morfovirtual 2014
2do Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas.
2da Jornada Científica Virtual de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.

INMUNOGLOBULINA Y ADMINISTRADA MEDIANTE NANOCOMPUESTOS A LECHONES NEONATOS DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE CON ETEC

Fabrisio Eduardo Alustiza Fedorak[1,2], Romina Valeria Bellingeri[2], Natalia Yanina Picco[2], Carlos Eugenio Motta[1], Enzo Redondo[2], María Carolina Grosso Pratto[1,2], Adriana Beatriz Vivas Hohl[1].

[1] Docente, Fac. Agronomia y Veterinaria − Universidad Nacional de Rio Cuarto
[2] Becario CONICET

Correo electrónico del primer autor. falustiza@gmail.com

RESUMEN

La diarrea neonatal porcina causadas por *Escherichia coli* resultan en morbilidad y mortalidad significativa y son las responsables de importantes pérdidas económicas. Una alternativa al uso de antibióticos es la IgY. Para evitar daños en el anticuerpo durante el pasaje gástrico, se empleó una herramienta nanotecnológica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de la IgY, administrados en nanoestructuras basadas en hidrogeles pH-sensibles modificados con nanotubos de carbono (nanocompuestos), para prevenir diarreas neonatales en porcinos causadas por *Escherichia coli* enterotoxigénica. Síntesis y caracterización de nanocompuestos. Evaluación de la acción protectora de la IgY *in vivo* en lechones neonatos cruza Landrace x Large White: Grupos Control negativo (n=4), control vehículo (n=4, 6 partículas/animal/toma), control positivo (n=6, 2 lechones contactos sin inocular, desafío cepa ETEC 5 ml 10^{10}UFC/ml), tratamiento 1(n=6, 2 lechones contactos sin inocular ni tratar, 5 ml IgY de 60 mg/ml/toma, desafío cepa ETEC 5 ml 10^{10}UFC/ml), tratamiento 2 (n=6, 2 lechones contactos sin inocular ni tratar, IgY de 60 mg/ml en 6 partículas/animal/toma, desafío cepa ETEC 5 ml 10^{10}UFC/ml). Los compuestos de hidrogeles con 5% de NTC funcionalizados con quitosan fueron óptimos. Los lechones desafiados con ETEC y que recibieron IgY mediante compuestos hidrogel-NTC no desarrollaron diarreas y presentaron condiciones saludables comparados con los

inoculados que no recibieron IgY (100% enfermos) y los que recibieron IgY sin encapsular (1 lechón enfermo). Se concluye que la IgY administrada en compuestos Hidrogeles pH-sensibles con 5% de NTC es efectiva para la prevención de diarreas neonatales porcinas causadas por ETEC.

Palabras Clave: Diarrea Neonatal porcina, nanocompuestos, inmunoglobulina Y.

INTRODUCCIÓN

La diarrea neonatal porcina es una enfermedad multifactorial y polietiológica donde interactúan microorganismos, el medio ambiente, factores de manejo y las condiciones del hospedador. La diarrea neonatal porcina y la diarrea post-destete causadas por *E. coli* resultan en una morbilidad y mortalidad significativa y son las responsables de importantes pérdidas económicas en la cría de cerdos (Fairbrother *et al.* 2005; Nagy & Fekete 2005).

Fairbrother *et al.*, (2005) reportaron, en una revisión de casos a nivel mundial, un incremento en la incidencia y severidad de las diarreas porcinas asociadas a *E. coli*, con casos muerte repentina o por diarrea severa asociadas a cepas de *E. coli* portadoras de la fimbria F4 (K88). En Córdoba − Argentina se encontró como fimbria predominante la F6 (P987) en lechones neonatos sin sintomatología (Alustiza *et al.*, 2012).

Se ha reportado que cepas de *E. coli* aisladas de cerdos enfermos muestran amplios rangos de resistencia a diferentes antibióticos tales como apramicina, trimetroprima-sulfonamida, espectinomicina y neomicina (Maynard *et al.*, 2003). El uso preventivo y en dosis subletales para las bacterias de los antibióticos podría ser una de las razones de dicha multirresistencia.

La IgY es el anticuerpo que se halla en mayor proporción en la yema de huevos de gallinas (*Gallus domesticus*). En el año 1893, Klemperer fue el primero en describir la adquisición de inmunidad pasiva en las aves, demostrando que extractos de yema de huevos obtenidos de gallinas inmunizadas contra la toxina del tétanos fueron capaces de proteger a los ratones inoculados con dosis letales de la misma toxina (Klemperer, 1893 in Carlander, 2002). Las gallinas son excelentes productoras de anticuerpos, pero a pesar de esto es una especie subutilizada con este fin.

Se ha reportado que a valores de pH 3,5 o menos la IgY pierde irreversiblemente su actividad. Hatta *et al.*, (1993) y Lee *et al.*, (2002) reportaron hallazgos similares. En condiciones de alcalinidad, la IgY no modifica su actividad hasta valores de pH de 11 o superiores.

En cuanto a la acción proteolítica, la IgY es bastante resistente a la acción de las enzimas tripsina y la quimotripsina, pero es muy sensible a la acción de la pepsina (Hatta *et al.*,

1993). La inmunoterapia oral con IgY para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales ha sido estudiada extensamente. Por ejemplo, IgY contra rotavirus bovino en terneros y en modelos de ratones fue efectiva (Hatta *et al.*, 1993; Carlander *et al.*, 2000). Tanto la prevención como el tratamiento de las colibacilosis entéricas son un problema frecuente en los lechones y resultan en pérdidas significativas para los establecimientos de cría.

Debido a que la actividad de IgY puede destruirse o reducirse por las condiciones gástricas, fundamentalmente por el bajo pH, es necesario encontrar un método efectivo para preservar la acción terapéutica del anticuerpo durante el pasaje gástrico. Se han desarrollado técnicas de microencapsulación, utilizando diferentes estrategias y materiales, para proteger a la IgY de la inactivación gástrica (Kovacs-Nolan & Mine, 2005). Los geles son estructuras basadas en redes poliméricas tridimensionales, hidrofílicas, capaces de absorber grandes cantidades de agua o de fluidos biológicos (Li *et al.*, 2007, 2009). Se denominan hidrogeles inteligentes a aquellos que pueden responder a diferentes estímulos del medio en el que son inmersos, sean éstos físicos ó químicos (Kim *et al.*, 2002). El pH puede variar el volumen del hidrogel siempre que el hidrogel posea grupos funcionales ionizables. Se ha reportado que los polímeros de ácido acrílico se comportan como sistemas hidrofílicos, en la medida que aumentan los entrecruzamientos se van tornando insolubles, pero son capaces de hincharse. Este hinchamiento es debido a la ionización/deionización de sus grupos carboxílicos en función de cambios de pH del medio externo. Cuando el pH es bajo (pka > pH), los grupos carboxílicos están deionizados, por lo tanto están en estado colapsado. Cuando el pH es altos (pka < pH), los grupos carboxílicos se repelen entre ellos, causando el fenómeno de hinchamiento (Katime *et al.*, 2004). Estas características son deseables para aplicaciones de drogas a nivel intestinal por la vía oral, permitiendo proteger al principio activo de la actividad gástrica y facilitando su liberación en el lumen intestinal (Fernandez-Barbero *et al*., 2009).

