Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

Inmunoglobulinas séricas porcinas: Purificación, generación de concentrados estables y caracterización parcial de la adhesión de patógenos porcinos a sus estructuras oligosacáridas

Por

GABRIELA RAMOS CLAMONT MONTFORT

Tesis aprobada por la

COORDINACION DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora **Diciembre de 2003**

APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Maestra en Ciencias Gabriela Ramos Clamont Montfort, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.

Dra. Luz Vázquez Moreno
Directora de Tesis

Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto

Dra. María del Carmen Candia Plata

Dra. Evelia Acedo Felix

Dr. Roberto Guzmán Zamudio

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos obtenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.

Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Este agradecimiento quiere dar cabida en general a tantas y tantas personas que de alguna u otra manera me apoyaron durante todo este tiempo. En particular a todas aquellas cuya participación fue fundamental para lograr mi tesis.

Mis primeras letras para la Dra. Luz Vázquez Moreno, cuyo apoyo incondicional hizo posible la realización de un sueño. Agradezco con admiración y respeto el privilegio de contar con la luz de su inteligencia y con su visión innovadora. Gracias por compartir sus conocimientos sencilla y alegremente y por su nobleza de espíritu que también es enseñanza.

Así mismo expreso mi gratitud a los miembros de mi Comité de Tesis. Al Dr. Roberto Guzmán, a la Dra. Evelia Acedo y a la Dra. Elisa Valenzuela por el valioso regalo de sus conocimientos, su ayuda constante y su disposición permanente al logro de los objetivos de esta tesis. También a la Dra. Carmen Candia por sus investigaciones previas y por las valiosas ideas que aportó para la realización del proyecto.

Al personal de Ciencia de los Alimentos, del cual me siento genuinamente orgullosa de pertenecer. Agradezco su amistad y su ayuda desinteresada. Especialmente el apoyo técnico recibido por la M.C. Ciria Figueroa, la QB. María Eugenia Flores y la MC Carmen Bermúdez. También el de la M.C. Ana María Guzmán y la M.C. Refugio Robles. Gracias a Marisa Pérez, Ana Isabel Escobedo, Hector Galindo, Katalina Moraga, Hector Cota, Olivia Briceño, Elsa Bringas y Mónica Villegas por su ayuda continua.

Al Dr. Alfonso Gardea, al Dr. Juan Pedro Cammou y a la Dra Ana María Calderón

Mi gratitud por ese apoyo tan precioso que dejaron sentir los familiares y los amigos que enriquecen mi vida. Esas grandes personas que me motivaron y me dieron aliento en el camino y que no pueden pasar desapercibidos:
Mi madre Cristina Montfort, mis hermanos Cristina y Carlos, Mónica, Lucia, Marcial, Alfonso, Lulu y Emilu. Gabriela, Carlos y Juanita Montfort. Luz Vázquez, Raquel, Alba y Lidia Baez, Silvia Fernández, Marina de la Rosa, Marcia y Paty Moreno, Angélica Espinosa, Martha Elba Lozano, Guadalupe Candelas, Olivia Briceño, Maru Flores, Leticia Miranda, Elisa Valenzuela, Evelia Acedo, Carmen Bermúdez, Verónica Mata y Roxana Velasco

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a quienes con su apoyo, comprensión y paciencia han hecho posible para mí la realización de un anhelo que me llena de alegría. A mi madre Cristina Montfort, por tocar nuestras almas con su alegría, por contagiarnos su entusiasmo, su luz y su valentía y por su lucha y sacrificios en pos de alcanzar los ideales de sus hijos. A mis hermanas Cristina, Mónica y Lucia cuyo cariño y alegría son un motorcito para seguir adelante. A mis hermanos Alfonso y Marcial por su apoyo incondicional y a mis cuñados por cargar con todos. A Carlitos Alatorre, Luisa Fernanda, Ana Crista, Paulina, Alfonso, Sofia, el niño Marcial y al joven Eduardo que son nuestro orgullo y futuro. A mi papá. A Gabriela Montfort y a todos mis abuelos, especialmente Charles y Juanita cuya esencia vive en nuestros corazones.

INDICE

	página
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
CAPITULO I	1
I.1 INTRODUCCION	1
I.2 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
I.2.1 La industria porcícola sonorense: importancia y problemática ambiental	3
I.2.2 Lactancia y destete de lechones	4
I.2.2.1 Lactancia	5
I.2.3 Problemas entéricos en lechones	6
I.3 OBJETIVOS	8
I.4 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	9
CAPITULO II : AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS PORCINAS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (HIC)	10
II.1. INTRODUCCIÓN	10
II.1.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica	10
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
II.2.1 Obtención de calostro y suero porcinos	11
II.2.2 Cuantificación de inmunoglobulinas por inmunodifusión radial	12
II. 2.3 Cromatografía de Hidrofobicidad	12
II.2.3.1. Matrices cromatográficas	12
II.2.3.2 Esquema cromatográfico para el aislamiento de inmunoglobulinas porcinas	13
II.2.3.3 Capacidades de adsorción de las matrices	14
II.3 Electroforesis SDS PAGE y cuantificación por IR de las Ig´s	15
II.4 Adsorción específica de inmunoglobulinas porcinas a Sefarosa HA y Novarosa EDA-HA	15
II.5 Ensayo de inmunodetección en las fracciones cromatográficas	15
II.6 Caracterización de Sefarosa HA	16
II.6.1 Consideraciones para el escalamiento	16

II.6.2 Escalamiento 16
II.6.3 Comparación de Sefarosa HA con gel T 16

II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17

II.3.1 Concentración de Inmunoglobulinas 17

II.3.2 Cromatografía de Hidrofobicidad 19

II.3.2.1 Aislamiento de Inmunoglobulinas porcinas 19
II.3.2.2 Capacidades adsortivas de las matrices 21

II.3.3 Electroforesis SDS PAGE y cuantificación por IR de las Igs 27

II.3.4 Adsorción específica de inmunoglobulinas porcinas a Sefarosa HA y Novarosa EDA-HA 31

II.3.5 Ensayo de inmunodetección en las fracciones cromatográficas 33

II.3.6 Consideraciones para el escalamiento 34

II.3.7. Escalamiento a nivel laboratorio del aislamiento de Inmunoglobulinas séricas porcinas 37

II.3.8 Comparación de Sefarosa HA con Gel T 42

CAPITULO III : PREPARACIÓN DE CONCENTRADOS DE INMUNOGLOBULINAS Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA PARCIAL DE LA FRACCIÓN ALBÚMINA 47

III.1 INTRUDUCCIÓN 47

II.1.1 Preparaciones orales de inmunoglobulinas 47

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS 48

III.2.2 Preparación y análisis microbiológico de concentrados de inmunoglobulinas 48

III.2.2 Interacción entre inmunoglobulinas porcinas y *E. coli* K88 49

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 49

III.3.1 Preparación de concentrados de Ig's 49

III.3.2 Interacción de las Ig's porcinas con *E. coli* K88 51

CAPITULO IV: PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS PORCINAS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD, CARACTERIZACION PARCIAL DE SUS ESTRUCTURAS OLIGOSACÁRIDAS Y DE LA INTERACCIÓN *IN VITRO* DE PATÓGENOS ENTERICOS PORCINOS, A ÉSTAS 54

IV.1 INTRODUCCIÓN 54

IV.1.1 Diarreas en cerdos

IV.1.1.1 Colibacilosis 55
IV.1.1.2 Salmonelosis 55

IV.1.2 Factores bacterianos que promueven la colonización de las células eucariotas 56

IV.1.2.1 Adhesinas fimbriales 57
IV.1.2.2 Consideraciones para realizar estudios de adhesión de bacterias 58

IV.1.3 Medidas preventivas para combatir las diarreas porcinas 59

IV.1.4. Inmunoglobulinas porcinas 60
IV. 1.4.1 Características estructurales 60
IV.4.1.2 Importancia de los oligosacáridos de las inmunoglobulinas 62

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS 63

IV.2.1. Purificación de IgA, IgG e IgM por cromatografía de afinidad 63

IV.2.2 Caracterización parcial de los oligosacáridos de las inmunoglobulinas 64

IV.2.2.1 Ensayos de manchas y lectinoensayos 64
IV.2.2.2 Determinación de la presencia de O-glicanos en las Inmunoglobulinas porcinas 65

IV.2.3 Interacción *in vitro* de las inmunoglobulinas porcinas con las adhesinas de *Escherichia coli* K 88 y *Salmonella choleraesuis* 66

IV.2.3.1 Cultivo y biotinilación de bacterias 66
IV.2.3.2 Ensayo de manchas 66
IV.2.3.3. Interacción con inmunoglobulinas disociadas 67
IV.2.3.4 Actividad hemaglutinante de las adhesinas de E. coli y S. choleraesuis en eritrocitos de lechón y cerdo adulto 67

IV.3 RESULTADOS 68

IV.3.1.Purificación de IgA, IgG e IgM por cromatografía de afinidad 68

IV.3.2.Ensayos de Manchas 73

IV.3.2.1. Ensayo de manchas para IgA 73

IV.3.2.2. Ensayo de manchas para IgG 79
IV.3.2.3. Ensayo de manchas para IgM 82

IV.3.3 Lectinoensayos 84

IV.3.4 Interacción *in vitro* de las Inmunoglobulinas porcinas con *E. coli* K88 y *Salmonella choleraesuis* 87

IV.3.4.1 Interacción con E. coli K88 87
IV.3.4.2 Interacción con Salonella choleraesuis 93
IV.3.4.3 Actividad hemaglutinante de las adhesinas de E. coli K88 y S. choleraesuis en eritrocitos de lechón y cerdo adulto 95

CAPITULO V : RESUMEN DE HALLAZGOS Y CONCLUSIONES 98

CAPITULO VI : REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 102

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de trabajo para el estudio de inmunoglobulinas porcinas	9
2	Efecto de la época del año en la concentración de inmunoglobulinas calostrales	20
3	Efecto de la época del año en la concentración de inmunoglobulinas séricas	20
4	Cromatograma del aislamiento de inmunoglobulinas	21
5	Capacidad frontal de las matrices estudiadas	22
6	Influencia de la velocidad del flujo en la capacidad dinámica de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA	24
7	Comportamiento de la adsorción de proteínas en Sefarosa HA	25
8	Electroforesis SDS PAGE de las fracciones proteicas obtenidas de Sefarosa HA	27
9	Electroforesis SDS PAGE de las fracciones séricas porcinas obtenidas de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA	28
10	Electroforesis SDS PAGE de las fracciones de calostro obtenidas de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA	30
11	Patrón cromatográfico típico de la adsorción específica de Igs séricas Porcinas a las matrices de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA	32
12	Capacidad de adsorción de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA para aislados de inmunoglobulinas séricas porcinas	32
13	Ensayo de inmunodetección de la fracción de elución de Sefarosa HA al aplicar proteínas séricas	33
14	Influencia del tiempo de almacenamiento de la agarosa en la capacidad de adsorción de Sefarosa HA	36
15	Influencia del tiempo de acetilación en la capacidad de adsorción de Sefarosa-HA	37
16	Influencia del volumen de cama y de la concentración de proteína aplicada sobre la capacidad de Sefarosa HA	38

17	Isoterma de adsorción de las inmunoglobulinas porcinas en Sefarosa HA.....	40
18	Resolución de Sefarosa HA a diferente concentración de proteínas séricas aplicadas.....	41
19	Capacidad de adsorción de inmunoglobulinas de Sefarosa HA y gel T	43
20	Electroforesis SDS PAGE de las fracciones cromatográficas de Sefarosa HA y Gel T.....	44
21	Influencia del pH y la fuerza iónica en la solubilidad de los aislados de inmunoglobulinas séricas porcinas.....	50
22	Interacción de Igs séricas porcinas con *E. coli* K88.....	51
23	Comparación de la interacción de Igs séricas y calostrales con *E. coli* K 88.....	52
24	Cromatograma típico de la purificación de inmunoglobulinas por cromatografía de afinidad.....	69
25	Electroforesis SDS PAGE y ensayo de inmunodetección para IgG.....	70
26	Electroforesis SDS PAGE y ensayo de inmunodetección para IgA	71
27	Ensayo de manchas con jacalina para las eluciones conteniendo IgA e IgG purificadas por cromatografía de afinidad	72
28	Electroforesis SDS PAGE y ensayo de inmunodetección para IgM.....	73
29	Ensayos de manchas para inmunoglobulinas A.....	76
30	Diferencias en la interacción de las IgAs porcinas con algunas lectinas	77
31	Similitudes en la interacción de las IgAs porcinas con algunas lectinas	78
32	Ensayos de manchas para inmunoglobulinas G.....	80
33	Interacción de las IgGs porcinas con algunas lectinas.....	81
34	Ensayos de manchas para inmunoglobulinas M	83
35	Interacción de IgA sérica e IgA de calostro con las lectinas jacalina *Vicia villosa* , lectina de trigo y lectina E de frijol.....	85
36	Interacción de IgA sérica e IgA de calostro con las lectinas de: concanavalina A, *Ulex europaeus*, *Sambucus nigra*,*Mackia amurensis* *Eritrina cristagalli* y *Ricinus communis*	85

37	Interacción de IgG sérica e IgG de calostro con diferentes lectinas	86
38	Interacción de IgM sérica e IgM de calostro con diferentes lectinas ..	87
39	Interacción de *E. coli* K88 con diferentes fuentes de inmunoglobulinas	89
40	Interacción de IgA en condiciones reductoras y desnaturalizantes con *E. coli K88*.....	89
41	Comparación de la interacción de IgA sérica y de IgA de calostro con *E. coli K88*.....	90
42	Influencia del pH en la interacción de IgA sérica con *E. coli* K88.....	90
43	Interacción de *E. coli* K88 con diferentes glicoproteínas.....	92
44	Ensayo de manchas de la interacción de *E. coli* K88 con mucinas de lechones de 10 días	93
45	Interacción de *Salmonella choleraesuis* con las Igs porcinas y con otras glicoproteínas.....	94
46	Ensayo de manchas de la interacción de *Salmonella choleraesuis* con mucinas de lechones de 10 días.....	95

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Concentraciones de Inmunoglobulinas en calostro y suero porcinos	18
2	Concentración de IgG en calostro y suero calostral.....	19
3	Capacidad dinámica de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA para proteínas de suero y calostro porcinos.....	23
4	Capacidad estática de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA en condiciones saturantes.....	25
5	Contenido de inmunoglobulinas séricas en las fracciones de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA	29
6	Contenido de inmunoglobulinas calostrales en las fracciones de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA.....	31
7	Comparación de las matrices cromatográficas.....	34
8	Efecto del escalamiento del aislamiento de inmunoglobulinas séricas porcinas, en la capacidad de adsorción de Sefarosa HA.....	41
9	Contenido de inmunoglobulinas en las fracciones de Sefarosa HA y Gel T.....	44
10	Análisis microbiológico de los concentrados de inmunoglobulinas séricas porcinas después de 15 días de almacenamiento.....	50
11	Actividad hemaglutinante de *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* en eritrocitos de cerdo adulto y lechón.....	96
12	Inhibición de la adhesina de E coli K 88 en presencia de glicoproteínas	97

