



## Optimización de la respuesta inmune a nivel de mucosas a través de la vehiculización de antígenos en microesferas biodegradables

Defain Tesoriero, M.V. <sup>(i)</sup>; Piscitelli, H.G. <sup>(ii)</sup>; Hermida, L.G. <sup>(i)</sup>; Zbrun, M.V. <sup>(ii)</sup>; Raviolo, J.M. <sup>(iii)</sup>; Zielinski, G.C. <sup>(ii)</sup>

<sup>(i)</sup>INTI-Química

<sup>(ii)</sup>Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez, INTA, Marcos Juárez

<sup>(iii)</sup>Departamento de Patología Animal, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba

### Introducción

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una enfermedad contagiosa aguda que afecta a la cornea y tejidos subyacentes. Provoca serios perjuicios económicos debido a la disminución de la producción de los animales y al alto costo de los medicamentos así como a la mano de obra para realizar dichos tratamientos. El agente etiológico es una bacteria gram (-), *Moraxella bovis* (Mb), caracterizada por su capacidad de colonizar la cornea mediante pili de adherencia que le permite unirse al tejido y comenzar a liberar sus toxinas. Para su prevención se utilizan diversos inmunógenos a campo con resultados variables, siendo el tratamiento antibiótico el que brinda de mejor resultado para controlar la enfermedad.

La falta de eficiencia de los inmunógenos actualmente en uso para la prevención de la QIB puede deberse en parte a que la vía de administración convencional no genera una adecuada respuesta inmune a nivel de mucosa conjuntival y epitelio corneal, órganos blancos del agente etiológico *Moraxella bovis*.

El objetivo de este trabajo es obtener antígenos purificados y microencapsulados de proteínas piliarias de *Moraxella bovis* (Mb) que sean aptos para la administración intranasal en bovinos a fin de estimular una respuesta inmune local a nivel de los epitelios oculares, que sea efectiva en la prevención de la QIB.

### Metodología / Descripción Experimental

**Purificación de pili.** Se cultivaron cepas conocidas de Mb (Epp 63 y Mb 1194 04), y se seleccionaron los cultivos que expresaron *pili* (Ver Fig. 1). Se aislaron las colonias desarrolladas, se las suspendió en buffer etanolamina (Eth) 0.15M y se homogeneizaron a 30.000 RPM por 10' en baño de hielo. Luego de sucesivas centrifugaciones se precipitó la

proteína piliar con sulfato de amonio. El precipitado obtenido se lavó y se dializó por 24 hs contra buffer ClNa-Tris 0,15 M bajo agitación. Luego de una nueva centrifugación, se suspendió el pellet en buffer Eth o PBS, midiéndose la concentración proteica por el método de Lowry. Las preparaciones piliarias se verificaron por SDS-PAGE, debiéndose obtener bandas del orden de los 18-20KD de peso molecular, según literatura conocida. <sup>[1]</sup>



Fig. 1: Microfotografías electrónicas de *Moraxella bovis* piliada (20.000 X) (izq) y su fase no piliada (15.000 X) (der)

### Obtención de microesferas biodegradables.

Las microesferas fueron preparadas según el procedimiento de doble emulsión y evaporación con solvente. Brevemente, se utilizó como fase interna (W1) las purificaciones piliarias de Mb. La fase orgánica, una solución de polímero poli-láctico-co-glicólico (PLGA) en diclorometano (O), se homogeneizó con la W1 utilizando un homogenizador (Heidolph 900X). La emulsión obtenida (W1/O) se agregó a la fase externa (W2), alcohol polivinílico (PVA) al 1% y se emulsionó nuevamente. La evaporación del diclorometano se realizó por agitación vigorosa de la emulsión W1/O/W2. Las microesferas obtenidas fueron lavadas, liofilizadas y almacenadas a 4°C. <sup>[2] [3]</sup>

## Resultados

Se obtuvieron purificaciones piliarias con concentraciones proteicas variables entre los 140 y 1.700 µg/ml, según la cepa utilizada.