La nanotecnología es una nueva disciplina basada en el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación controlada y aplicación de sustancias, materiales, aparatos, dispositivos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica, esto es prácticamente a niveles moleculares ó atómicos (Cintas Izarral, 2006).

Entre la infinidad de posibles aplicaciones de la nanotecnología las más destacadas se relacionan con la producción agrícola, alimentos transgénicos, procesamiento de alimentos, remediación de aguas y efluentes, entre otras (Feneque, 2003). El abordaje y estudio de la nanotecnología y sus aplicaciones debe ser interdisciplinario, así como también el análisis de sus implicancias en todos los niveles donde sea empleada.

Los nanotubos de carbono (NTC), constituyen una nueva familia de nanomateriales altamente innovadores, sus aplicaciones en sistemas biológicos y médicos han despertado mucho interés (Pantarotto *et al.*, 2003).

Los NTC han generado gran interés en medicina donde, convenientemente modificados pueden servir como sistemas de administración, vacunas o transportadores de proteínas (Escorcia *et al.*, 2007).

Para poder emplear los NTC en sistemas biológicos es necesario modificar su solubilidad y posible toxicidad, ya que por su naturaleza son hidrofóbicos. Los recientes avances en la nanotecnología, centrados en mejorar la biodisponibilidad de los NTC, permiten la funcionalización química de los mismos. Los NTC son empleados en numerosas aplicaciones biológicas, entre las cuales la entrega de drogas parecería ser un enfoque particularmente prometedor (Pantarotto *et al.*, 2003).

El quitosan es un polisacárido natural hidrofílico y lineal. Este biopolímero se encuentra principalmente en exoesqueletos de artrópodos (arácnidos, insectos y crustáceos) y en la pared celular de algunos hongos. Al ser un polímero de origen biológico ha recibido mucha atención fundamentalmente por su biodegradabilidad, por no ser tóxico, por exhibir una excelente habilidad para formar films y resulta muy económico. El quitosan es ampliamente utilizado para aplicaciones biotecnológicas y en formulaciones farmacéuticas (Peniche *et al.*, 2003). Estas propiedades se pueden sumar a la de los NTC y de esta manera funcionalizarlos para mejorar su biocompatibilidad. El objetivo del trabajos fue evaluar la capacidad de anticuerpos policlonales aviarios (IgY), administrados en nanoestructuras basadas en hidrogeles pH-sensibles modificadas con nanotubos de carbono funcionalizados con quitosan, para prevenir diarreas neonatales en porcinos causadas por *Escherichia coli* enterotoxigénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de hidrogeles pH sensible

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizaron dos monómeros: ácido acrílico y acrilamida. Como agente entrecruzador se empleó N´,N´metilen-bisacrilamida, como iniciador de la reacción se utilizó persulfato de amonio (Roth®-Art.9592.2) y como catalizador TEMED (Roth®-Art.2367.2).

Funcionalización de Nanotubos de Carbono con Quitosan

Para la funcionalización de los nanotubos 100 mg de nanotubos de carbono multipared (MWNTs) se dispersaron en 10 ml de una solución de quitosan (0.1 g de quitosan disueltos en 10 ml de una solución de ácido acético 1% con pH 2), Luego, la mezcla fue tratada bajo un campo ultrasónico por10 min y agitada por una hora. Durante este paso las moléculas de quitosan fueron adsorbidas sobre la superficie de los nanotubos, estabilizándolos.

Síntesis de los compuestos hidrogel-nanotubos

Se sintetizaron compuestos de hidrogeles con nanotubos añadiendo a la solución antes descripta un volumen de nanotubos de carbono funcionalizados con quitosan equivalente a un 1 y un 5% del volumen final de la solución de síntesis.

Caracterización de los compuestos hidrogel-nanotubos

Los compuestos de hidrogel-nanotubos fueron caracterizados evaluando los siguientes parámetros:

- Tamaño de la partícula: fue medido usando un calibre manual, se tomó el promedio de tres mediciones.
- Porcentaje de Hinchamiento= [(Ws-Wd)/Ws] x 100
- Porcentaje de contenido de agua = [(Ws-Wd)/Wd] x 100

Donde Ws (del inglés "*weight swollen*") representa el peso de los hidrogeles en su estado hinchado y Wd (del inglés "*weight dry*") es el peso de la muestra seca.

Incorporación de IgY en hidrogeles

El contenido de IgY incorporada en los hidrogeles fue evaluado por inmersión de hidrogeles secos pre-pesados (10 mg) en 5 ml de una solución de IgY (100 mg IgY/ml, en agua destilada pH=5.5) por 72 horas.

El porcentaje de incorporación de IgY se calculó con la siguiente ecuación:

Porcentaje de Incorporación de IgY = [(Whidrogel-IgY-Whidrogel)/Whidrogel] x 100

Donde Whidrogel-IgY representa el peso de hidrogeles conteniendo IgY en estado seco y Whidrogel es el peso de hidrogeles secos previo a la incorporación de IgY.

La Eficiencia de Encapsulación fue expresada como una relación entre el porcentaje de IgY incorporada en la partícula de hidrogel pH-sensible en función a la IgY total disponible en la solución de incorporación.

Animales

Se utilizaron lechones, cedidos por el criadero "Santa Eufemia" de la empresa AGD S. A., de cruzas de razas Landrace x Large White, de dos días de edad. Todos los lechones permanecieron junto a susmadres para poder calostrar. Todos los animales fueron hijos de cerdas que no recibieron la autovacuna contra *E. coli* que rutinariamente se utiliza en el criadero.

Instalaciones

Los lechones fueron trasladados al área de desafío experimental del Departamento de Reproducción Animal, FAV − UNRC. La misma contaba con condiciones ambientales controladas de ventilación, luz, humedad y temperatura (28 − 32°C). Los animales se alojaron en jaulas grupales con pisos plásticos (iguales a los del criadero) y divisorios metálicos. Además cada jaula fue individualmente calefaccionada mediante una lámpara infrarroja. Esta zona de desafío fue mantenida en condiciones libres de patógenos específicos para la especie, mediante limpieza y desinfección diaria limpiando las instalaciones con solución de hipoclorito de sodio mediante trapeo.