RESUMEN

Se aislaron inmunoglobulinas a partir de suero y calostro porcino mediante la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica. Para ello se utilizaron las matrices sefarosa altamente acetilada (Sefarosa HA) y Novarosa etilen diamina altamente acetilada (Novarosa EDA HA), utilizadas previamente en CIAD para el aislamiento de inmunoglobulinas séricas humanas. Ambas matrices fueron capaces de aislar las inmunoglobulinas porcinas en un solo paso. Sefarosa HA presentó una capacidad de 3.9±0.1 mg/ml de matriz en el aislamiento de lg's séricas porcinas y de 4.1±0.2 mg/ml de lg's de calostro porcino. Esta capacidad superó a Ia de adsorción de Novarosa EDA HA en un 18%. Sefarosa HA adsorbe el total de la IgC, y de la lgA y el 55% de la lgM presentes en suero porcino, mientras que Ia matriz de Novarosa EDA HA adsorbe el 81 %, de la lgG, el 17% de la lgA y el 93% de la IgM. Esta notable característica de Novarosa EDA HA puede aprovecharse en el aislamiento de lgM. La adsorción especifica de las lg's séricas porcinas a Sefarosa HA fue mayor (6.5±0.3 mg/ml de matriz) que la de Novarosa EDA HA (4.5±9.4 mg/ml de matriz). En el proceso de escalamiento, la capacidad de Seforosa HA se vio afectada por el tiempo de acetilación de la matriz, el diámetro de la columna, el tiempo de almacenamiento de la matriz no acetilada y el volumen de cama. La matriz no perdió su capacidad después de 20 corridas continuas, ni se vio afectada durante el almacenamiento por 7 días en Guanidina 4M, pH 7.6. No se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) al comparar las capacidades de adsorción de Sefarosa HA y el gel comercial T. Sin embargo, Sefarosa HA promueve la adsorción de los tres tipos de inmunoglobulinas y permite la aplicación de la muestra cruda sin necesidad de diluir. Las fracciones cromatográficas obtenidas de Sefarosa HA fueron caracterizadas fisicoquímicamente. La fracción albúmina presenta un índice de actividad emulsi ficante de 165 m2/g. La estabilidad de las emulsiones formadas con esta fracción no fue afectada por la temperatura, ni por el tiempo de almacenamiento. La solubilidad en agua de la fracción de albúmina fué del 91 % a pH 7.0. La solubilidad de las inmunoglobulinas porcinas aisladas en Sefarosa HA, fue de 90 a 96% en soluciones salinas a 0.25M. A partir de ellas se elaboraron concentrados de lg's libres de patógenos bacterianos y virales. Estas preparaciones conservaron su actividad contrs E. coli K88 después de 15 días de almacenamiento refrigeración comparable a la de las inmunoglobulinas de calostro. Los ensayos de manchas indican que dicha actividad fue comparable a la de las inmunoglobulinas de calostro. Posteriormente, se purificaron tres isotipos de inmunoglobulinas porcinas (lgA, lgG e lgM) a partir de suero y calostro porcinos, utilizando cromatografía de afinidad para caracterizar parcialmente sus estructuras oligosacáridas y para ensayar el reconocimiento de estas por E. coli K.88 y Salmonella choleraesuis. Los ensayos de manchas y los lectinoensayos indican que las estructuras oligosacáridas de las IgAs porcinas son similares a las estructuras de N-glicanos presentes en la lgA humana. También se observó que contienen menos estructuras del tipo O-glicanos que esta inmunoglobulina. Las IgGs porcinas presentan estructuras similares a las dela lgG humana. Se observó que la lgG de calostro porcino se encuentra fucosilada que la lgG sérica porcina. No se observaron diferencias entre las estructuras de las lgMs porcinas de suero y calostro.

.

Los aislados de lg's porcinas, la lgG y la lgA séricas porcinas int.cnlcdo1lan con E. co/i K88. Se cnco1ltrnron f'1lcl'l(:S indicios de que In interacción „0l1 lgA se cstubl.ccc en parte, a través do sus estructuras oligm;acáridas, Esta int.cnlcción cs indcpcndicnlc del pl-l, es si1l1il1lr a la ck la lgA de calostro porcino y pudiera constituir una estrategia adicionnl de

,fol"ensn de la immmo1. lolrnlilrn pam evitar la adhesión de patógenos al lnlcl0 gnstrointesl.inal del lc1chón, Los aisl;1dos de lg's porcinas, la lgA y la lgM s6ricas porcinus intcnu:cional\lll con S. c/t/o/emcsuis. No s,l cnconlró evidencia concluyc.111.c (k la ,ixistc11da de una intcrncción clllrc los ol.igos¡¡cáridos de la lgM porcina y el pi11.ógcno. Las prcpan1ciones de lg's porcinas y la lgA porcina inhiben la hc11rngluti11nción de los crilrocilos de lcchol1cl1 de 1O días provocada por la adlrnsina de E. coli K88 a bajas c,mc,mtracionos. La suma de resuhados indica que las i11m1.111oglobulinus :.iisladas y ¡rnrificiulns por no111alogralla de in1.crncdón liidrofóbica y por (:rom,1.tograna de afinid;1d prcscnlan ac1ividad in vilro c.t.1nlra los dos principales prnógcnos bacterianos que cnu:J,Ul diarrens en kchoncs, micntnis qtrn Ju fracción all1!1111lilHl presenta potencial como aditivo ali rr1cntario,

CAPITULO I

I.1 INTRODUCCION

Las inmunoglobulinas (Ig´s) son glicoproteínas de defensa que protegen a los organismos vertebrados del ataque de patógenos. En el cerdo, las Ig´s provenientes de la sangre de sacrificio, son capaces de actuar efectivamente como sustituto de calostro, confiriendo inmunidad pasiva a lechones neonatos (Gómez, 1997). Además contribuyen al desarrollo del intestino de los lechones recién destetados y actúan como profilácticos en la prevención de diarreas en lechones neonatos y recién destetados (Gatnau y Zimmerman, 1991). Este hecho es muy importante si se considera que los lechones nacen sin anticuerpos y al tiempo del destete no ha madurado su sistema inmune. Debido a lo anterior los lechones son susceptibles al ataque de patógenos entéricos como *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*. La prevención del ataque de tales patógenos permite el crecimiento óptimo del cerdo y mejora la eficiencia productiva de la granja.

Las Ig´s presentan un reconocimiento específico por determinados antígenos a los que se unen para desencadenar una serie de respuestas defensivas encaminadas a anular al agente extraño (Sánchez-Vizcaíno, 2000). Adicionalmente existe evidencia de interacciones no inmunológicas entre los carbohidratos de las inmunoglobulinas humanas y algunas adhesinas bacterianas. Estas interacciones pudieran estar involucradas en un mecanismo de defensa alternativo de los anticuerpos (Lamm, 1997). No se han realizado estudios de este tipo con Ig´s porcinas, pero es muy probable que sus oligosacáridos también puedan actuar como receptores de las lectinas microbianas. De esta manera interferirían en el proceso de colonización de las bacterias a las mucosas intestinales, añadiendo una característica más a su uso profiláctico.

La fuente comercial de inmunoglobulinas para los cerdos, es el plasma sanguíneo deshidratado, cuya desventaja principal es la de no presentar un contenido de Ig´s constante y por tanto no se puede garantizar su efecto (Gómez, 1997). Debido a lo anterior, existe el interés de utilizar aislados de Ig´s (Casadevall, 1999; Selk, 1999).

El aislamiento de grandes cantidades de anticuerpos de suero humano o de otros vertebrados se ha venido realizando por métodos de precipitación salina o alcohólica. Ambos métodos son inespecíficos y pueden alterar la estabilidad de las proteínas

disminuyendo la calidad del producto (Foster, 1994).

Los métodos cromatográficos tienen la ventaja de ser altamente específicos y las condiciones de operación se pueden ajustar para evitar la disminución de la actividad biológica de las moléculas purificadas. La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) promueve la separación de proteínas en base a interacciones que se establecen entre ligandos hidrofóbicos inmovilizados y las superficies no polares de la proteína. La adsorción de proteínas al ligando se lleva a cabo mediante interacciones débiles, por lo que el daño estructural a la molécula y a su actividad biológica es mínimo al momento de la desorción (Queiroz *et al.*, 2001).

Durante los últimos años la HIC se ha utilizado en procesos muy específicos de bioseparación que involucran escalamientos a nivel laboratorio y planta piloto (Grunid, 1998; Sofer y Hagel, 1997; Wu y Karger, 1996), que incluyen el aislamiento de hormonas, proteínas del núcleo, enzimas y proteínas recombinantes (Angelova *et al.*, 1997; Commings *et al.*, 1979; Hrkal y Rejnková, 1982; Lefort y Ferrara, 1986; Queiroz *et al.*, 1999). Debido a su especificidad, a las condiciones suaves a las que se somete la molécula y a la posibilidad de escalamiento, se eligió a la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para aislar inmunoglobulinas porcinas, para posteriormente purificarlas por cromatografía de afinidad y realizar una caracterización biológica parcial de su adhesión a los patógenos *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*.

I.2 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

I.2.1 La industria porcícola sonorense: importancia y problemática ambiental

La industria porcícola en Sonora es una actividad económica muy importante, que se caracteriza por presentar elevada eficiencia en la producción, la industrialización y la comercialización de sus productos (Anónimo, 2001). Sonora ocupa el segundo lugar en la producción nacional de carne de cerdo y el primero en las exportaciones de este producto a Japón, Corea y los Estados Unidos de Norteamérica. Cuenta además, con los estándares más elevados de productividad a nivel nacional (INEGI, 1997; SAGARPA, 2001).

El éxito de esta industria se debe principalmente a que más del 70% de las unidades de producción emplean un sistema de cría tecnificado, que se caracteriza por contar con asesoría especializada en las áreas de nutrición, genética y sanidad. Las 500 naves de producción sonorenses, cuentan con áreas específicas (maternidad, pre-destete, destete, engorda, etc.), cerradas y techadas al 100% y equipadas con muros térmicos y con sistemas para controlar la temperatura (INEGI, 1997).

La calidad sanitaria es una característica fundamental de la porcicultura sonorense, la que se ha conseguido implementado estrictos controles desde la crianza hasta el consumidor. El sacrificio se lleva a cabo en plantas Tipo Inspección Federal (TIF), algunas de las cuales han implementado sistemas HACCP (Análisis de Riesgos, Identificación y Control de Puntos Críticos) (Pérez-Espejo, 2000). Los avances sanitarios en las granjas porcinas, han contribuido notablemente a que Sonora se encuentre libre de importantes enfermedades virales como la peste porcina clásica, el mal de Aujeszky y el del ojo azul. Adicionalmente, permiten a esta industria aumentar sus exportaciones año con año (Fomento Ganadero, 2002).

Actualmente el reto de la porcicultura mexicana además de competir, manteniendo niveles y estándares de eficiencia, productividad y rentabilidad internacionales, es también el de ser una industria sustentable que muestre compatibilidad entre la obtención de beneficios económicos y la protección a los ecosistemas. En este aspecto es indispensable atender los problemas ambientales relacionados con aguas y suelos. La demanda de consumo de agua dulce por las unidades industriales para la producción y el sacrificio de animales y para mantener la producción de carne en condiciones higiénicas, es

considerable. Un solo cerdo sacrificado genera 500 L de agua residual (Castillo *et al.*, 2002). Dado que la mayoría de los mataderos han quedado cerca de los núcleos urbanos, esta demanda entra en competencia directa con las necesidades de la población disminuyendo la disponibilidad y aumentando las posibilidades de contaminación del recurso (FAO, 2000).

Del sacrificio diario de ganado porcino en Sonora, se generan 30,000 L de sangre, de los cuales, el 100% son descargados en el drenaje o vertidos a lagunas de oxidación cuya capacidad ha sido rebasada (SAGAR, 2000). Esta práctica constituye un peligro potencial de contaminación para los suelos y las fuentes acuíferas de la región, ya que se estima que la sangre contribuye con un 40% a la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) de las aguas residuales del rastro (Braun, 1966; López y Rivera, 1981). La Norma Oficial Mexicana sobre descarga de aguas residuales se basa en la aplicación gradual de diferentes fechas de cumplimiento, 2000, 2005 y 2010. La carga de contaminantes total, medida por la DBO para el 2005, no deberá rebasar las 3 ton/día (NOM-002-ECOL-1996). Únicamente la sangre del sacrificio de cerdos aporta una DBO de 4 ton/día. Si bien la norma presenta la severa limitante de permitir el pago por contaminar (Pérez-Espejo, 2000), las presiones ecológicas conllevarán, eventualmente, a ejercer acciones encaminadas a resolver tan importantes problemas de contaminación.

Las alternativas para disminuir la DBO de las aguas de sacrificio, son el tratamiento de las aguas residuales y el aprovechamiento de subproductos, sobre todo de la sangre (Dupjohann, 1999). La sangre animal es una excelente fuente de proteínas que en México, en el mejor de los casos, se subutiliza como fertilizante o se procesa en mínimas cantidades como harina de sangre de regular digestibilidad (Salazar y Cuarón, 1994). En otros países como Estados Unidos de Norteamérica, España y Canadá, la sangre se utiliza como fuente de proteína y de inmunoglobulinas, en forma de plasma sanguíneo durante la lactancia y el destete del lechón (Borja, 1998).

I.2.2 Lactancia y destete de lechones

La lactancia y el destete son consideradas las etapas más críticas en la mayoría de las empresas porcícolas. Esto se debe, parcialmente, a que en estas etapas los lechones son

muy susceptibles a adquirir diversas infecciones (Thulin, 1989, Utrera, 2003). Es por ello que durante estos periodos, se realizan grandes esfuerzos para incrementar los índices de salud y crecimiento de los animales.

1.2.2.1 Lactancia

Durante la lactancia, la ingesta de calostro es fundamental para el lechón. Desde el punto de vista nutricional, es un alimento muy digerible, rico en grasa, lactosa y caseína, que permite el rápido desarrollo del cerdo neonato (Roppa, 2002). Además, es un factor indispensable para su supervivencia, ya que es la fuente natural de anticuerpos. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig´s), son proteínas de defensa que protegen a los vertebrados de las infecciones y que están presentes en las secreciones mucosas, en el suero y en la leche (Drew y Owen, 1988). Los cerdos nacen sin anticuerpos circulantes y sin un tejido linfoide intestinal desarrollado. Por ello, requieren de la inmunización pasiva del calostro, durante las primeras horas de vida. Su supervivencia dependerá de la ingestión de esta leche y de la adecuada absorción de las inmunoglobulinas que contiene (Porter, 1969; Curtis y Bourne, 1971).