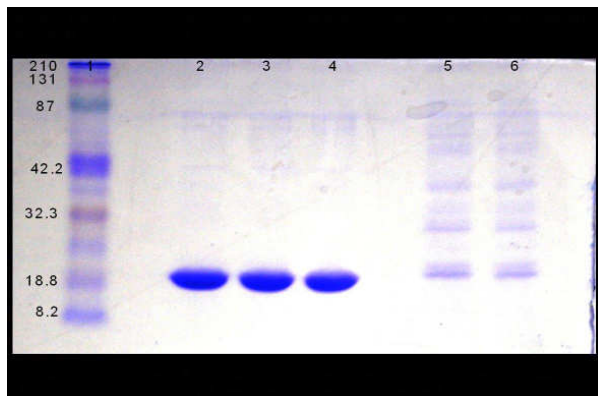


Fig. 2: SDS-PAGE de pili purificados de *Moraxella bovis* Mb 1194 04. Calle 1: Standard PM. Calle 2, 3 y 4: Purificación pili *Moraxella bovis* cepa MB 1194 04. Calle 5 y 6: *Moraxella bovis* soma intacto, piliado.

La electroforesis por SDS-PAGE reveló un alto grado de pureza en la purificación de los pili, observándose dos bandas: una de 18KD y otra de 20KD de peso molecular correspondientes a la cepa EPP63, compatibles con los subtipos Q é I de pili (no mostrado), mientras que el pili purificado de la cepa Mb 1194 04 dio como resultado una sola banda de 18KD (Ver Fig. 2).

Se ajustaron variables de proceso como la relación de fases, la concentración de polímero, velocidad de homogenización de modo de obtener microesferas en forma reproducible (Ver Fig. 3) Los % de entrapamiento de proteína piliar que se obtuvieron estuvieron en el rango de 38 a 100 µg/100 mg de microesferas.

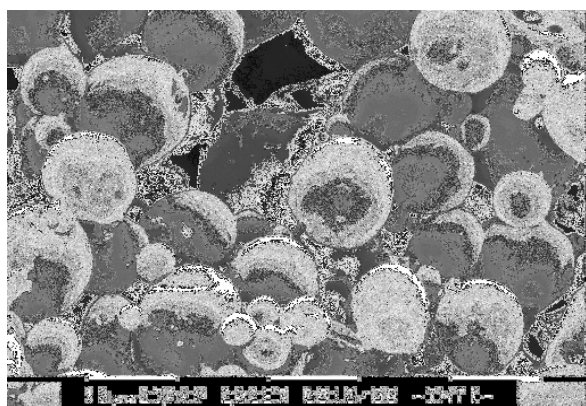


Fig. 3: Microfotografía electrónica de barrido de las microesferas

No existiría alteración de las proteínas luego del proceso de microencapsulación ya que al realizar la digestión alcalina de las microesferas, la proteína liberada muestra las bandas

características (18 y 20 KDa) en la SDS-PAGE (Ver Fig. 4)



Fig. 4: SDS-PAGE de extractos piliarios liberados del entrapamiento

Además, los resultados obtenidos por Inmunoblot de los extractos de pili luego del proceso de microencapsulación muestran que se mantiene la antigenicidad de la proteína. (Ver Fig. 5)



Fig. 5: Inmunoblot de extractos piliarios luego del proceso de microencapsulación. Calles: 1. standard de peso molecular; 2. control negativo; 3-7. extractos de pili microencapsulado; 8-9: pili no microencapsulado.

## Conclusiones

En base a los resultados obtenidos podría especularse que la proteína piliar liberada a partir de las microesferas mantiene su conformación antigénica respecto a su conformación nativa. De este modo las microesferas podrían ser capturadas por las células presentadoras de antígenos a fin de ser procesadas por el sistema inmune. Estos hallazgos permiten y estimulan la prosecución de esta línea de trabajo en pos de verificar la inmunogenicidad *in vivo* de las microesferas cargadas con proteína piliar u otros antígenos.

## Referencias

- [1] Ruehl y cols. J. Exp. Med. 168:983-1002, 1988
- [2] Griffin y cols. Vaccine, 20:3650-57, 2002
- [3] Vajdy y O'Hagan Adv. Drug Del. Rev. 51:127-141, 2001

Para mayor información contactarse con:

María Victoria Defain Tesoriero – [mvd@inti.gov.ar](mailto:mvd@inti.gov.ar)

ombre del autor de contacto – [autor\\_contacto@inti.gov.ar](mailto:autor_contacto@inti.gov.ar)