Manejo, crianza, pesajes

Los lechones fueron individualizados mediante caravanas plásticas en su oreja derecha, recibieron una dieta basada en sustituto lácteo (leche en polvo, multivitamínico, fase 0, fortificado con electrolitos y edulcorante) de formulación comercial (Nutrial); la ingesta del alimento se efectuó mediante administración forzada con jeringa, donde cada animal recibió 20 - 50 ml de leche por toma y el proceso se efectuó cada 4 h (6 veces/día), cada jaula contaba con un bebedero plástico con agua potable de red *ad libitum*.

Grupos experimentales

Los lechones neonatos fueron divididos al azar en cinco grupos experimentales, cada uno de los cuales se alojó en jaulas diferentes:

- Control Negativo (n=4): no desafiados ni tratados.
- Control Vehículo (n=4): no desafiados, tratados con hidrogel solo.
- Control Positivo (n=4): desafiados, no tratados. Con subgrupo contacto (n=2).
- Tratamiento 1 (n=4): desafiados, tratados con IgY (60 mg/ml) sin encapsular. Con subgrupo contacto (n=2).
- Tratamiento 2 (n=4): desafiados, tratados con IgY encapsulada (60 mg/ml). Con subgrupo contacto (n=2).

Además se utilizaron 3 subgrupos de contacto (de 2 animales cada uno). Estos animales, si bien no fueron desafiados ni recibieron tratamiento alguno, pero permanecieron en la misma jaula que los otros animales; la función de estos 3 subgrupos fue determinar si los animales se contagian o no con la ETEC (FV10188) y si presentan o no diarreas por permanecer en el mismo espacio que los animales que son inoculados.

Diseño experimental

Para los desafíos se utilizaron 5 ml de suspensión (concentración de 10^{10} UFC /ml) de ETEC con los siguientes factores de virulencia: F4 (K88+), F18, productora de STb y LT; en PBS pH 7,2 estéril, administrados por vía oral con una jeringa, mediante toma forzada.

El Tratamiento 1 consistió en una suspensión de 60 mg/ml de IgY anti-ETEC liofilizada en PBS estéril pH 7.2. El anticuerpo tenía un titulo de IgY especifica de 1/100.000 (determinado por ELISA) y un límite de detección de 12.54 ng/ml (determinado por ELISA).

Paralelamente, se realizó el monitoreo clínico de todos los animales siguiendo protocolos de ética y bienestar animal de la UNRC, atendiendo los siguientes parámetros: letargo, inapetencia, episodios diarreicos, categorización de la consistencia de la materia fecal (Sherman *et al*, 1983), ganancia de peso y rango de recuperación.

- Score de materia fecal

(0): Normal (firme y bien formada)

(1): Pastosa (anormal pero no diarrea)

(2): Semi-líquida (diarrea leve)

(3): Líquida (diarrea severa y acuosa)

- Grado de deshidratación

(0): Normal (ojos brillantes, piel flexible en la prueba del pliegue) (0-5%)

(1): Deshidratación leve (ojos hundidos, mucosas secas, prueba del pliegue persiste 3-5 seg) (6-8%)

(2): Deshidratación moderada (ojos hundidos, mucosas secas, prueba del pliegue persiste más de 10 seg,) (8-10%)

(3): Deshidratación severa o profunda (pulso débil, animal deprimido, pliegue de la piel persistente) (mayor 10% peso corporal).

Previo al sacrificio, se tomaron muestras de sangre heparinizada para citología y recuento leucocitario en cámara de Neubauer, mediante dilución el líquido de Turk. El sacrificio fue realizado mediante choque (shock) eléctrico, de acuerdo a las convenciones internacionales y acorde a protocolos del Comité de Bioética de la UNRC. En la necropsia se evaluaron daños macroscópicos y se tomaron muestras de tejidos para histopatología, que fueron conservadas en formol tamponado hasta su procesamiento, se tomaron también muestras de contenido estomacal (medición de pH) y de contenido intestinal (medición de pH, bacteriología, coproparasitología).

Preparación y montaje de cortes histológicos para microscopía óptica (MO)

Las muestras fueron sometidas al siguiente procedimiento:

Fijación Deshidratación Inclusión Desparafinado

La fijación se realizó en formol tamponado pH 7.4. Luego de la fijación de los tejidos, cada muestra fue deshidratada mediante pasaje por una batería sucesiva de alcoholes de graduación creciente (30°, 50°, 70°, 96°, 100°, 100°- xilol, xilol y xilol) empleando aproximadamente unos 5 min en cada uno de los alcoholes. Una vez deshidratados los tejidos se incluyeron en parafina (Parafina en escamas, Luis Marsan) a 56-58° C durante al menos 3 h Posteriormente se prepararon los tacos de los cuales se realizaron cortes finos de 3-4 µm en ultramicrótomo Leica Mod. JUNG RM 2065 y se montaron en portaobjetos.

Se desparafinó la muestra inmediatamente antes de usar por sucesivos pasajes en xilol (10 min), xilol (10 min), alcohol/xilol (10 min), alcohol 100° (5 min), alcohol 95° (5 min) y alcohol 80° (5 min). Se lavó con agua destilada.

Se tiñeron con hematoxilina-eosina y con el colorante diferencial Azul de Toluidina (para identificar mastocitos), se deshidrató el corte por sucesivos pasajes en alcohol de graduación creciente y xilol. Se montó y se observó al MO. Se utilizó un microscopio óptico Carl Zeizz Axiostar Plus con cámara digital Canon PowerShot G6 de 7,1 MegaPixeles.

Análisis estadístico

Para analizar los datos se utilizó el software InfoStat versión 2009. Se realizaron test de ANOVA y pruebas a posteriori de Tuckey y LSD Fisher. Para considerar diferencias significativas se fijo un valor $p<0.05$.

RESULTADOS

Porcentaje de incorporación de la IgY compuestos hidrogel-NTC

En la Tabla 1 se pueden observar diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de incorporación y en la cantidad de IgY/pastilla en compuestos con 5% de NTC funcionalizados en su formulación. Para los ensayos siguientes se utilizaron compuestos hidrogel-NTC al 5%, ya que las propiedades mecánicas de los compuestos mostraron ser altamente eficientes para el propósito del estudio.

Evaluación de la actividad protectora de la IgY sola y encapsulada en lechones en confinamiento

La Tabla 2 muestra un resumen de los datos de registrados en cada grupo de lechones. Se debe destacar que todos los animales de todos los grupos sufrieron una disminución de su peso corporal entre el primer día (adaptación) y el segundo día, seguramente debido al destete ultra-precoz al que fueron sometidos. Por ello lo que los datos de ganancia de peso y de contextura física sólo fueron considerados a partir del segundo día de comenzado el ensayo, momento a partir del cual se notó una mejoría general y, en algunos grupos, una ganancia de peso corporal.