En lechones neonatos que han sido destetados, las Ig´s de plasma sanguíneo porcino pueden sustituir al calostro (Owen *et al.*, 1961; Owen y Bell, 1964; Scoot *et al.*, 1972; McCallum *et al.*, 1977; Drew y Owen, 1988). Estos concentrados promueven la inmunización pasiva en relación directa a la concentración de Ig´s y producen mejores resultados cuando se administran durante 5 a 10 días después del nacimiento (Drew y Owen, 1988; Arthington *et al.*, 1997). También se ha observado que son más eficientes que el calostro y plasma de vaca (Gómez *et al.*, 1995).

Por otro lado las Ig´s del plasma protegen al cerdo contra las diarreas (Gatnau y Zimmerman, 1991; Van der Peet-Schwering, y Binnendijk, 1995). Las inmunoglobulinas provenientes del suero o del calostro recubren las paredes intestinales del lechón, proporcionando cierta inmunidad local, mientras su tejido linfoide se desarrolla (Horton, 1995; Pérez y Calvo, 1995). Algunos trabajos indican que de esta manera protegen al cerdo contra las diarreas por rotavirus y *E. coli*, (Cordel *et al.*, 1991; Gómez, 1997; Bosi, *et al.*, 1999).

Existen diversas preparaciones comerciales a partir de plasma sanguíneo deshidratadas por aspersión. Sin embargo, la concentración de inmunoglobulinas es muy variada y una deficiencia en éstas, podría provocar fallas en la inmunización del animal (Gómez, 1997). Es por ello que los aislados de inmunoglobulinas, representarían una excelente alternativa para la inmunización del lechón.

1.2.3 Problemas entéricos en lechones

Las diarreas de origen infeccioso en lechones son probablemente una de las condiciones patológicas más costosas para la industria porcícola (Hog y Torres, 1997). Las enfermedades gastrointestinales reducen la eficiencia alimenticia aumentando el costo por alimentación en un 10-12 %. Además, elevan la mortalidad en 3 %, los gastos por tratamientos médicos en 50 % y retrasan el tiempo de sacrificio en 2 a 3 días por cada día con diarrea (Carvajal, 2000).

Los problemas gastrointestinales en las granjas porcícolas son muy comunes, presentando una prevalencia del 30 al 50% (Carvajal, 2000). En lechones neonatos las diarreas infecciosas más frecuentes son causadas por los rotavirus y por *Escherichia coli* en el 63% de los casos (USDA, 1992). Mientras que en los cerdos recién destetados los principales agentes etiológicos son *E. coli* y *Salmonella* sp. Adicionalmente, otros agentes virales (fiebre porcina clásica, enfermedad de Aujeszky, PRRS, síndrome del ojo azul) o bacterianos pueden generar cuadros clínicos entéricos debido a que afectan la capacidad de respuesta inmune de los cerdos, favoreciendo la proliferación de patógenos digestivos (Mota, 1998; Carvajal, 2000).

El mantenimiento de la salud de los animales de granja, es esencial para la producción en gran escala. Los problemas gastrointestinales infecciosos y las actuales condiciones de producción comercial enferman y estresan al intestino respectivamente. Esto provoca grandes gastos médicos y de alimentación, retrasa el tiempo de matanza e incrementa la tasa de mortalidad (Carvajal, 2000). El descubrimiento y el desarrollo de los primeros antibióticos, han jugado un papel muy importante en la recuperación de enfermedades infecciosas en los animales de granja, por lo que se utilizan como medida correctiva. Adicionalmente el hecho de que estas sustancias incrementan la conversión

alimenticia y el crecimiento del animal, ha provocado que se incluyan de manera regular en la dieta, en cantidades subterapeúticas (Mota, 1998). Lo anterior representa un problema potencial de salud para el animal y eventualmente para el consumidor, debido a la capacidad de los microorganismos de adquirir resistencia a los antibióticos (Mathew et L., 2001).

Es por ello que continuamente se investigan opciones al tratamiento de diarreas que puedan aplicarse como estrategias preventivas para disminuir el uso de medicamentos (Doyle, 2001). Como ya se mencionó, una alternativa profiláctica a las diarreas podría ser el uso de inmunoglobulinas. Este estudio contempla la posibilidad de aislarlas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica y de caracterizarlas parcialmente, con la idea de una posterior aplicación en la industria porcícola.

I.3 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar y purificar inmunoglobulinas porcinas, caracterizar parcialmente sus estructuras oligosacáridas y la adhesión *in vitro* de *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis* a las inmunoglobulinas purificadas.

OBJETIVOS PARTICULARES

a. Aislar inmunoglobulinas porcinas por cromatografía de hidrofobicidad

a.1. Determinar la capacidad adsortiva de tres matrices cromatográficas a base de agarosa altamente acetilada y compararlas con un gel comercial.

a.2. Caracterizar fisicoquímicamente los ahilados de Ig´s y la fracción albúmina.

a.3. Generar preparaciones de Ig´s séricas líquidas, microbiológicamente estables y libres de patógenos.

b. Purificar las diferentes Ig´s por cromatografía de afinidad y caracterizar sus estructuras oligosacáridas mediante ensayos de manchas y lectinoensayos.

c. Ensayar la adhesión *in vitro* de *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* a mucinas intestinales de lechón y a las Ig´s purificadas, utilizando ensayos de manchas.

1.4 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Este estudio se dividió en 3 etapas diferentes (Fig. 1) que comprenden:

1. Aislamiento de Ig´s porcinas por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)
2. Caracterización fisicoquímica parcial de la fracción albúmina y preparación de concentrados de inmunoglobulinas séricas porcinas
3. Purificación de Igs por cromatografía de afinidad para caracterizar sus estructuras oligosacáridas y la interacción *in vitro* de patógenos porcinos, con éstas.

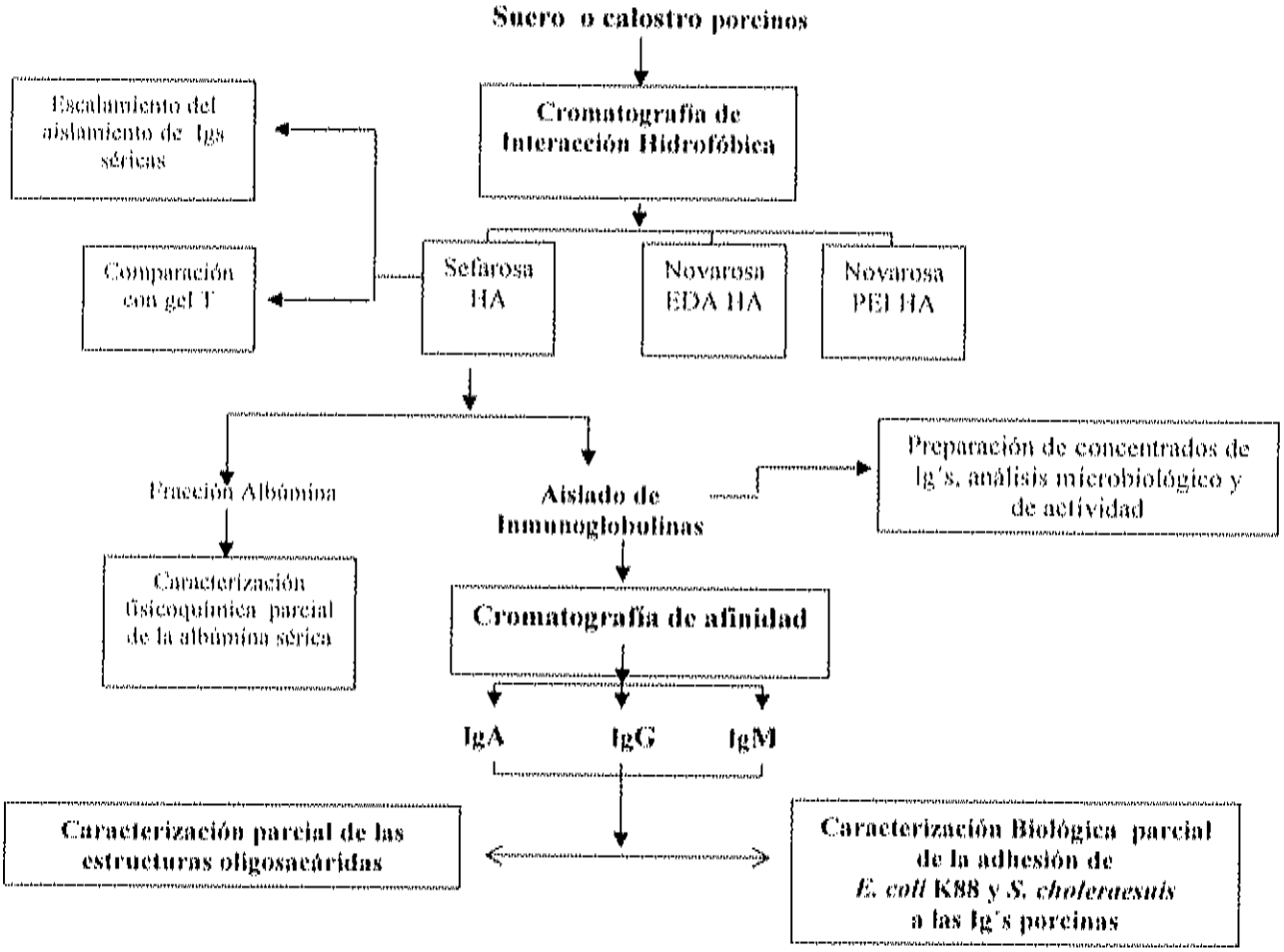

Figura 1. Esquema de trabajo para el estudio de las inmunoglobulinas porcinas

CAPITULO II

AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS PORCINAS POR CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (HIC)

II.1. INTRODUCCION

II.1.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Las preparaciones de anticuerpos para uso humano o veterinario se obtienen principalmente por métodos de precipitación salina o alcohólica o bien, por el secado de plasma sanguíneo. A pesar de sus ventajas, estos métodos son poco específicos, algunos se realizan en condiciones desnaturalizantes que pueden alterar la estabilidad de la proteína (Burnouf, 1995) y otros no garantizan una cantidad y calidad constante de anticuerpos, como es el caso del plasma sanguíneo (Gómez, 1997; Gómez *et al.*, 1998). El objetivo global de los procesos de purificación de proteínas comprende no solo la remoción de contaminantes indeseables, sino la obtención de las concentraciones deseadas de proteína y su transferencia a un ambiente en que permanezca estable y lista para su aplicación (Queiroz *et al.*, 2001). Las técnicas cromatográficas explotan diferentes características de la proteína con el fin de aislarla, la mayoría de ellas logra un alto poder de resolución. Es por ello que se utilizan cada vez más en la purificación de proteínas, buscando las condiciones adecuadas para optimizar el proceso de obtención (Burnouf, 1995; Queiroz *et al.*, 2001).

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) promueve la separación de proteínas mediante las interacciones que se establecen entre ligandos hidrofóbicos inmovilizados a la matriz cromatográfica y las superficies no polares de la proteína de interés (Queiroz *et al.*, 2001). Las primeras separaciones cromatográficas utilizando esta técnica se introdujeron a principios de los setentas. Inicialmente se trabajo con alquilaminas ligadas a agarosa (Seph-Cn-NH2 donde n = 2-8) (Er-el y Shaltiel, 1972; Shaltiel *et al.*, 1973), sin embargo las condiciones de elución requerían de soluciones amortiguadoras desnaturalizantes, como citrato-imidazol, que provocaban cambios apreciables en la conformación de las proteínas. Anteriormente Tiselius (1948) había observado que las proteínas que comúnmente precipitan a altas concentraciones de sales neutras (salting out), pueden adsorberse fuertemente a concentraciones menores a las que precipitan. Además, notó que algunas matrices utilizadas en cromatografía se vuelven excelentes adsorbentes de

proteínas a altas concentraciones de sal. Hoy en día se utilizan adsorbentes como el sefadex (dextrano entrecruzado) y la sefarosa (agarosa entrecruzada).

Halperín *et al.* (1981), propusieron que en estas condiciones, la adsorción de las proteínas se lleva a cabo mediante interacciones hidrofóbicas. Porath y colaboradores (1973), fueron pioneros en la síntesis de algunas matrices libres de carga, para demostrar que la interacción que une a la proteína y al adsorbente es del tipo hidrofóbico (Queiroz *et al.*, 2001). La teoría de Porath propone que la presencia de sal en las soluciones de purificación, modifica la estructura de las proteínas, aumentando la exposición de parches hidrofóbicos (zonas de hidrofobicidad de las proteínas), facilitando su interacción con el adsorbente presente en una columna cromatográfica. Lógicamente, cada proteína difiere en su composición de parches y este hecho se aprovecha para su purificación (Porath, 1986).

Van Oss *et al.* (1986), concluyeron que las principales interacciones involucradas en la adsorción de proteínas son las fuerzas de van der Waals, por ello el daño estructural a las biomoléculas es mínimo y su actividad biológica se mantiene (Queiroz *et al.*, 2001). Las condiciones de elución tampoco dañan a la proteína ya que se logran disminuyendo o eliminando la concentración salina del medio (Melander y Horvath, 1977; Fausnaugh y Regnier, 1986; Roe, 1989). Durante los últimos años la HIC se ha utilizado en procesos muy específicos de bioseparación que involucran escalamientos a nivel laboratorio y planta piloto (Wu y Karger, 1996; Sofer y Hagel, 1997; Grunid, 1998), que incluyen el aislamiento de proteínas séricas, hormonas, proteínas del núcleo, enzimas y proteínas recombinantes (Commings *et al.*, 1979; Hrkal y Rejnková, 1982; Lefort y Ferrara, 1986; Angelova *et al.*, 1997; Queiroz *et al.*, 1999). Debido a su especificidad, a las suaves condiciones a las que se somete la molécula y a la posibilidad de escalamiento se eligió este tipo de cromatografía para realizar este estudio.

II.2. MATERIALES Y METODOS

II.2.1 Obtención de calostro y suero porcinos

El calostro se obtuvo de tres granjas porcícolas, realizándose 4 muestreos durante el otoño e invierno de 2000 y la primavera y verano de 2001. De cada muestreo se obtuvieron 50-70 mL de calostro provenientes de 4 cerdas recién paridas que fueron transportados en hielo y almacenados a – 40 °C hasta su procesamiento. El suero se obtuvo

a partir de sangre colectada en la línea de sacrificio de un rastro Tipo Inspección Federal (TIF) de la ciudad de Hermosillo. Se realizaron 20 muestreos a partir de otoño de 2000 y hasta el verano de 2003. Cada muestreo constó de 10 L de sangre provenientes de 5 animales, que fueron transportados en una hielera al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas (LBBMP) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.). El suero se separó por decantación, previa coagulación de la sangre a temperatura ambiente. Posteriormente se enfrió a 4° C y se centrífugo a 6000 x g durante 20 min a 4° C para remover material graso y se congeló a – 40° C hasta su posterior análisis.

