis y caracterización de micropartículas tioladas y sulfonatadas de quitosano para la formulación de una vacuna oral contra Circovirus Porcino Tipo II (PCV2). Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 39 p.
- **CORTÉS, M.** 2009. Determinación de la inmunogenicidad provocada por quitosano como adyuvante en un modelo de vacuna peptídica Anti-GNRH. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 50 p.
- **EXPÓSITO, R.** 2010. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Memoria Grado de Doctor. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Fac. de Ciencias Biológicas. 174p.
- **GÁLVEZ, C. A.** 2017. Comparación de la bioadhesión *in vitro* de micropartículas (MP) de quitosano sulfatado (QS), tiolado (QT) y comercial (QC) en monocapas de cultivos celulares. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 54 p.

- **GARCÍA, R.** 2013. Manual de teoría microbiología veterinaria II. Editorial Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 143 p.
- **GOYACHE, J.** 2018. Introducción a la inmunología veterinaria básica y aplicada, importancia para la sanidad y la producción porcina. [en línea] <<https://porcino.info/memoria-porciforum-2018-joaquin-goyache/>> [consulta: 15-02-2022].
- **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.
- **JIMÉNEZ, M.; MARCOS, M.; MENJÓN, R.** 2019. Complejo respiratorio porcino. PorciNews. pp: 36-41.
- **KOBISCH, M.; FRIIS, N.** 1996. Swine mycoplasmoses. Rev. sci. tech. 15(4): 1569-1605.
- **LÁREZ, C.** 2015. Quitosano y nanopartículas. **In:** Lárez, C.; Koteich, S.; López, G. Nanotecnología: fundamentos y aplicaciones. Editorial Universidad de los Andes Venezuela. Mérida, Venezuela. pp. 203-222.
- **LEÓN, M.** 2011. Algunos aspectos sobre inmunología y vacunación. Consulta Difus Vet. 183: 32-36.
- **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.
- **PALOMO, I.; FERREIRA, A.; SEPÚLVEDA, C.; ROSEMBLATT, M.; VERGARA, U.** 2009. Fundamentos de inmunología básica y clínica. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. 811 p.
- **POVEDA, BJ.; RAMÍREZ, SA.; DE LA FÉ, C.; ASSUNÇÃO, P. Y DÍAZ-BERTRANA, L.** 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw Hill-Interamericana. pp.423- 430.
- **ROSALES, R.** 2013. Desarrollo de herramientas de tipificación y diagnóstico aplicadas al estudio de *Mycoplasma hyorhinis* y evaluación de un modelo experimental de neumonía en lechones. Tesis Doctoral en Ciencias

Veterinarias. Las Palmas, España. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 351 p.

- **ROSS, R.F; WHITTLESTONE, P.** 1983, Recovery of, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. **In:** Methods in mycoplasmaology. Tully, J.G; Razin, S. vol. 2, Diagnostic mycoplasmaology. Academic Press. New York, EEUU. pp. 115-127.
- **SAG.** 2021. Registro de productos farmacéuticos de uso veterinario. [en línea]. <<https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/registro-de-productos-farmacuticos-de-uso-veterinario/1770/registros>> [consulta: 22-12-2021].
- **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 23rd International Pig Veterinary Society. Cancún, México. 8-11 Junio 2014. P. 98.
- **SIBILA, M.; BLANCO-FUERTE, M.; CORREA-FIZ, F.; FRAILE, L.; ARAGON, V.** 2021. Altered Nasal Microbiota Composition Associated with Development of Polyserositis by *Mycoplasma hyorhinis*. [en línea] <<https://www.mdpi.com/2076-0817/10/5/603>> [consulta: 05-03-2022].
- **TIZARD, I. R.** 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ª ed. Elsevier España, S.L. Barcelona, España. 591 p.
- **USTULIN, M.; ROSSI, E.; VIO, D.** 2021. A case of pericarditis caused by *Mycoplasma hyorhinis* in a weaned piglet. [en línea] <<https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-021-00211-4>> [consulta: 05-03-2022].
- **VELAZCO, J. L.** 2012. Complejo respiratorio porcino (CRP). [en línea]. <<https://www.porcicultura.com/destacado/Complejo-respiratorio-porcino-%28CRP%29>> [consulta: 15-10-2021].
- **ZHANG, Q.** 1994. Glycolipid Receptors for Attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to Porcine Respiratory Ciliated Cells. Retrospective Theses and Dissertations. 171 p.