En los animales del grupo control positivo, la diarrea se inició a las 24 h después del desafío, viéndose en uno de los animales de este grupo signos de diarrea ya a las 12 h, conjuntamente con un incremento de la temperatura corporal.

Simultáneamente los animales de contacto, pertenecientes a este mismo grupo también desarrollaron diarrea a las 24 h, lo cual indica que la permanencia en el mismo sitio entre los animales favorece la transmisión de la bacteria. La severidad de la diarrea fue variable, notándose este hecho en el score visual de materia fecal registrado ($p<0.05$), a pesar de no poder individualizar cada deposición con su correspondiente animal, las manifestaciones clínicas observadas revelaron la mencionada variabilidad. En el grupo Control Positivo, 2 de los 6 lechones (33,33%) manifestaron diarrea semilíquida (Score 2), de los cuales uno de ellos pertenecía al subgrupo contacto; mientras que el resto de los animales tuvieron diarrea liquida severa (Score 3); en todos los casos se observaron diferencias significativas con todos los otros grupos ($p<0.05$). En cuanto al grado de deshidratación de los lechones del grupo Control Positivo, se observó que en todos los casos fue de leve a moderada, igualmente se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) con los otros grupos. En general, desde el punto de vista clínico, todos los animales presentaron mucosas pálidas, retraso en la retracción de pliegue cutáneo, decaimiento y alguna alteración conductual en comparación con los animales de otros

grupos en los que no se presentó diarrea. La duración de la diarrea fue de tres días y al momento del sacrificio y necropsia todos los lechones del grupo Control Positivo y un lechón del grupo Tratamiento 1 se hallaban enfermos.

Los animales de los grupos Control Negativo y Control Vehículo, presentaron, características similares desde el punto de vista clínico. No se detectaron episodios de diarreas, no se notaron cambios en la temperatura corporal, no se observaron signos de deshidratación y todos los animales, de ambos grupos, ganaron peso al finalizar el periodo ensayado. No se observaron signos clínicos de intoxicación ni alteraciones conductuales en ninguno de los animales del grupo Control Vehículo.

En cuanto a los tratamientos, los lechones del grupo Tratamiento 1 la IgY administrada presentaba un límite de detección de 12,54 ng/ml (por ELISA IgY total) y un título de IgY específica de 1/100.000 (por ELISA IgY específico). Los animales del grupo presentaron, en general, buen aspecto físico, no se registraron temperaturas febriles ni signos manifiestos de deshidratación. La consistencia de la materia fecal fue normal en casi todos los animales, salvo uno de los lechones perteneciente al subgrupo contacto (lechón 6c). Este lechón presentó diarrea, pérdida de peso (-70 g), decaimiento, disminución del chupeteo y rechazo por el alimento, mucosas pálidas y moderado grado de deshidratación. Estos resultados muestran que, si bien la IgY ayuda a prevenir la diarrea, no es 100% efectiva si no está protegida.

En el grupo Tratamiento 2 todos los animales manifestaron aspecto saludable, con ausencia de diarreas, consistencia normal de la materia fecal, ganancia de peso en todos los lechones, sin signos observables de deshidratación. No se observó signología compatible con intoxicación. Se colectaron algunas partículas de hidrogeles-NTC administradas durante la limpieza de la sala de desafío, eliminadas mediante deposiciones. Por lo observado, notamos que la administración de la IgY en las partículas mejora su biodisponibilidad, previniendo la aparición de diarreas.

La cepa de *E. coli* administrada, se pudo recuperar de la totalidad de los cerdos inoculados. Sin embargo, en los animales de los grupos Tratamiento 1 y 2, las colonias en Agar Mac Conkey presentaron alteraciones morfológicas comparadas con las del grupo control positivo, a pesar de ello, en todos los casos se determinó la presencia de los genes que codifican a factores de virulencia de la cepa inoculada. No se detectó la presencia de ningún otro patógeno bacteriano o parasitario.

Al momento de la necropsia, en los animales del grupo Control Positivo (Figura 21), así como en un lechón del grupo Tratamiento 1 (6c) se pudo observar la presencia de abundante gas en intestino delgado. En algunos animales se observó el intestino delgado con aspecto cerebriforme y uno de los animales presentó intususcepción intestinal. No se observaron daños en órganos de la cavidad abdominal ni perforaciones o rupturas de la mucosa intestinal. Los ganglios mesentéricos y el bazo presentaron aspecto normal.

El contenido intestinal fue de color gris cemento, característico de diarreas causadas por ETEC.

De los recuento de glóbulos blancos se puede observar que en todos los animales del grupo control positivo y en uno de los lechones del grupo Tratamiento 1 (lechón 6c) hay un desvío a la izquierda de la fórmula normal para lechones de 1 semana de vida (Tabla 20). En éstos casos también se observa una leucocitosis acompañante ($p<0.05$). Si bien no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de los lechones de los otros grupos, existe una tendencia de la fórmula a desviarse a la izquierda en todos los animales que fueron desafiados con ETEC (aumento de neutrófilos).

En cuanto a los hallazgos histológicos, no se observaron diferencias entre las muestras de ninguno de los animales de un mismo grupo o entre animales de distintos grupos. En la Figura 1-A, se puede observar un montaje de duodeno (50X) de uno de los animales del grupo Tratamiento 2, no se ven alteraciones en la estructura tisular, tanto la plica como las vellosidades permanecieron íntegras.

Se pudieron observar bacterias muy cercanas a los enterocitos del ápice de una de las vellosidades (Figura 1-B, flecha), no se observan alteraciones en la cara apical de los enterocitos ni en el borde de ribete en cepillo.

Se pudieron observar células caliciformes y enterocitos de morfología normal, constituyendo el epitelio cilíndrico simple con las células caliciformes característico del intestino (Figura 1, B). También se observaron bacterias próximas o en estrecho contacto con las células epiteliales (flechas).

En cuanto a los cortes de yeyuno se observó que conservaron la integridad y morfología tisular normal en todos los casos Se pudo observar una gran cantidad de eosinófilos, alrededor de 10 eosinófilos por campo microscópico (400X), en la lámina propia (Figura 2, A y B – flechas).

Para determinar posibles respuestas alérgicas y a su vez para determinar la cantidad de mastocitos ó células cebadas infiltradas en la lámina propia, se realizó la coloración de Azul de Toluidina (Figura 3). Se halló alrededor de 1 mastocito/preparado (400X), lo cual marca la escasa cantidad de este tipo celular en el tejido, así como también marca la ausencia de respuesta alérgica, ya que no se observaron mastocitos degranulados.

En las microfotografías se puede apreciar la integridad tisular, se denotan ausencia de infiltrados leucocitarios y se puede observar la integridad de las criptas de Lieberkhum en los cortes transversales.