II.2.2 Cuantificación de inmunoglobulinas por inmunodifusión radial

Se cuantificó la presencia de IgA, IgG e IgM por inmunodifusión radial mediante la técnica de Fahey y McKelvey (1965), utilizando placas de inmunodifusión comerciales VET-RID (Bethyl Lab. Inc. TX., USA). Se analizaron 4 muestras de suero y 4 de calostro, una por cada estación del año. El análisis se realizó por duplicado, en muestras nativas y en muestras reducidas y alquiladas (Shimizu *et al.*, 1974). Se aplicaron 40 μg de proteína en cada pozo. Las placas se colocaron en una cámara húmeda a 25 °C durante 18 h. El diámetro del halo de precipitación se midió con un ocular Finescale (Horscale Div., USA) y con un lector VET-RID (Bethyl Lab. Inc. TX., USA). La concentración se estimó con curvas patrón de estándares de cada inmunoglobulina. Las muestras reducidas y alquiladas se trataron con Tris 0.6 M, ditiotreitol 50 mM, pH 8.6 por 2 h a 25° C y con Tris 0.6 M iodoacetamida 50 mM pH 8.6 por 12 h a 25 °C.

II. 2.3 Cromatografía de Hidrofobicidad

II.2.3.1. Matrices cromatográficas

Para el aislamiento de inmunoglobulinas séricas y calostrales, se probaron las matrices cromatográficas a) Sefarosa altamente acetilada (Sefarosa HA); b) Novarosa etilendiamina altamente acetilada (Novarosa EDA HA) y c) Novarosa polietilenamina altamente acetilada (Novarosa PEI HA). Sefarosa HA fue sintetizada en el LBBMP del CIAD, de acuerdo a Vázquez-Moreno *et al.* (1992), a partir de 100g de Sefarosa-6B CL (Amersham Pharmacia Biotech., Upssala, Suecia). La sefarosa se filtro al vacío y se lavó sucesivamente con 200 mL de etanol al 95%, 100 mL de acetona y 100 mL de piridina

(Sigma Aldrich, ST Louis, MI, USA). La acetilación se llevó a cabo en presencia de 100 mL de piridina y 67 mL de ácido acético por 18, 24 y 36 h con agitación moderada y a 25 °C. Posteriormente el gel se lavó con 200 mL de etanol al 95%, 100 mL de ácido acético al 10% y suficiente agua bidestilada para alcanzar un pH cercano a la neutralidad. (Vázquez-Moreno *et al.*, 1992).

Novarosa EDA HA fue sintetizada en la Universidad de Tucson, a partir de 60 g de Novarosa 100/40 Act^{High} (Inovata, Sweeden) filtrados a vacío y suspendidos en 100 mL de Na_2CO_3 0.1 M a los que se añadieron 50 g de etilendiamina (EDA). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por 24 h, previo ajuste del pH a 11, con NaOH 2M (Candia-Plata *et al.*, 2001). Luego de lavarse abundantemente con agua deionizada y con metanol para remover la humedad, la matriz fue acetilada según el procedimiento descrito (Vázquez-Moreno *et al.*, 1992). Novarosa PEI HA fue generosamente proporcionada por el Dr. Roberto Guzmán de la Universidad de Arizona, para este estudio.

II.2.3.2 Esquema cromatográfico para el aislamiento de inmunoglobulinas porcinas

El aislamiento de las Ig´s se realizó en un sistema cromatográfico de baja presión Econo System (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). Las matrices sintetizadas se empacaron a razón de 1 mL/min, en columnas abiertas de 0.5 x 15 cm (volumen de cama, 2 mL) y en columnas cerradas de 0.5 x 6 cm (volumen de cama, 0.5 mL). Las matrices se equilibraron con 5 volúmenes de Na_2 SO_4, 0.5 M, MOPS, 10 mM, pH 7.6 (solución A). El fraccionamiento se realizó a temperatura ambiente aplicando a las columnas suero o calostro a la molaridad de la solución de equilibrio. La adsorción de Ig´s se promovió en presencia de sal (solución A), lavando las proteínas no adsorbidas con la misma solución.

La elución se efectuó en un solo paso eliminando la sal del medio, mediante la aplicación de MOPS 10 mM, pH 7.2 a la columna. Las matrices se regeneraron con 3 volúmenes de Guanidina-HCl 4 M, pH 7.6, seguidos de un lavado con 6 volúmenes de agua bidestilada y un re-equilibrio con 5 volúmenes de Na_2SO_4, 0.5 M, MOPS, 10 mM, pH 7.6. Las fracciones cromatográficas fueron monitoreadas a 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D (Milton Roy, Rochester, NY, U.S.A). El cambio de soluciones se realizó a OD_{280} menor o igual a 0.020. La concentración de proteína de cada fracción se estimó por el método de Bradford (1976) a 595 nm, utilizando una curva

estándar preparada con albúmina de suero bovino. También mediante la absorbancia a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción de 1.22 (A_{280} para 1 mg/ml), previamente determinado. Dicho coeficiente es muy similar al reportado en la bibliografía para IgG bovina y de conejo y para las Ig's humanas (Pharmacia, 2000; Stoscheck, 1990). La correlación entre ambas medidas fue de 0.92. Se utilizaron flujos de 0.2 a 1 mL/min para medir las diferentes capacidades de adsorción de las matrices.

II.2.3.3 Capacidades de adsorción de las matrices

Se determinaron las capacidades frontal, dinámica y estática de las matrices. En todos los casos se utilizó el esquema cromatográfico descrito y se ajustó la molaridad de las proteínas, a la de la solución de equilibrio. La capacidad frontal se determinó según Sofer y Hagel (1997), con soluciones de proteínas séricas o calostrales de 8 mg/mL. Las concentraciones de proteína se estimaron a 280 nm en fracciones de 400 µl. Los experimentos se realizaron por duplicado, utilizando un flujo de 0.5 mL/min. El punto de rompimiento se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$Q_{B,\,5\%} = \frac{[V_A (C_O - C_A) - V_B C_B]}{V_C}$$

Donde:

QB5%: Capacidad de adsorción (mg/mL de matriz)
C_O: Concentración inicial de proteína (mg/mL)
C_A: 5% de CO (mg/mL)
V_A: Volumen colectado al aplicar CA (mL)
C_B: Concentración de la proteína no adsorbida (mg/mL)
V_B: Volumen colectado de la proteína no adsorbida (mL)
V_C: Volumen de cama de la matriz (mL)

La capacidad dinámica se determinó aplicando a las matrices 120 mg de proteínas de suero o de calostro, en soluciones de 8 mg/mL. Los experimentos se llevaron a cabo en columnas abiertas y cerradas, a velocidades de flujo de 0.2, 0.3 y 0.5 mL/min. La capacidad estática se determinó aplicando diferentes concentraciones de proteínas séricas (40-480 mg) a las columnas abiertas de 2mL de cama. Se utilizaron flujos de 0.5 y 1 mL/min. La

capacidad de las matrices se expresa como los mg de proteína eluida entre el volumen de cama del gel. Los experimentos se realizaron por duplicado.

II.3 Electroforesis SDS PAGE y cuantificación por IR de las inmunoglobulinas

La caracterización electroforética de las fracciones de lavado y elución de Sefarosa-HA y Novarosa EDA-HA se realizó en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), según Laemmli (1970). Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%, aplicando a cada pozo 30 µg de proteína. Las masas moleculares se compararon con estándares de proteína Dalton VII (Sigma-Aldrich, ST Louis MO, USA). Los geles se corrieron a 80 volts, en una cámara electroforética Hoeffer Mighty Small 250 (Hoeffer, San Francisco, CA, USA) y se tiñeron con una solución de azul de Coomasie. La presencia de IgA, IgG e IgM se detectó por inmunodifusión radial en las muestras (suero y calostro) y en las fracciones de lavado y elución, según Fahey y McKelvey (1965), como se describe en la sección II.2.2. Se utilizaron las condiciones para determinar la capacidad dinámica (120 mg de proteína en soluciones de 8 mg/mL, columnas de 2 mL de volumen de cama), para hacer la comparación entre matrices. En el caso de Sefarosa-HA los análisis también se practicaron en condiciones saturantes en la columna de 100 mL de cama

II.4 Adsorción específica de inmunoglobulinas porcinas a Sefarosa HA y Novarosa EDA-HA

Para determinar la adsorción específica de Igs a las matrices, se aplicaron 40 mg de proteínas del aislado de Ig's séricas porcinas, en soluciones de 4 mg/mL, a velocidad de 0.5 mL/min. Se utilizaron columnas cerradas con volúmenes de cama de 0.5 mL. Las fracciones se obtuvieron según la metodología descrita (II.2.3.2).

II.5 Ensayo de inmunodetección en las fracciones cromatográficas

El ensayo de inmunodetección se llevó a cabo según Towbin *et al.* (1979). Las fracciones de elución de Sefarosa HA se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%, de acuerdo a Laemmli (1970) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-Dry blotter 433-2900 (Bluchler Ins., Labconco, USA) por 40 min, a

2.5 mA/cm^2. La cadena pesada de cada inmunoglobulina se detectó con antisueros (Bethyl Lab. Inc. TX., USA) producidos en cabra, contra la cadena (IgA), el fragmento Fc. (IgG) o la cadena (IgM) de inmunoglobulinas porcinas, respectivamente. Se utilizó antisuero anti IgG de cabra ligada a peroxidasa, como segundo anticuerpo y se promovió el desarrollo de color con 3,3´diaminobenzidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO., USA).

II.6 Caracterización de Sefarosa HA

II.6.1 Consideraciones para el escalamiento

Para optimizar el aislamiento de Ig´s se estudiaron los factores de escalabilidad: estabilidad de la columna en presencia de guanidina, estabilidad de la agarosa al tiempo de almacenamiento, e influencia del tiempo de acetilación en la capacidad de la matriz. Para estudiar la estabilidad de la matriz en presencia de guanidina se utilizaron dos columnas con 2 mL de volumen de cama equilibrada con la solución amortiguadora A, se aplicó 1 mL de suero porcino y se procedió al fraccionamiento de sus proteínas. Posteriormente se regeneraron las matrices, se les aplicaron 2 volúmenes de guanidina-HCl 4M, pH 7.6 y se almacenaron a temperatura ambiente y en refrigeración por 7 días. Después de este tiempo, las matrices se lavaron con 5 volúmenes de agua bidestilada, se reequilibraron y nuevamente se fraccionaron las proteínas contenidas en 1 mL de suero porcino. La influencia del tiempo de almacenamiento de la sefarosa, sobre la capacidad de la sefarosa HA, se estudió acetilando muestras de sefarosa provenientes de dos lotes, el primero almacenado por dos años y el segundo por 12 días.

Para determinar la influencia del tiempo de acetilación sobre la capacidad de adsorción se acetilaron tres lotes de Sefarosa por 18, 24 y 36 h respectivamente, se empacaron individualmente en columnas de 1.5 x 10 cm hasta obtener un volumen de cama de 12 mL para cada caso y se determinó la capacidad de adsorción de cada gel según el procedimiento descrito en la sección II.2.3.2.

II.6.2 Escalamiento

El escalamiento se realizó con el gel de Sefarosa HA, que presentó mayor capacidad de adsorción. Se sintetizó cantidad suficiente de gel para realizar 5 etapas de escalamiento, cada una aumentando el volumen de cama (2, 5, 12, 23 y 46 mL). Se empleó el mismo

esquema cromatográfico aplicando concentraciones de proteína de 40 a 480 mg. Para cada caso, las corridas se realizaron por duplicado. En un segundo experimento se cargaron columnas con volúmenes de cama de 46 y 100 mL con 680 mg y 2 g de proteínas séricas. Estos experimentos se realizaron 10 veces para comprobar la estabilidad de la columna en base a la pérdida o conservación de la capacidad de la matriz.

II.6.3 Comparación de Sefarosa HA con gel T

La capacidad del gel de Sefarosa HA se comparó con la del gel comercial T, utilizando la metodología descrita en la sección II.2.3.2.

II.3 RESULTADOS Y DISCUSION

II.3.1 Concentración de Inmunoglobulinas

El valor promedio de las proteínas totales en el suero fue de 80(3.6 mg/mL, mientras que el del calostro fue de 241(7.7 mg/mL, lo anterior coincide con lo reportado por Bourne y Curtis (1973) y por Hurle (2002). Como se esperaba, la inmunoglobulina que se encontró en mayor concentración en ambas muestras, fue la IgG (Tabla 1). La IgA ocupa el tercer lugar en el suero y el segundo en el calostro. La concentración de IgM fue similar en suero y calostro, 4.7±0.5 y 4.5±0.3 mg/mL, respectivamente. Aunque por lo general, la proporción de IgM en suero porcino es mayor que la de calostro (Tizard, 1996), los valores caen dentro de los rangos reportados (Butler y Brown, 1994; Sánchez-Vizcaíno, 2000). Los valores encontrados para la IgG y la IgG de ambas fuentes, también se encuentran en los rangos reportados en la literatura (Butler y Brown, 1994).

La inmunodifusión radial se ha utilizado extensamente para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas y calostrales (Brandon *et al.*, 1971; Fleenor y Stott; 1981; Lori *et al.*, 1991; Li-Chan y Kummer, 1997), sin embargo, existen algunos factores que pueden interferir con el ensayo. Uno de ellos, es la agregación de las Ig´s y otro la presencia de caseína en el calostro (Fleenor y Stott; 1981; Li-Chan y Kummer, 1997). Por lo anterior se realizaron dos ensayos adicionales, el primero reduciendo y alquilando a las proteínas y el segundo, eliminando a la caseína del calostro (Fleenor y Stoot; 1981).

No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas para IgA e IgG nativas y reducidas y alquiladas. En cambio, la IgM de calostro presentó valores significativamente más bajos ($p < 0.05$) en las muestras tratadas. Lo anterior ocurrió a pesar de que el experimento se realizó con diversas concentraciones de los agentes reductores y alquilantes. Una posible razón de este comportamiento sería que las moléculas se agregaron después del tratamiento (Shimizu *et al.*, 1974). Adicionalmente se sabe que la IgM puede formar complejos con las lipoproteínas de la leche y del calostro (Yazid, 2001). Lo anterior podría explicar el porque este comportamiento no se presentó con la IgM del suero.

Para ensayar el efecto de la eliminación de caseína sobre la cuantificación de IgG, se aplicó quimosina al calostro, manteniendo la temperatura a 45 °C por 40 min. El suero obtenido después de la coagulación de la caseína, se aplicó a las placas de inmunodifusión. La Tabla 2 resume los valores de IgG que se obtuvieron con el suero lácteo (52.8± 2.7 mg/mL) y con el calostro (65.2± .1mg/mL). Estas diferencias pueden deberse a la saturación del anticuerpo por un exceso de antígeno presente en el suero lácteo o a que durante la coagulación del calostro, se forma una matriz caseína-grasa en la que queda atrapado el suero y sus componentes y la cantidad de Ig´s exudadas pudo no ser constante (Alais, 1980; Tizard, 1996; Janeway *et al* 1999).Estos estudios deben completarse con ensayos de ELISA para obtener resultados más confiables.