DISCUSION

Varios estudios han demostrado que la administración oral de anticuerpos IgY es un medio efectivo para el tratamiento y prevención de infecciones de origen bacteriano y viral (Carlander *et al.*, 2000; Hatta *et al.*, 1993; Imberechts *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2009; Mine

& Kovacs-Nolan, 2002). Sin embargo, en el estómago ocurre una inactivación que reduce marcadamente el valor terapéutico de estos anticuerpos, tanto por la acción del pH ácido como por la proteólisis por acción de la pepsina (Hatta *et al.*, 1993). Para la IgY, un método ideal de entrega debería tener alta eficiencia de encapsulación (EE), de modo de proteger la IgY de la inactivación gástrica y proveer una liberación eficiente en el intestino delgado. En este estudio se evaluaron nanoestructuras basadas en hidrogeles pH-sensibles modificadas con NTC funcionalizados con quitosan como método de transporte y entrega de la IgY.

La caracterización físico-química del sistema en estudio es un requisito necesario para garantizar las propiedades y la funcionalidad para la que se pretende utilizarlo. Entre estas características, el contenido de agua, % de hinchamiento y velocidad de hinchamiento son parámetros muy importantes. Nuestros resultados coinciden con los reportados por otros autores (Molina *et al.*, 2010; Rojas de Gáscue *et al.*, 2010), quienes utilizaron sistemas basados en copolímeros de ácido acrílico y acrilamida (AAc y AAm), entrecruzados con bisacrilamida, aunque aplicados para el transporte de drogas modelo (como la Rodamina).

Además, para hacer más eficiente la llegada del producto al lugar de acción terapéutica (ID), se utilizaron los nanotubos de carbono (NTC) que son nuevos materiales con propiedades únicas. Para expandir y optimizar el uso de los NTC en las áreas biotecnológicas es necesaria su funcionalización con biomateriales, ya que por su naturaleza tienen baja solubilidad y biocompatibilidad. Los biomateriales incluyendo biomoléculas, biopolímeros y otras bionanoestructuras han sido unidas exitosamente a los NTC. El quitosan es un biopolímero ampliamente utilizado en la investigación de biomateriales. En esta tesis se utilizó un novedoso método de decoración superficial de NTC con quitosan, descripto previamente por Liu *et al.*, (2005). La ventaja de este método con respecto a otros como la oxidados usando ácidos fuertes, procedimiento que causa la reducción de su longitud, la generación de grupos carboxílicos y un incremento de su dispersión en soluciones acuosas (Pantarotto *et al.*, 2003). Sumado a que la decoración con quitosan no introduce defectos en los NTC, tampoco permite la exposición de grupos reactivos como los carboxilatos −COOH, que aumentan su toxicidad (Luo *et al.*, 2005).

En lo que respecta a su uso en sistemas biológicos, la solubilidad es un punto crítico que de algún modo está involucrada con la biocompatibilidad de las partículas (Pantarotto *et al.*, 2003). El método de funcionalización covalente de nanotubos de carbono con quitosan, conocido también como decoración de NTC con quitosan (Liu *et al.*, 2005), aumentó significativamente su dispersión.

El compuesto hidrogel-5% NTC reveló una ventaja evidente en lo que respecta al contenido de agua, con una disminución del mismo a pH 2,2 y un aumento notable a pH mayores; pudiéndose observar una situación similar con el porcentaje de hinchamiento.

Para poder emplear el sistema *in vivo*, primeramente se caracterizó la incorporación, estabilidad y liberación de IgY *in vitro*. En cuanto a la incorporación los compuestos con 5% de NTC mostraron un porcentaje de incorporación significativamente mayor que con 1% de NTC y sin NTC.

La administración oral de IgY en inmunoterapia pasiva ha sido ampliamente estudiada en varias especies animales (Carlander *et al.*, 2000; Hatta *et al.*, 1993; Imberechts *et al.*, 1997; Kovacs-Nolan & Mine, 2012). Además, como se señaló anteriormente, uno de los mayores inconvenientes para su utilización por vía oral es su baja resistencia al pH ácido (a pH<3 pierde actividad de manera irreversible) (Hatta *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002) y a la acción de la pepsina (Hatta *et al.*, 1993); ambas barreras fisiológicas forman parte de la anatomía y funcionalidad gástrica. Por esto en el presente trabajo se emplean compuestos hidrogeles pH-sensibles - NTC (5%) para proteger a la IgY durante el pasaje gástrico y permitir su liberación en el lumen intestinal, que es el sitio en donde se desea que la IgY ejerza su efecto.

Son muy escasos los reportes en los que se utilizan en ensayos animales a los hidrogeles pH-sensibles (Rojas de Gáscue *et al.*, 2010) y los hidrogeles que responden a cambios térmicos. No se han encontrado publicaciones referidas a la utilización de hidrogeles pH-sensibles-NTC para la prevención de las diarreas neonatales porcinas.

Par estudiar la factibilidad de la aplicación del Tratamientos 1, consistente en IgY no protegida y del Tratamiento 2, consistente en nanoestructuras basadas en compuestos hidrogeles pH-sensibles con 5% de NTC, se realizaron estudios previos de inhibición de la adhesión, de la cepa de ETEC (FV10188), sobre cultivo primario de enterocitos porcinos (Bellingeri *et al.*, 2011). En el estudio de Bellingeri *et al.*, (2011) se encontró que con una dosis de 20 mg de IgY anti-ETEC/ml de medio de cultivo, se logra inhibir la adhesión de ETEC a las células en cultivo y con una dosis de 40 mg/ml dicha adherencia disminuye de forma altamente significativa. Encontramos en nuestros ensayos un resultado de 12,54 ng/ml y un título de IgY específica de 1/100.000 por ELISA.

En relación al desarrollo de diarrea, los animales del grupo Control Positivo, tanto los lechones inoculados como los animales que estaban en estrecho contacto, tuvieron diarreas semilíquida y líquida (Score 2-3), con una importante pérdida de peso corporal (Fairbrother *et al.* 2005; Nagy *et al.* 2005). Esto también indica que la bacteria se transmite entre los animales en muy poco tiempo (24 h) lo cual coincide con otros autores (Mainil, 2012; Nagy & Fekete, 2005).

No se han reportado en la literatura, según nuestro conocimiento, trabajos en los que se haya utilizado un compuesto de protección, transporte y liberación de la IgY con efectividad *in vivo* con las características y con la composición del que ha sido utilizado y presentado en este trabajo.

Uno de los lechones que estuvo expuesto a la infección por contacto en el grupo Tratamiento 1 (lechón 6c) también desarrolló diarrea y presentó una signología clínica similar a los animales del grupo Control Positivo. Este hecho demuestra que si bien la IgY protege reduciendo la aparición de diarreas (Li *et al.*, 2009), su acción protectora no es un 100% efectiva cuando la inmunoglobulina no está protegida de la acción de los factores gástricos (pH ácido y pepsina). Los lechones pertenecientes al grupo Tratamiento 2 presentaron una ganancia de peso significativamente mayor ($p<0.05$) que la del grupo Control Positivo, registrándose valores que fueron incluso más altos que los del grupo Control Negativo. Todos los animales del subgrupo de contacto no desarrollaron diarreas ni sintomatología de la enfermedad.

No se encontraron daños tisulares intestinales en ninguno de los grupos de lechones del ensayo. Se han identificado bacterias en estrecho contacto con las células epiteliales intestinales (enterocitos) del ápice de algunas vellosidades del duodeno de animales inoculados, si bien la tinción no permite identificar las bacterias, este fenómeno se vio muy bien en todos los lechones desafiados, pero no en los controles.

Hemos evidenciado la presencia de gran cantidad de eosinófilos (alrededor de 10/campo, 400X) en la lámina propia del yeyuno de todos los lechones examinados en el ensayo. Este dato coincide con lo publicado por Rothkotter *et al.*, (1994), quienes afirman que en el yeyuno e íleon de lechones de 5 días de vida alrededor del 10% de las células que forman la lámina propia son eosinófilos y su función es el desarrollo de una respuesta inmune no específica a los antígenos que se presentan en intestino luego del nacimiento. Estos autores reportan que en los seres humanos recién nacidos sucede lo mismo que en los lechones con respecto a la presencia de eosinófilos en la LP durante los primeros días de vida (Rothkotter *et al.*, 1994). Para diferenciar la presencia de mastocitos de los eosinófilos, así como también para observar si existe reacción de tipo alérgica en los lechones de los distintos tratamientos se realizó la coloración diferencial de Azul de Touidina. Se encontró alrededor de solamente un mastocito por preparado en la LP indicando la ausencia de reacciones de tipo alérgicas mediadas por estas células. Estos hallazgos también coinciden con Rothkotter *et al.*, (1994), quienes además reportaron que a los cinco días de vida prácticamente no se encuentran mastocitos en LP mientras que a los 14 días de vida, esta fracción celular se ve significativamente incrementada. Los autores también observaron que estos grados de madurez del aparato digestivo porcino se corresponden con los del ser humano de alrededor de aproximadamente la misma edad (Rothkotter *et al.*, 1994).

Los presentes resultados sugieren que la IgY es efectiva para la prevención de diarreas neonatales porcinas causadas por ETEC, utilizada en las condiciones experimentales de este trabajo. La utilización de las herramientas que brinda la nanotecnología, como en este caso de nanoestructuras basadas en Hidrogeles pH-sensibles con 5% de NTC, mejora

notablemente la eficiencia del anticuerpo en la prevención de la enteropatía, fundamentalmente debido a que el agregado de NTC mejora las propiedades mecánicas del sistema haciéndolo más eficiente. Por otro lado, el modelo animal establecido puede emular apropiadamente las condiciones y responder de manera similar a los humanos a la infección. Las especies usadas habitualmente como modelos animales, si bien son de fácil manipulación (ratas, ratones, perros, etc.) no reproducen fielmente las características de los seres humanos. Los cerdos son similares a los seres humanos en términos de la anatomía, genética y fisiología (Meurens *et al*., 2012). En relación a la similitud del aparato digestivo porcino con el del humano, tanto el modelo utilizado y puesto a punto como los resultados logrados podrían emplearse como el inicio de una investigación en el empleo de la IgY en humanos.

CONCLUSIONES

- El proceso de funcionalización de NTC con quitosan mostró ser un buen método de solubilización, se observaron por FTIR interacciones químicas entre el polímero y los NTC.
- La incorporación de NTC funcionalizados con quitosan a los hidrogeles pH-sensibles mejora sus propiedades mecánicas (porcentaje de hinchamiento, contenido de agua, comportamiento en soluciones de diferentes valores de pH y cinética de hinchamiento).
- Los hidrogeles mostraron un buen porcentaje de incorporación de IgY, protegen a la proteína de la acción del pH ácido y liberan parte de su contenido en condiciones similares al intestino (en FGS y FIS).
- La espectroscopía infrarrojo transformada de Fourier es una buena técnica para caracterizar interacciones entre la nanoestructuras y la IgY a vehiculizar.
- La IgY específica anti-ETEC cepa FV 10188 administrada por vía oral vehiculizada en nanoestructuras basadas en hidrogeles pH-sensibles con nanotubos de carbono disminuyó las diarreas causadas por la inoculación de la cepa homóloga en lechones neonatos, mientras que la misma IgY administrada oralmente sin vehiculizar con los citados hidrogeles no protegió a la totalidad de los lechones desafiados.

- Las nanoestructuras basadas en hidrogeles pH-con nanotubos de carbono funcionalizados con quitosan son una herramienta de transporte, protección y liberación de IgY útil que podría ser utilizada en terapia oral.

BIBLIOGRAFÍA

Alustiza F, Picco N, Bellingeri R, Terzolo H, Vivas, A. 2012. *Revista Argentina de Microbiología* 44: 250-254.

Escorcia F, McDevitt M, Villa C, Scheinberg D. 2007. *Nanomedicine* 2 (6):805-15

Fairbrother J, Nadeau E, Gyles C. 2005. *Animal Health Research Revission* 6:17-39.

Fekete P, Gerardin J, Jacquemin E, Mainil J, Nagy B. 2002. *Veterinary Microbiology* 85: 275-284.

Feneque J. 2003. Nanotechnology Now. On line: http://www.nanotech now.com/ Jose Feneque/Veterinary Applications Nanotechnology.htm.

Fernández-Barbero A, Suárez I, Sierra-Martín B, Fernández-Nieves A, Javier de las Nieves B, Marquez M, Rubio-Retama J, López-Cabarcos E. 2009. *Advances in Colloid and Interface Science* 147–148: 88–108

Hatta H, Kapoor MP, Juneja LR. 2008. In *Egg Bioscience and Biotechnology,* ed. Y Mine, pp. 185–237. Hoboken, NJ: John Wiley Sons, Inc.

Imberechts H, Deprez P, Van Driessche E, Pohl P. 1997. *Veterinary Microbiology* 54:329-341.

Katime D, Katime O, Katime I. Servicio editorial de la Universidad del país Vasco. 2004. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228.

Katime I. 2000. *Revista iberoamericana de polímeros* 5(5):10

Kim S, Park S, Mi-Seon S, Kim S. 2002.. *Journal of Applied Polymer Science* 86(9): 2290-2295.

Kovacs-Nolan J & Mine Y. 2004. *Food Biotechnology* 18: 39-62.