Tabla 1. Concentraciones de Inmunoglobulinas en calostro y suero porcinos

Muestra	Nativa (mg/mL)			Reducida y Alquilada (mg/mL)			Reportada [a] (mg/mL)
	$\bar{X}$	± D.E	C.V (%)	$\bar{X}$	± D.E	C.V (%)	
Calostro							
IgG	64.6	± 2.4	3.7	64.8	± 3.2	4.9	30-70
IgA	9.4	± 0.2	2.2	9.7	± 0.5	5.5	9.5-10
IgM	4.4	± 0.1*	2.2	1.9	± 0.2*	10.5	2.5-3.2
Suero							
IgG	25.4	± 0.6	2.4	28.8	± 1.3	4.5	17-29
IgA	2.3	± 0.1	4.3	2.5	± 0.1	4.0	0.5-5
IgM	4.7	± 0.1*	2.5	5.8	± 0.7*	5.3	1-5

$\bar{X}$ = media de 16 observaciones; D.E = Desviación estándar;
C.V = Coeficiente de variación; [a] = Butler y Brown, 1994; Sánchez-Vizcaíno, 2000;
* Diferencia significativa Tukey ($p < 0.05$)

Tabla 2. Concentración de IgG en calostro y suero calostral

	Calostro		Suero calostral	
	X ± D.E	C.V (%)	X ±D.E	C.V (%)
IgG nativa	65.2 ± 2.1	3.2	52.8 ± 12.7	24

X = media de 8 observaciones; D.E = Desviación estándar;
C.V = Coeficiente de variación

Según Neto et al. (2001), la concentración de Ig´s en el calostro se ve influenciada por la época del año y el número de parto del animal, mientras que la dieta y la raza no la afectan. Lo anterior se contrapone con los resultados de Norman y Hohenboken (1981), Hidiroglu et al (1992) y Pritchett et al (1991), quienes encontraron diferencias entre razas, dietas y estado de salud del animal, pero no entre número de parto y época del año, respectivamente.

En este estudio no se encontraron diferencias en la concentración de Ig´s debidas a la época del año. En la Figura 2 se observa que a lo largo de las 4 estaciones, los valores de IgG en calostro, fueron del orden de 63 a 66.5 mg/mL, los de IgA de 9.2 a 9.6 mg/mL y los de IgM de 4.2 a 4.4 mg/mL. Estas similitudes en los valores pudieron estar influenciadas por el tamaño de las muestras, ya que únicamente se tuvo acceso en cada muestreo a 4 animales, al tiempo en que se tomaron (primeras horas después del parto), y al tratamiento que se les dio (reuniéndolas en una sola muestra). Los valores de los diferentes isotipos de Ig´s tampoco variaron en el suero porcino (Fig. 3). La IgG se presentó en concentraciones de 25 a 27 mg/mL, los de IgA de 2.2 a 2.5 mg/mL y los de IgM de 4.5 a 4.7 mg/mL.

II.3.2 Cromatografía de Hidrofobicidad

II.3.2.1 Aislamiento de Inmunoglobulinas porcinas

El cromatograma típico para el aislamiento de Ig´s porcinas por HIC presentó dos picos bien definidos (Fig. 4). El primero corresponde a la fracción de lavado, constituida por las proteínas séricas o calostrales no adsorbidas a la matriz. El segundo corresponde a la elución de las proteínas aisladas. Este patrón cromatográfico fue el mismo con las

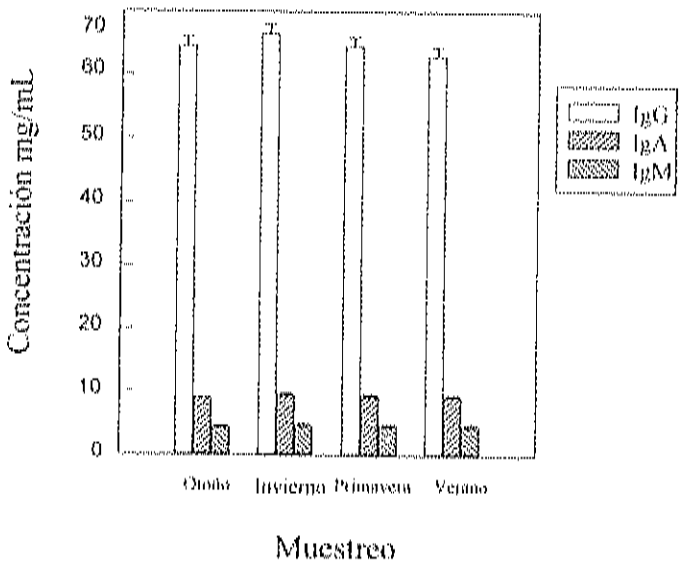

Figura 2. Efecto de la época del año en la concentración de inmunoglobulinas calostrales

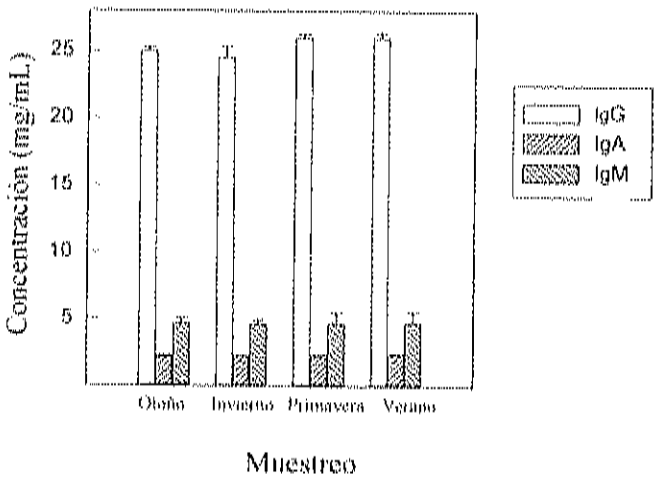

Figura 3. Efecto de la época del año en la concentración de inmunoglobulinas séricas.

diferentes matrices, columnas y volúmenes de cama y es similar al observado en el aislamiento de Ig´s humanas al utilizar HIC (Candia –Plata, 2000; Cáseres y Mata, 2001).

II.3.2.2 Capacidades adsortivas de las matrices

La capacidad frontal de las matrices, se determinó aplicando 120 mg de soluciones de proteínas séricas o calostrales a concentración de 8 mg/mL. Se utilizó un flujo de 0.5 mL/min. Cada matriz presentó una capacidad diferente (Fig. 5A y 5B), sin que influyera el tipo de muestra (Fig. 5B). En promedio, la capacidad de Sefarosa HA fue de 4.1 mg/mL de matriz, la de Novarosa EDA HA de 3.3 mg/mL de matriz y la de Novarosa PEI HA de 0.56 mg/mL de matriz.

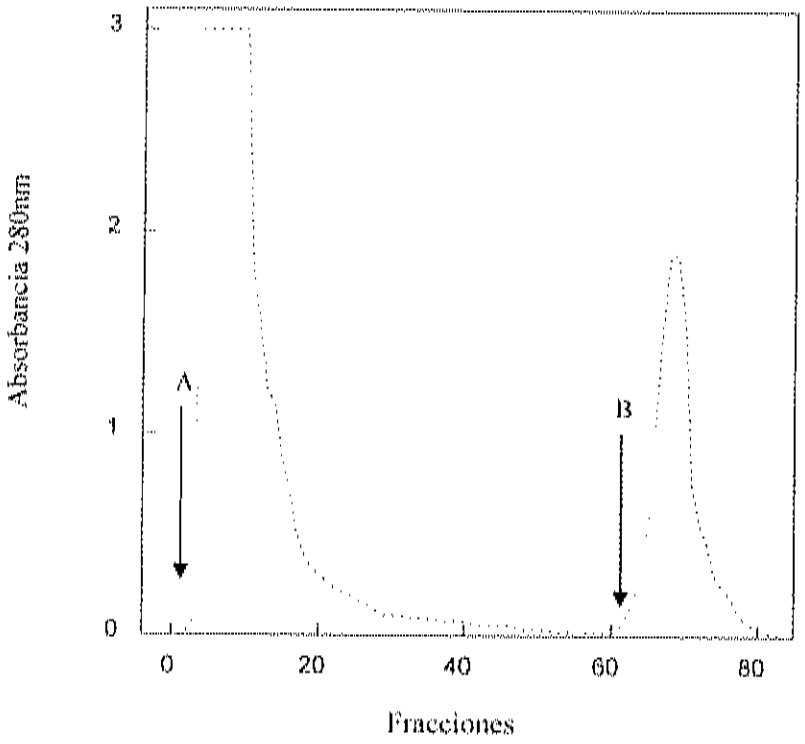

Figura 4. Cromatogrtama del aislamiento.Aislamiento de inmunoglobulinas porcinas, séricas y calostrales, en matrices de agarosa altamente acetilada. Las soluciones de proteínas de suero o de calostro, se aplicaron a las matrices HIC (A), se promovió la adsorción en presencia de Na_2SO_4 0.5M, MOPS 10 mM, pH 7.6. Las proteínas no adsorbidas se lavaron con esta misma solución. Las inmunoglobulinas adsorbidas se eluyeron con MOPS 10 mM, pH 7.2 (B).

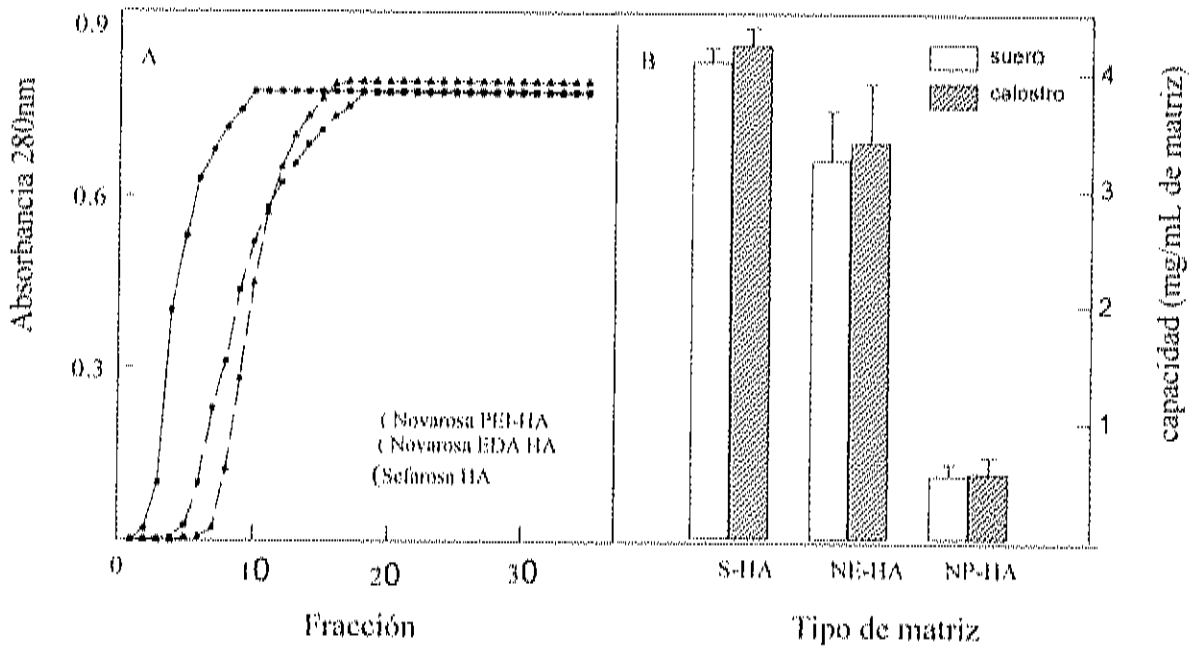

Figura 5. Capacidad frontal de las matrices estudiadas. **A.** Curvas frontales para suero porcino: (●) Novarosa PEI HA, (■) Novarosa EDA HA, (▲) Sefarosa HA. **B.** Capacidad frontal en mg/ mL de matriz, para Sefarosa-HA (S-HA), Novarosa EDA HA (NE-HA) y Novarosa PEI-HA (NP-HA). Se aplicaron 120 mg de proteínas de suero □ y calostro ▒

Para determinar la capacidad dinámica también se aplicaron a las matrices, 120 mg de proteína de suero o de calostro porcino en soluciones de 8 mg/mL. Los experimentos con las proteínas del suero se llevaron a cabo en columnas abiertas y cerradas, a velocidades de flujo de 0.2, 0.3 y 0.5 mL/min. Los experimentos con proteínas de calostro se realizaron únicamente a flujo de 0.5 mL/min. Debido a la baja capacidad de Novarosa PEI-HA, los experimentos se realizaron únicamente con Sefarosa HA y Novarosa EDA HA. En la Tabla 3 se observa que no hubo diferencia entre las columnas cerradas y abiertas. Lo anterior constituye una ventaja, debido a que la adición de guanidina dificulta el proceso de limpieza en las columnas cerradas, debido a la expansión de la matriz. En columnas abiertas y cerradas Sefarosa HA presenta una capacidad promedio de 4 mg/mL de matriz, mientras que Novarosa EDA HA 3.2 mg/mL de matriz. Estas capacidades coinciden con la capacidad frontal y como en el caso de ésta, no se presentaron diferencias entre la

capacidad de adsorber proteínas de suero o de calostro.

Tabla 3. Capacidad dinámica de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA para proteínas de suero y calostro porcinos

Matriz	Suero		Calostro	
	C	A	C	A
	$\bar{X} \pm D.E$	$\bar{X} \pm D.E$	$\bar{X} \pm D.E$	$\bar{X} \pm D.E$
Sefarosa HA	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Nov-EDA-HA	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.1

Flujo 0.5 mL/min
C = columnas cerradas, A = columnas abiertas.
$\bar{X}$ = Media, DE = desviación estándar

El análisis de Kruskal-Wallis de los experimentos con diferentes flujos (Fig.6), mostró que la capacidad de Sefarosa HA dependió de la concentración de proteína. Se observaron capacidades de 6.3, 4.7 y 3.9 mg/mL de matriz al utilizar flujos de 0.2, 0.3 y 0.5 mL/min, respectivamente. En el caso de Novarosa EDA HA, la capacidad no varió significativamente, permaneciendo en 3.2 y 3.4 mg/mL de matriz, en los diferentes flujos ensayados. Otras matrices para HIC a base de Sefarosa entrecruzada al 6%, que han sido utilizadas para el aislamiento de BSA, muestran el mismo comportamiento que Sefarosa HA. En este estudio el efecto fue menor o no se presentó en matrices más entrecruzadas o en aquellas cuyo tamaño de partícula es mucho menor, como las de polimetacrilato (Toyopearl) o poliestireno (Source) (Hanh *et al.*, 2003).

La capacidad estática se determinó en columnas abiertas de 2 mL de cama. Se aplicaron diferentes cantidades de proteínas de suero (40-480 mg), en soluciones de 40 mg/mL. El comportamiento general que presentaron las matrices se muestra en la figura 7, donde se observa que la concentración de proteína total influyó en la capacidad de las matrices. Al aplicar 320 mg se obtuvieron las capacidades más altas, punto en el que se saturó la matriz.

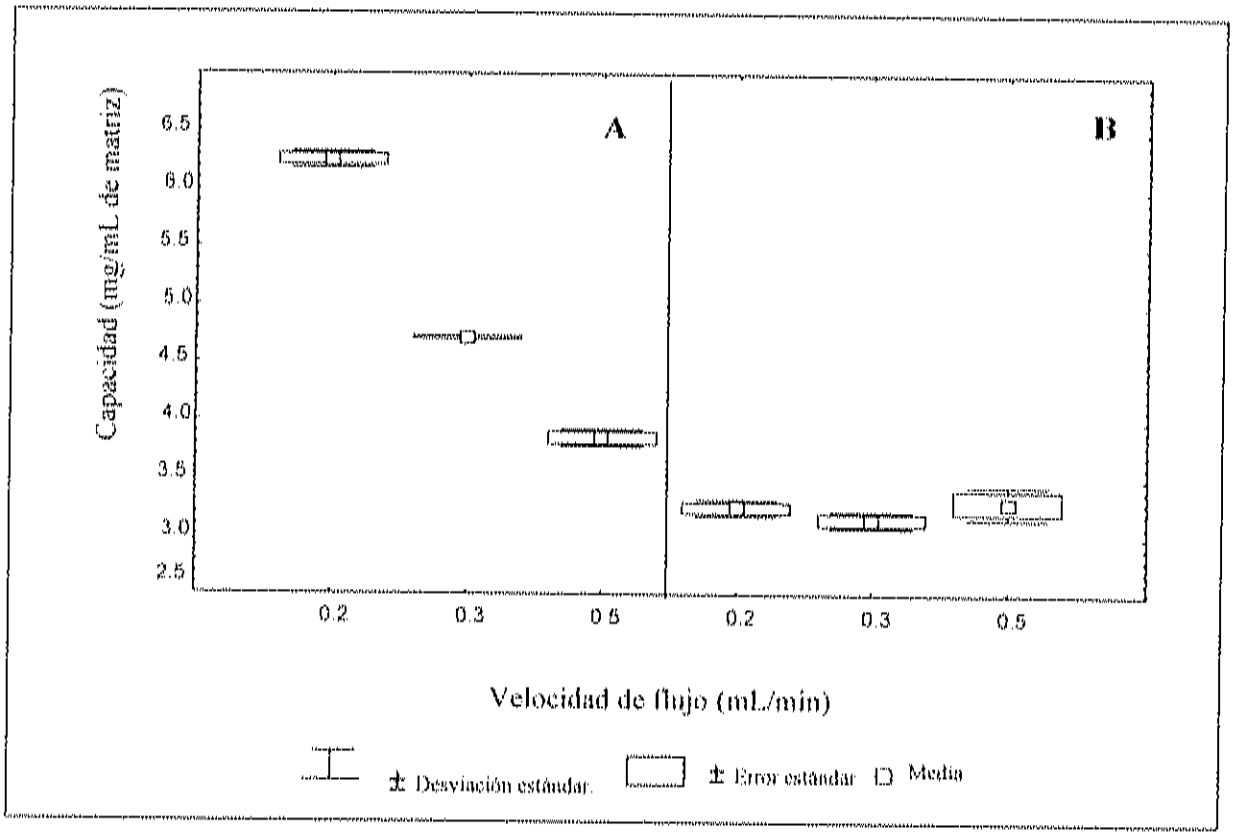

Figura 6. Influencia de la velocidad de flujo en la capacidad dinámica de las matrices acetiladas. **A**, Sefarosa HA y **B**, Novarosa EDA HA.

En condiciones de saturación se obtuvieron capacidades de 3.9±0.1 mg/mL de matriz, a flujo de 0.5 mL/min y de 3.7 ± 0.2 mg/mL de matriz, a flujo de 1 mL/min (Tabla 4). Al aplicar calostro a Sefarosa HA las capacidades encontradas fueron 4.0±0.3 mg/mL de matriz (0.5 mL/min) y 3.7±0.2 mg/mL de matriz (0.1 mL/min). La velocidad del flujo tampoco afectó la capacidad de Novarosa EDA HA, donde se observaron valores de 3.2± 0.2 mg/mL de matriz (0.5 mL/min) y 3.0±0.2 mg/mL de matriz (1 mL/min), para el suero y 3.1 ± 0.1 mg/mL de matriz (0.5 mL/min) y 3.0±0.1 mg/mL de matriz (1 mL/min), para el calostro.

Los resultados obtenidos al determinar la capacidad dinámica (Fig. 6) y la capacidad estática de Sefarosa HA (Fig. 7 y Tabla 4), indican que la capacidad de ésta matriz se vio afectada por la velocidad del flujo de la fase móvil, al aplicar la muestra muy diluida (8 mg/mL). Esta dependencia no se observó al aplicar muestras más concentradas

(40 mg/mL). Lo anterior podría constituir una ventaja para la eficiencia de los procesos de escalamiento, ya que con soluciones concentradas a flujos más altos, se obtendrían resultados similares y menor tiempo de permanencia de la proteína adsorbida en la matriz, que utilizando soluciones diluidas a flujos bajos.

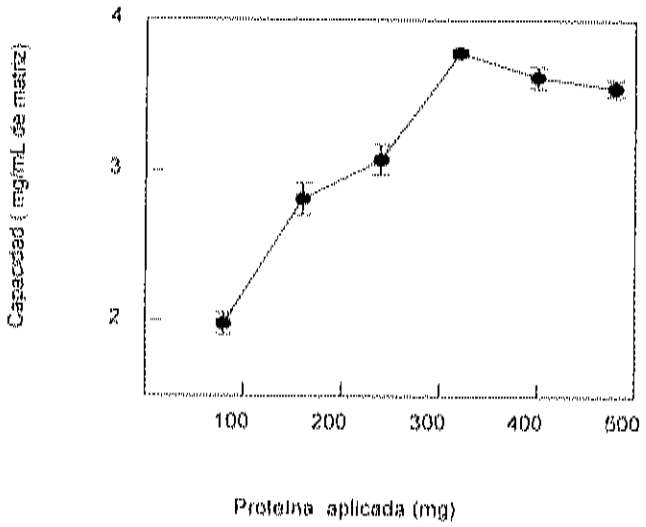

Figura 7. Comportamiento de la adsorción de proteínas en Sefarosa HA. Se determinó la capacidad estática aplicando diferentes cantidades de proteínas séricas en soluciones de 40 mg/mL.

Tabla 4. Capacidad estática de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA en condiciones saturantes

Matriz	Suero		Calostro	
	0.5mL/min	1 mL/min	0.5 mL/min	1 mL/min
	$\bar{X} \pm D.E$	$\bar{X} \pm D.E$	$\bar{X} \pm D.E$	$\bar{X} \pm D.E$
Sefarosa HA	3.9 ± 0.1	3.7 ± 0.2	4.0 ± 0.3	3.7 ± 0.2
Nov-EDA-HA	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.0± 0.1

$\bar{X} \pm$ Media. D.E = desviación estándar

El esquema cromatográfico descrito en este estudio, o uno muy similar eluyendo en presencia de PBS, han sido utilizados previamente en el Laboratorio de Bioquímica de Proteínas de CIAD, para el aislamiento de Ig´s séricas humanas. Inicialmente, con Sefarosa HA se obtuvo una capacidad de 2.8 mg/mL de matriz (Vázquez-Moreno *et al.*, datos no publicados). Por otro lado, Vega-Martínez (2002), encontró una capacidad de adsorción para Sefarosa HA de 1.43 mg/mL, al aplicar proteínas séricas porcinas. Estos trabajos se realizaron con diferentes velocidades de flujo, volúmenes de cama, temperatura ambiente y tiempos de acetilación. Más adelante se describe la influencia del tiempo de acetilación y del volumen de cama en la capacidad de Sefarosa HA.

Por lo que se refiere a la temperatura, Hjertén (1977) y Jennissen (1978), demostraron que la interacción de las proteínas en HIC, es directamente proporcional a la temperatura, al igual que las interacciones de van der Waals (Srinivasan y Ruckenstein, 1980). Otros autores indican que la temperatura induce cambios conformacionales en las proteínas que aumentan la exposición de sus sitios hidrofóbicos (Wu *et al.*, 1986), mientras que otros indican que el fenómeno es producto de cambios en la entropía (Hjertén *et al.*, 1974) o en la entalpía (Haidacher *et al.*, 1996). Para minimizar este efecto, las corridas se llevaron a cabo a temperaturas entre 22 y 25 °C

En el aislamiento de Ig´s séricas humanas, Novarosa EDA HA presenta una capacidad de 7.3 mg/mL (Candia-Plata *et al.*, 2001). Debido a la diferencia con la capacidad encontrada en este estudio (3.2 mg/mL de matriz) se repitieron, la síntesis con Novarosa 100/40 Act^{High} y los experimentos con suero y calostro porcinos. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los resultados. La capacidad de Novarosa EDA HA para muestras de suero porcino en las dos ocasiones fue de 3.2 mg/mL de matriz. Una posible explicación de la diferencia de capacidades entre el suero porcino y el humano, es que presentan diferente viscosidad. Además, los volúmenes específicos de las Ig´s porcinas son diferentes a los de las humanas (Monkos y Turczynski, 1999). Otro motivo pudo haber sido que el prolongado tiempo de almacenamiento de la Novarosa 100/40 Act^{High}, degradara parcialmente a la matriz, disminuyendo su capacidad.

II.3.3 Electroforesis SDS PAGE y cuantificación por IR de las inmunoglobulinas

La figura 8 muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras de las fracciones cromatográficas de Sefarosa HA. En la fracción de elución se observan 3 bandas principales. Según el patrón de migración de los estándares, a estas bandas les corresponden masas moleculares de 74, 52-60 y 25 kDa respectivamente. La banda de 74 kDa coincide con la masa molecular de las cadenas pesadas de la IgM (Pastoret *et al.*, 1998; Crawley Y Wilkie, 2003). Es muy probable que en la banda de 52 a 60 kDa se encuentren las cadenas pesadas de la IgA y la IgG, ya que las masas moleculares estimadas para estos anticuerpos por SDS-PAGE son de 58 y 52 kDa respectivamente (Pastoret *et al.*, 1998).Se sabe además que la IgG porcina presenta gran heterogeneidad y un elevado polimorfismo genético (Butler y Brown, 1994).Lo anterior pudiera explicar el intervalo de masas encontrado. La banda de 25 kDa corresponde a las cadenas ligeras de las Ig's. No se observó contaminación de albúmina.

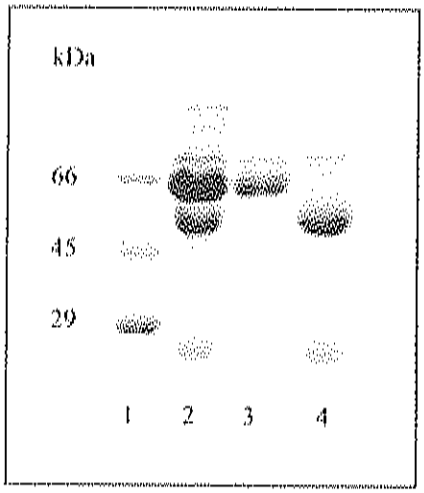

Figura 8. Electroforesis SDS PAGE de las fracciones proteicas obtenidas de Sefarosa HA. Las fracciones obtenidas al fraccionar suero porcino en Sefarosa HA, fueron aplicadas en un gel de poliacrilamida al 10%. Carril 1, estándares de peso molecular, carril 2 suero porcino, carril 3 fracción de lavado, carril 4 fracción de elución.

El patrón electroforético de Novarosa EDA HA difirió del de Sefarosa HA (Fig. 9). Podemos observar que en la fracción de elución se presentó una banda correspondiente a 66 kDa, patrón se repitió constantemente. En la fracción de lavado se observó una banda que corresponde a las cadenas pesadas de IgA-IgG indicando que parte de éstas no fue adsorbida. Los análisis de inmunodifusión radial practicados utilizando las condiciones en que se determinó la capacidad dinámica (Tabla 5), señalan que Sefarosa HA adsorbió el total de la IgA y de la IgG y el 55% de la IgM, mientras que Novarosa EDA HA adsorbió el 81% de la IgG, el 17% de la IgA y el 93% de la IgM. Novarosa EDA HA presentó una selectividad notable para IgM que puede aprovecharse para su aislamiento, por ejemplo acoplando dos columnas con Sefarosa HA y con Novarosa HA.

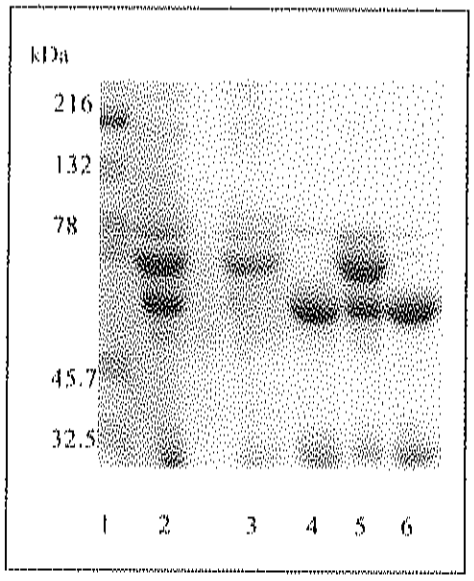

Figura 9. Electroforesis SDS PAGE de las fracciones séricas porcinas obtenidas de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA. Las fracciones cromatográficas de suero porcino obtenidas en Sefarosa HA y en Novarosa EDA-HA, fueron aplicadas a un gel de poliacrilamida al 10%. Carril 1: estándares de masa molecular, carril 2: suero porcino, carriles 3 y 4: fracciones de lavado y de elución de Sefarosa HA, respectivamente, carriles 5 y 6: fracciones de lavado y de elución de Novarosa EDA HA, respectivamente.