Kovacs-Nolan J & Mine Y. 2005. *Journal of Immunological Methods* 296: 199-209.

Kovacs-Nolan,J, Marshall P y Mine Y. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:8421-8431.

Kovacs-Nolan J & Mine Y. 2012. *Annual Reviews of Food Sciences Technology* 3:163–82

Li X, Jin LJ,McAllister TA, Stanford K, Xu JY, *et al.* 2007. *Journal Agricultural Food Chemistry* 55:2911−17

Li X, Jin LJ, Uzonna JE, Li SY, Liu JJ, et al. 2009. Veterinary Immunology Immunopathology 129:132−36

Liu Y, Tang J, Chen X, Xin J. 2005. *Carbon* 43: 3178-3180.

Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdts V. 2012. *Trends in Microbiology* 20 (1). doi:10.1016/j.tim.2011.11.002

MolinaM, Rivarola C, Barbero C. (2010). *Molecular Crystal Liquid Crystals* 521:265-271

Nagy B, Fekete P. 2005.. *International Journal of Medical Microbiology* 295:443-454.

Pantarotto D, Partidos CD, Graff R, Hoebeke J, Briand J, Prato M, Bianco A. 2003. Journal of the American Chemical Society 125(20):6160-6164.

Peniche C, Fernandez M, Gallardo A, Loópez-Bravo A, Román J. 2003. *Macromolecular Bioscience* 3:540−545.

Rothkotter H, Kirchhoff T, Pabst R. 1994. Gut 35: 1582-1589

Sherman D, Acres S, Sadowski P, Springer J, Bray B, Raybould T, Muscoplat C, 1983. Infectology Immunology 42, 653−658.

Tabla 1: Porcentaje de incorporación y concentraciones de IgY en los distintos compuestos hidrogel-NTC

Compuesto hidrogel-NTC	Porcentaje incorporación (%)	mg IgY/pastilla de gel	mg IgY/pastilla de gel
Gel - 0 % CNT	88,90 ± 8,92[a]	5,53 ± 0,57[c]	0,83 ± 0,02
Gel - 1 % CNT	102,05 ± 10,50[ab]	8,30 ± 0,85[b]	0,86 ± 0,02
Gel - 5 % CNT	131,33 ± 8,90[c]	7,70 ± 0,53[c]	0,86 ± 0,02

Los datos son presentados como media ± desvío estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05). Test de Tukey, Infostat, 2009.

Tabla 18: Datos ensayo in vivo en lechones en confinamiento

GRUPOS		DIARREA			GANANCIA PESO (g)	T° RECTAL (°C)	
		SI/NO	Score	Desh.		Inicial	Final
CONTROL – (n=4)	1♀	NO	0[A]	0[A]	100[a]	37.9 [a]	38 [c]
	2♂	NO	0 [A]	0 [A]	150 [a]	37.6 [a]	38 [c]
	3♀	NO	0 [A]	0 [A]	340 [a]	38 [a]	38 [c]
	4♂	NO	0 [A]	0 [A]	300 [a]	37.8 [a]	38 [c]
CONTROL VEHICULO (n=4) 6 partículas hidrogel-NTC	1♀	NO	0 [A]	0 [A]	275 [a]	37.5 [a]	38 [bc]
	2♂	NO	0 [A]	0 [A]	200 [a]	37.8 [a]	38 [bc]
	3♂	NO	0 [A]	0 [A]	350 [a]	37.5 [a]	38 [bc]
	4♂	NO	0 [A]	0 [A]	150 [a]	38.1 [a]	38 [bc]
INOCULADAS 5 ml [illegible] CONTROL + (n=4)	1♀	SI	3 [B]	2 [B]	-300 [b]	38.3 [a]	39. 4 [a]
	2♂	SI	3 [B]	2 [B]	-200 [b]	37.5 [a]	39.2 [a]

			3♀	SI	2 ^{B}	1 ^{B}	-200 ^{b}	38.3 ^{a}	38.3 ^{a}
			4♀	SI	3 ^{B}	2 ^{B}	-350 ^{b}	37.7 ^{a}	39.2 ^{a}
		Contacto	5c♀	SI	2 ^{B}	1 ^{B}	-150 ^{b}	37.6 ^{a}	39.1 ^{a}
			6c♀	SI	3 ^{B}	2 ^{B}	-200 ^{b}	37.8 ^{a}	39 ^{a}
	TRATAMIENTO 1 (n=4) IgY anti-ETEC 5 ml (60 mg/ml)		1♂	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	200 ^{a}	38 ^{a}	38.1 ^{b}
			2♂	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	400 ^{a}	38.3 ^{a}	38.9 ^{b}
			3♀	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	250 ^{a}	37 ^{a}	37.7 ^{b}
			4♀	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	150 ^{a}	37.9 ^{a}	38.6 ^{b}
		Contacto	5c♀	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	350 ^{a}	38.1 ^{a}	38.5 ^{b}
			6c♂	SI	3 ^{B}	2 ^{B}	-70 ^{b}	37.9 ^{a}	38.5 ^{b}
	TRATAMIENTO 2 6 partículas hidrogel-NTC con IgY anti-ETEC 5 ml (60 mg/ml)		1♂	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	450 ^{a}	38 ^{a}	38.5 ^{bc}
			2♂	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	300 ^{a}	37.5 ^{a}	38.6 ^{bc}
			3♀	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	450 ^{a}	37.6 ^{a}	38.4 ^{bc}
			4♀	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	350 ^{a}	37.8 ^{a}	38 ^{bc}
		Contacto	5c♀	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	350 ^{a}	37 ^{a}	38.2 ^{bc}
			6c♂0	NO	0 ^{A}	0 ^{A}	150 ^{a}	37.2 ^{a}	38.1 ^{bc}

Score: Test Kruscal Wallis, letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$), Deshidratación (Desh.): Test Kruscal Wallis, letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$). Ganancia Peso: ANOVA, LSD Fischer letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$), T° Rectal: ANOVA, LSD Fischer letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