Tabla 5. Contenido de inmunoglobulinas séricas en las fracciones de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA

Immunoglobulina[a] mg/mL	Suero	Sefarosa HA Lavado	Sefarosa HA Elución	Novarosa EDAHA Lavado	Novarosa EDAHA Elución
IgA	2.3 ± 0.1	ND	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1
IgG	21.5 ± 0.7	ND	20.8 ± 0.9	4.2 ± 0.3	16 ± 0.5
IgM	4.0 ± 0.1	1.8± 0.1	2.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	3.7 ± 0.1

[a] Concentraciones estimadas por IR deacuerdo a Fahey y McKelvey (1965)
[b] Media y desviación estándar de 6 determinaciones
[c] No detectada

Los patrones electroforéticos del aislamiento de inmunoglobulinas a partir de calostro porcino fueron muy similares en ambas matrices (Fig. 10 A y B). El calostro presentó las siguientes bandas electroforéticas características según Hurley y Bryson (1999): a 80 kDa aparece la lactoferrina, entre 66-68 kDa se presenta la albúmina, las cadenas pesadas de la IgA e IgG a 55-58 kDa, las bandas de las diferentes caseínas presentas masas moleculares de 36 y 26 kDa, las cadenas ligeras de las Ig´s de 24-25 kDa, la β lactoglobulina de 19 kDa y la proteína rica en cisteina de 15.4 kDa. La α lactalbúmina presenta una masa por debajo de los 14 kDa y en estos geles no pudo ser determinada.

En las fracciones de elución se observaron las bandas características de las cadenas pesadas de las Ig´s y las de las cadenas ligeras. En estas últimas se observa una mayor abundancia de proteínas que pudieran explicarse como una probable contaminación con caseína, ya que las masas moleculares de las fracciones α (s1) (23 kDa) y β (24-26 kDa), son las que coinciden con la masa de las cadenas ligeras de las Ig´s (Hurley y Bryson, 1999).

En la Tabla 6 aparecen los resultados de IR de las fracciones cromatográficas. Se aplicaron Las eluciones de Sefarosa HA contienen el 92% de la IgG, el 77% de la IgA y el 35% de la IgM, mientras que la elución de Novarosa EDA HA contiene menor cantidad de IgA y mayor de IgM (57%). Las diferencias entre la adsorción de los diferentes isotipos de Ig´s de suero y de calostro, pudieran explicarse por una posible competencia por los sitios hidrofóbicos con la caseína u otras proteínas presentes en el calostro. Particularmente se

sabe que la β caseína, cuya masa es de 24 KDa, es una de las caseínas mas hidrofóbicas (Di Paola *et al.*, 2003)

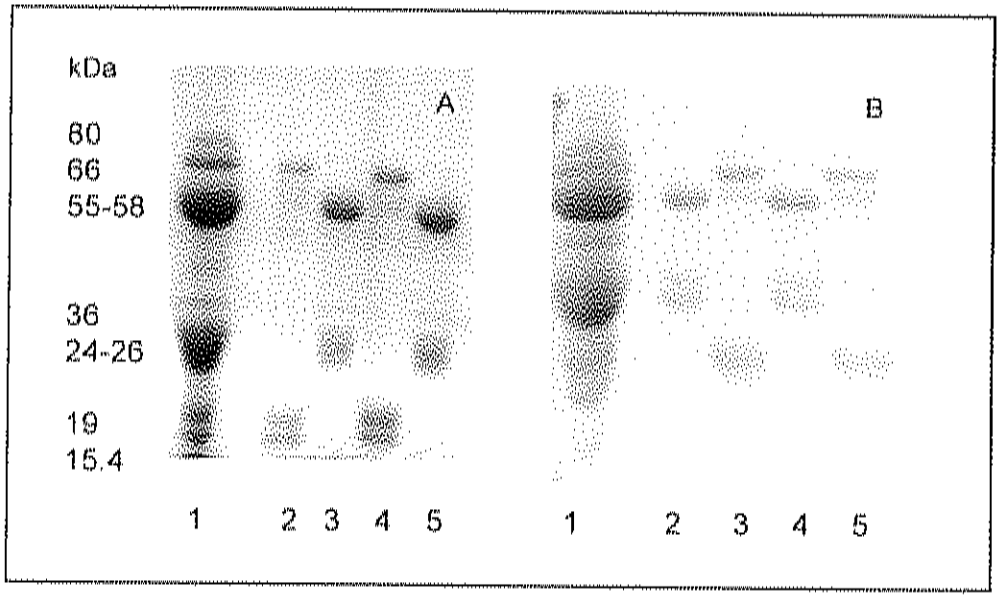

Figura 10. Electroforesis SDS PAGE de las fracciones de calostro porcino obtenidas de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA. Las fracciones cromatográficas de calostro porcino obtenidas en Sefarosa HA y Novarosa EDA HA. Se aplicaron a geles de poliacrilamida al 10% (A) Sefarosa HA (A) y (B) Novarosa EDA HA para el aislamiento de Ig´s calostrales porcinas. (A). Carril 1, calostro porcino, carriles 2 y 4 fracciones de lavado, carriles 3 y 5 fracciones de elución. (B). Carril 1 calostro porcino, carriles 2 y 4 fracciones de elución, carriles 3 y 5 fracciones de lavado.

En la Tabla 6 aparecen los resultados de IR de las fracciones cromatográficas practicados en las condiciones en que se determinó la capacidad dinámica. Las eluciones de Sefarosa HA contienen el 92% de la IgG, el 77% de la IgA y el 35% de la IgM, mientras que la elución de Novarosa EDA HA contiene menor cantidad de IgA y mayor de IgM (57%). Es probable que la caseína u otras proteínas compitieran por los sitios de adsorción con las Ig´s.

Tabla 6. Contenido de inmunoglobulinas calostrales en las fracciones de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA

Inmunoglobulina [a] mg/mL	Suero	Sefarosa HA Lavado	Sefarosa HA Elución	Novarosa EDAHA Lavado	Novarosa EDAHA Elución
IgA	9.3 ± 0.3	1.8± 0.1	7.2 ± 0.1	3.2 ± 0.04	5.8 ± 0.1
IgG	64 ± 2	5± 0.3	59 ± 1	6.1 ± 0.3	57.9 ± 0.4
IgM	4.2 ± 0.1	2.5± 0.2	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.4 ± 0.1

[a] Concentraciones estimadas por IR deacuerdo a Fabey y McKelvey (1965)
[b] Media y desviación estándar de 4 determinaciones

II.3.4 Adsorción específica de inmunoglobulinas porcinas a Sefarosa HA y Novarosa EDA-HA

La adsorción específica de Igs a las matrices, se determinó aplicando 40 mg de proteínas del aislado de Ig´s séricas porcinas, en soluciones de 4 mg/mL a velocidad de 0.5 mL/min a columnas cerradas de 0.5 mL de volumen de cama. La Figura 11 muestra el cromatograma típico obtenido. Sefarosa HA presentó una capacidad mayor (6.5 ± 0.3) que Novarosa EDA HA (4.5 ± 0.4) (Fig. 12). En ambos casos las capacidades fueron mayores a las encontradas al aplicar proteínas séricas totales (Tabla 3). Lo anterior es un indicio de que algunas de las proteínas presentes en la muestra cruda, pueden interferir con la adsorción de las inmunoglobulinas a la matriz.

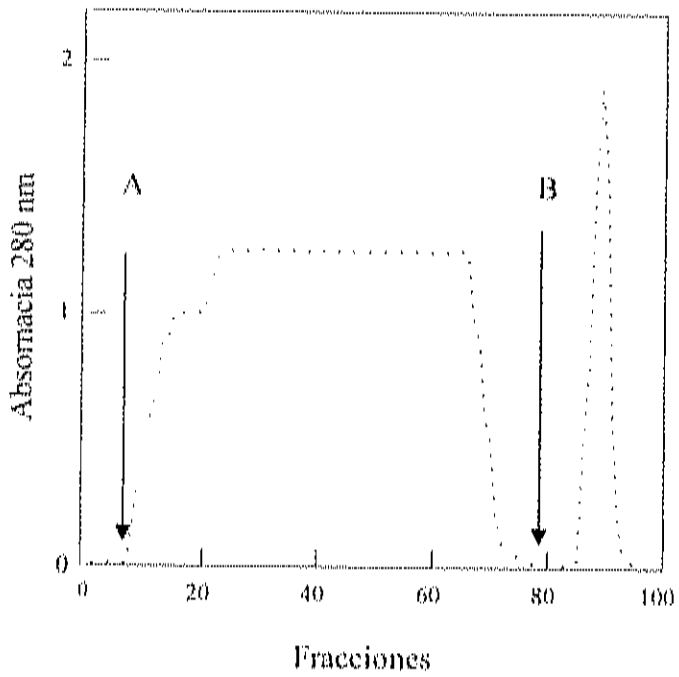

Figura 11. Patrón cromatográfico típico de la adsorción específica de inmunoglobulinas séricas porcinas a las matrices de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA. A Se aplicó el aislado de Ig´s a la columna lavando las proteínas no adsorbidas con Na_2SO4 0.5 M, MOPS, 10 mM. B. Las proteínas adsorbidas se eluyeron con MOPS 10 mM.

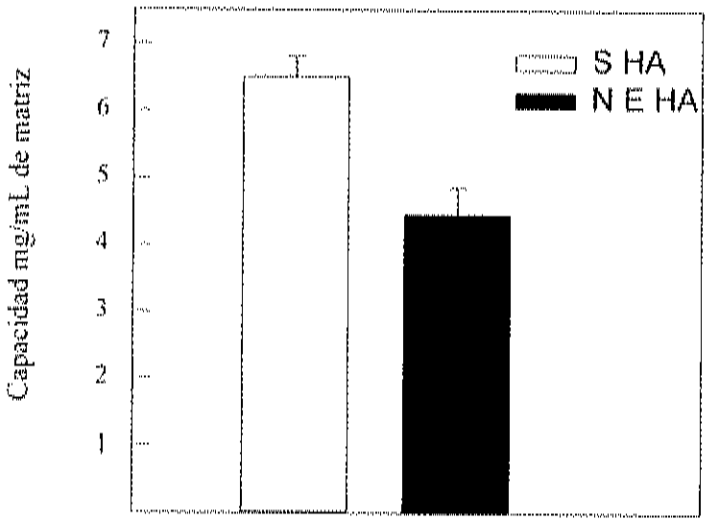

Figura 12. Capacidad de adsorción de las matrices de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA para aislados de inmunoglobulinas séricas porcinas.

II.3.5 Ensayo de inmunodetección en las fracciones cromatográficas

El ensayo de inmunodetección se llevó a cabo según Towbin *et al.*, (1979). Las fracciones de elución de Sefarosa HA se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% de acuerdo a Laemmli (1970) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca. La Figura 13 muestra la inmunodetección en las fracciones de suero porcino. Al poner en contacto a las tiras con anti IgG o anti IgA se revelaron manchas localizadas en la región de la banda de 52-58 kDa, mientras que con anti IgM se observó una ligera respuesta en esta región y otra muy débil correspondiente a una masa de 74 kDa. Lo anterior pudiera explicarse como una reacción cruzada, ya que los ensayos se realizaron con antisueros conteniendo anticuerpos policlonales, debido a que no fue posible disponer de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las Ig´s porcinas. Una probable explicación de las diferencias entre los ensayos de inmunodetección y las IR sería el que las Ig´s se encontraban en el primer caso desnaturalizadas y en el segundo en estado nativo.

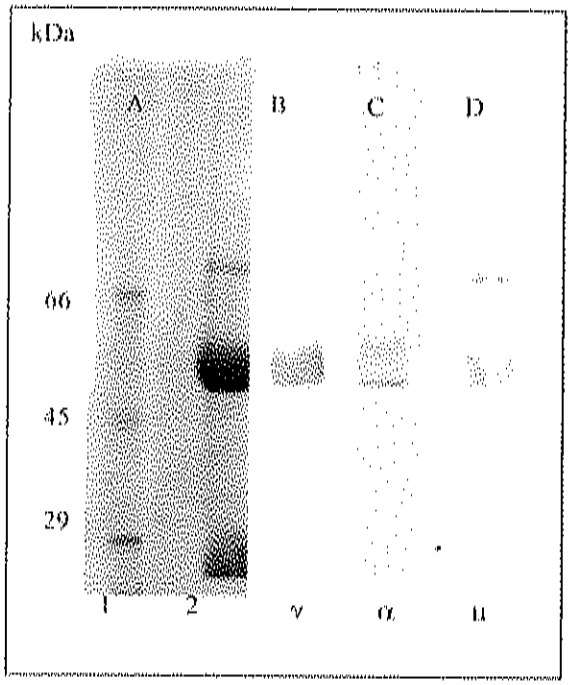

Figura 13. Ensayo de inmunodetección de la fracción de elución de Sefarosa HA al aplicar proteínas séricas. A. Gel de poliacrilamida al 10%, carril 1 estándares de masa molecular, carril 2 fracción de elución. B. membrana con anti IgG, C. membrana con anti IgA, D. membrana con anti IgM

II.3.6 Consideraciones para el escalamiento

El primer paso para los estudios de escalamiento fue la elección de la matriz más adecuada. Para ello se tomaron en cuenta la capacidad, selectividad, facilidad en el manejo y un análisis de costos. En la Tabla 7 se puede observar la comparación de diferentes parámetros entre las dos matrices, utilizando columnas abiertas con volumen de cama de 2 mL. El tiempo de operación utilizando Novarosa EDA HA resultó mayor debido a la oclusión constante de la matriz, lo cual requería de una mayor manipulación durante la limpieza y el necesario reempaque en la columna. Después de 20 corridas no se observó un cambio apreciable en la capacidad de las dos matrices, sin embargo, Sefarosa HA adsorbió mayor cantidad de los tres isotipos de Ig´s que Novarosa EDA HA. Por todo lo anterior se decidió intentar el escalamiento del aislamiento de Ig´s de suero porcino con la matriz de Sefarosa EDA HA.

Tabla 7. Comparación de las matrices cromatográficas

Parámetro	Novarosa EDA-HA	Sefarosa-HA
Volumen de cama (mL)	2	2
Flujo (mL/min)	1	1
Capacidad (mL/min)	3	3.7
Ciclos/día	4	4
Proteína aislada/día (mg)	24	30
Horas laboradas/día (h)	8	7.5
Costo por operador/h [a] (pesos)	210	184
Costo de soluciones/ciclo (pesos)	282	282
Costo preparación de soluciones/día	5	5
Número de ciclos/medio cromatográfico	20	20
Costo/reempaque/ día (min)	13	2
Costo total (pesos)	285.40	261.40
Tiempo por preparación de soluciones/día (h)	0.2	0.2
Tiempo de reempaque por día (h)	0.5	0.1
Tiempo total utilizado (h)	8.7	7.8

[a] Considerando sueldo de técnico académico en CIAD

Algunos aspectos de escalabilidad que deben considerarse antes de escalar un proceso en HIC son, la estabilidad física y química de la matriz, la influencia de la concentración salina, el efecto de compresión de la cama cromatográfica, el tratamiento de residuos, etc. (Anónimo, 1993). Debido a que se utilizó un esquema ya estandarizado no se realizaron estudios con diferentes concentraciones de Na_2SO_4. Un estudio anterior indica que la capacidad de Sefarosa HA aumenta al promover la adsorción con Na_2SO_4 1 M, sin embargo se observa contaminación con albúmina (Vega-Martínez, 2002). Adicionalmente se escogió al sulfato de sodio ya que el uso de la sal de amonio encarece el proceso por el costo de la sal y el de tratamiento de desechos (Anónimo, 1993).