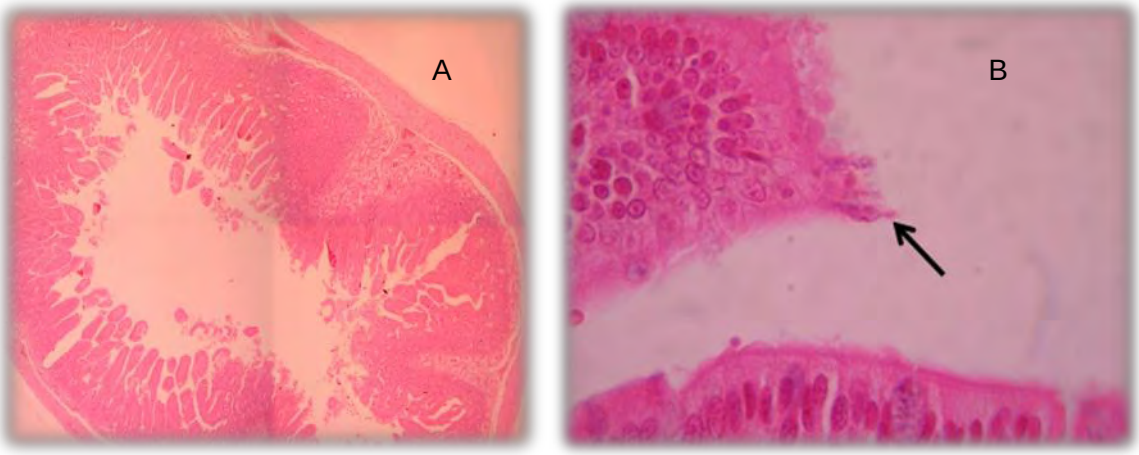

Figura 1: Microfotografia de corte histológico H/E. A montaje de duodeno (50X) lechón del grupo Tratamiento 2. B Ápice de vellosidad duodenal (1000X) de un lechón del mismo grupo, bacterias en contacto con enterocitos (flecha).

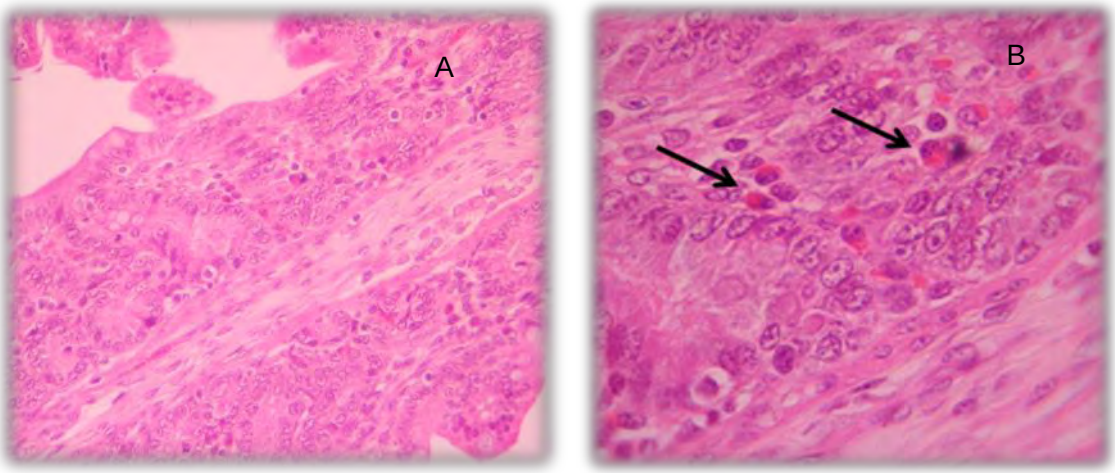

Figura 2: Microfotografía de corte histológico de yeyuno H/E. A vellosidad (400X). B lámina propia (1000X), se observan abundantes Eosinófilos (flechas).

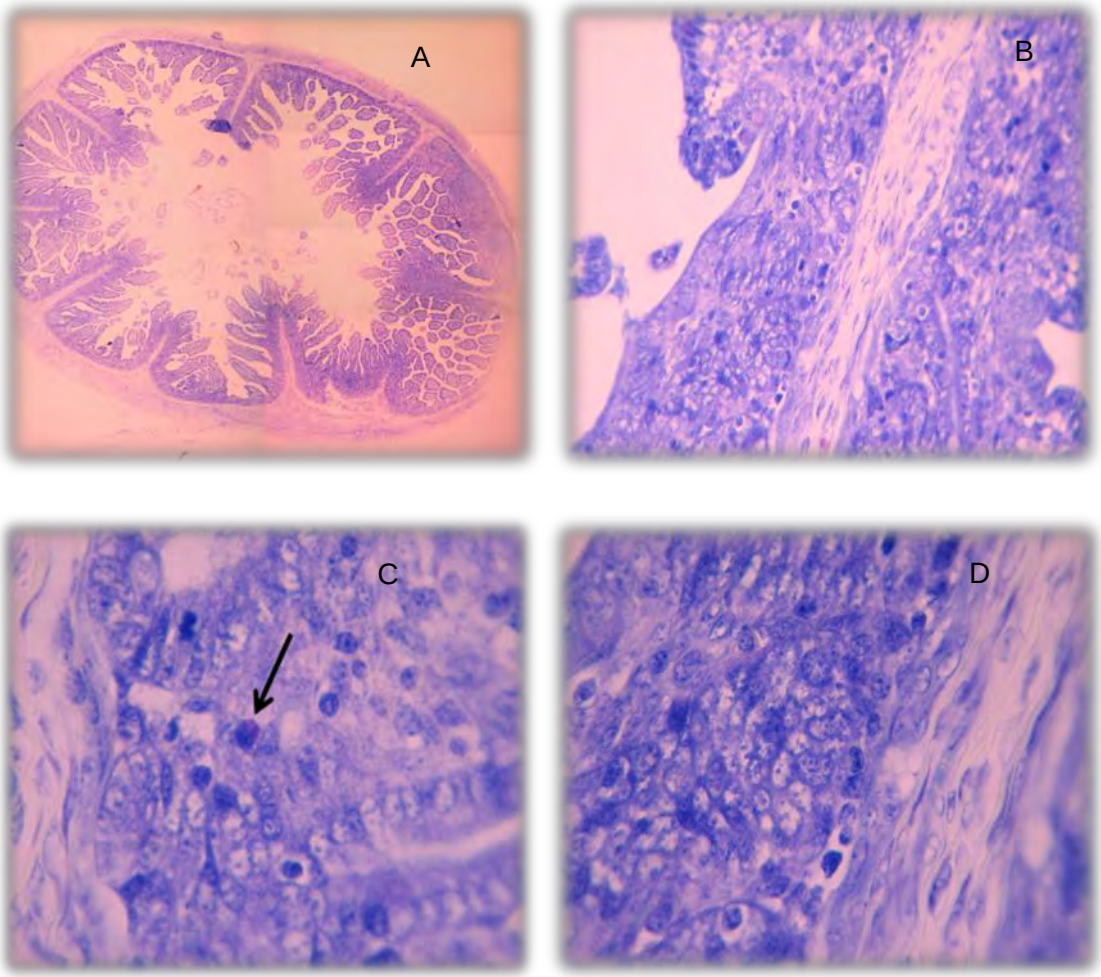

Figura 3: Microfotografía corte histológico de yeyuno A/T lechón Control Vehículo. A montaje yeyuno (50X). B vellosidad (400X). C lámina propia (1000X), se observa un mastocito (flecha). D lámina propia (1000X).