Para estudiar la estabilidad de Sefarosa HA, se determinaron los cambios en la capacidad de la matriz debidos al tiempo de almacenamiento y a la exposición a guanidina. El tiempo de almacenamiento de la Sefarosa influyó notablemente en la capacidad de Sefarosa HA. La figura 14 muestra que la máxima capacidad obtenida en la matriz sintetizada a partir de Sefarosa almacenada durante 2 años, fue menor (2.98±0.3 mg/mL de matriz), que la de la matriz sintetizada a partir de Sefarosa almacenada por 12 días (3.78±0.2 mg/mL de matriz). La observación al microscopio del lote almacenado durante dos años, mostró disgregación en parte de las esferas observadas. Lo anterior pudo haber afectado la capacidad de la matriz debido a un menor grado de acetilación.

La Sefarosa HA fue bastante estable al tratamiento con guanidina, no se observaron cambios significativos en la capacidad de matriz después de mantenerla por dos semanas almacenada en guanidina 4 M a temperatura ambiente y en refrigeración (datos no mostrados).

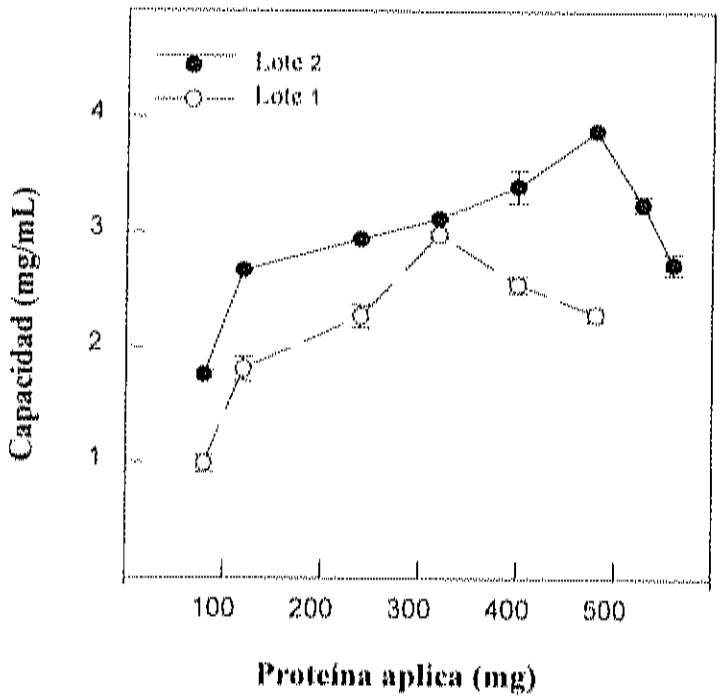

Figura 14. Influencia del tiempo de almacenamiento de la agarosa en la capacidad de adsorción de Sefarosa HA. Lote 1 (○), Sefarosa almacenada durante 2 años. Lote 2 (●), Sefarosa almacenada durante 12 días

La capacidad de Sefarosa HA también se vio influida por el tiempo de acetilación de la agarosa (Fig. 15). Al aplicar 480 mg de suero a columnas de 5 mL, se observó un aumento del 65 % en la capacidad de las matrices acetiladas por 36 h, con respecto a las acetiladas por 18 h. En HIC se observa un aumento en la hidrofobicidad y en la capacidad de las matrices a medida que aumenta el grado de sustitución del ligando hidrofóbico (Jennisen, 2000). El grado de acetilación de amilosa, ciclodextrinas y celulosa en presencia de anhídrido acético depende, entre otras cosas, del tiempo de reacción. Lo anterior puede deberse a que los grupos OH libres presentan diferente disponibilidad y reactividad (Lee *et al.*, 1999; Haque, 1997; Xu, 2003).

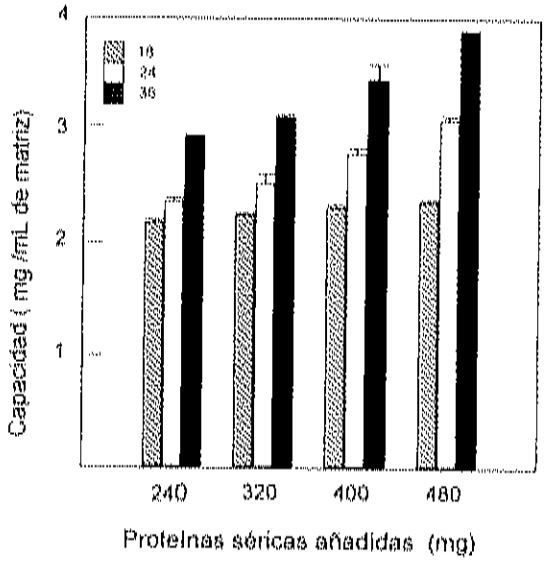

Figura 15. Influencia del tiempo de acetilación en la capacidad de adsorción de Sefarosa-HA

II.3.7. Escalamiento a nivel laboratorio, del aislamiento de Inmunoglobulinas séricas porcinas

El escalamiento se realizó utilizando como fuente de Ig´s al suero porcino. Este contiene cantidades apreciables de IgA, IgG e IgM derivadas de la inmunización natural de los cerdos adultos. Dichos anticuerpos han sido capaces de conferir inmunidad pasiva al lechón al ser sustituidos por el calostro (Gómez *et al.*, 1998).

Las estrategias para el escalamiento fueron las siguientes: En un primer experimento se aumentó el flujo de la fase móvil y el volumen de cama de la matriz, manteniendo la concentración de proteína (Sofer y Hagel, 1997). Se utilizó la concentración usada para obtener la capacidad estática (40 mg de proteína/mL de solución de suero aplicada), debido a que no se presentaron diferencias significativas entre la capacidad estática y la dinámica. Por otro lado, de emplearse concentraciones más diluidas, se aumentaría el tiempo de residencia de la proteína de interés y por tanto el riesgo de sufrir cambios conformacionales que afectasen su función biológica (Wu *et al.*, 1986).

La figura 16 presenta los resultados obtenidos para el escalamiento de Sefarosa HA del lote almacenado durante dos años y acetilada durante 36 h. Se observó se observa que

el volumen de cama afectó la capacidad de la matriz; al aumentar de 2 a 5 mL se observó una pérdida de la capacidad del 10% mientras que la pérdida de capacidad entre la columna con volumen de cama de 2 mL y la de 13 mL fue de cerca del 30%. El aumento del volumen de cama puede provocar la compresión debido a la pérdida de soporte de la matriz, afectando la difusión y la adsorción de proteínas (Anónimo, 1993). La compresión puede disminuirse utilizando matrices más rígidas y diámetros de columna más anchos (Anónimo, 1993; Sofer y Hagel, 1997). Los volúmenes de cama más grandes (23 y 46 mL), se empacaron en columnas con el doble de diámetro, probablemente por ello no se presentaron diferencias entre sus capacidades.

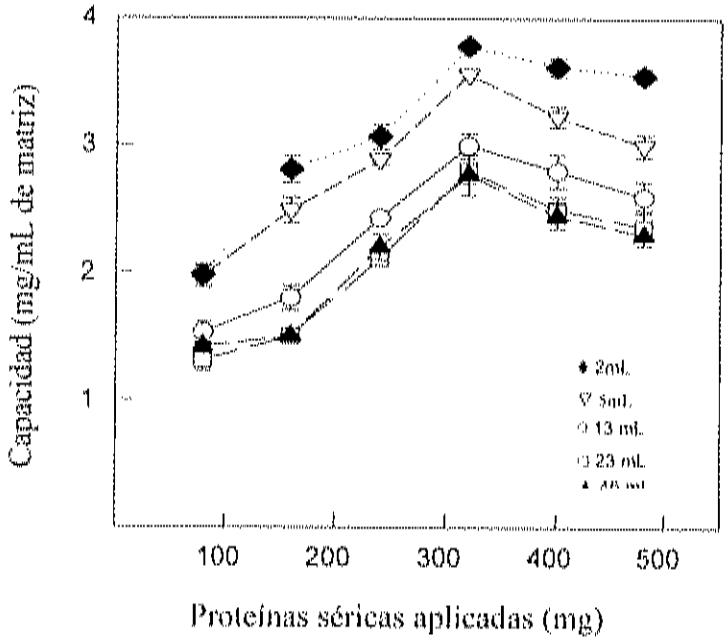

Figura 16. Influencia del volumen de cama y de la concentración de proteína aplicada sobre la capacidad de Sefarosa HA. Volúmenes de cama: 2 mL (♦), 5 mL (▽), 13 mL (○), 23 mL (□) y 46 mL (▲).

En las diferentes etapas de escalamiento se observó un comportamiento general en la capacidad de la adsorción de las Ig´s (Fig. 16), caracterizado por un aumento gradual en la capacidad hasta alcanzar un máximo, después del cual se observa una disminución. Este patrón se ha observado anteriormente en el aislamiento de Ig´s por HIC, tanto en geles como en membranas cromatográficas (Vega-Martínez, 2002; Cáseres-Carrisosa, 2003). Este comportamiento pudiera explicarse en base a los fenómenos de multivalencia e histéresis que se presentan en HIC (Jennissen, 2000).

En cromatografía de fase reversa, Ekström y Jacobson (1984), encontraron que los péptidos interaccionan con la matriz en un solo punto de unión, mientras que las proteínas lo hacen mediante múltiples puntos. En HIC, la posibilidad de contactos múltiples de las proteínas con los ligandos hidrofóbicos de las matrices fue probada en varios estudios (Hofstee, 1973; Hjerten *et al.*, 1974; Jennissen, 1978). La proteína puede establecer contactos múltiples con uno o varios ligandos en diferentes etapas del proceso, de tal manera que la adsorción y la desorción no muestran el mismo camino (Jennissen, 2000). Mientras se encuentra adsorbida, la proteína puede aumentar la intensidad de su interacción como resultado de una reorientación de la molécula o de cambios conformacionales que permitan una mayor exposición de las superficies hidrofóbicas de la proteína, de tal manera que el proceso de desorción no sigue el mismo camino que el de adsorción.

Debido a que los cambios conformacionales dependen entre otras cosas del tiempo de residencia de la proteína, éstos podrían darse con mayor facilidad en corridas largas en las que se esta aplicando una mayor concentración de proteínas séricas. Por otro lado, la multivalencia implica la saturación de los ligandos hidrofóbicos de la matriz, lo que se traduce en isotermas de adsorción de tipo sigmoidal (Jennissen, 2000). Si consideramos el total de la proteína adsorbida (la proteína eluida y la que queda en la fracción guanidina), en la curva obtenida al utilizar un volumen de cama de 2 mL de la Figura 17, obtenemos una isoterma de tipo sigmoide (Fig. 17 A). Lo anterior pudiera indicar que al menos parte de la proteína que quedó en la guanidina pudiera estar constituida por Ig´s que aumentaron su "afinidad" por el ligando mientras permanecían adsorbidas (Fig. 17 B).

El segundo experimento de escalamiento consistió en aplicar 680±2.6 mg y 2 g de proteínas séricas a columnas de Sefarosa HA, con volúmenes de cama de 46 y 100 mL respectivamente (Tabla 8). Se realizaron 10 corridas cromatográficas sin que se presentara pérdida de la capacidad de la columna. Las capacidades de adsorción fueron de 2.8 y 2.3 mg/mL para las columnas de 46 y 100 mL de cama respectivamente. No se presentaron variaciones en el patrón de elución en las diferentes etapas del escalamiento (Fig.18), aunque sí se notó compresión en la columna con mayor volumen y la presencia de un hombro al aplicar concentraciones de proteínas altas.

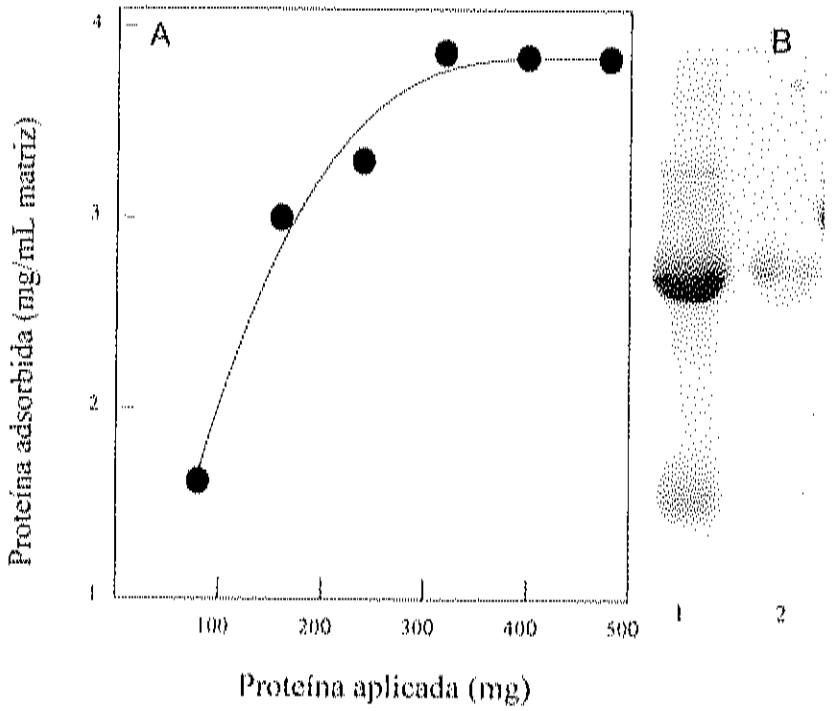

Figura 17. **A.** Isoterma de adsorción de las Ig's porcinas en Sefarosa HA. **B** Electroforesis SDS-PAGE (1) fracción de elución con MOPS 10 mM, regeneración con guanidina 4M (2).

Tabla 8. Efecto del escalamiento del aislamiento de inmunoglobulinas séricas porcinas, en la capacidad de adsorción de Sefarosa HA

Volumen de cama	Proteína aplicada	Lavado	Elución	Guanidina	Proteína recuperada (%)	Capacidad de adsorción mg/mL de matriz
mL	mg de proteína [a]					
2	240 ± 3.0	225± 2.2	7.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	98 ± 0.2	3.9
5	240 ± 3.1	217± 2.7	17.5 ± 0.3	1.3 ± 0.5	98 ± 0.3	3.5
46	680 ± 10.6	500± 8.7	130 ± 1.2	2.9 ± 0.5	93 ± 1.1	2.8
100	2000± 20.5	1600± 18	228 ± 7.4	4.2 ± 1.2	92 ± 3.0	2.3

[a] Bradford (1976)

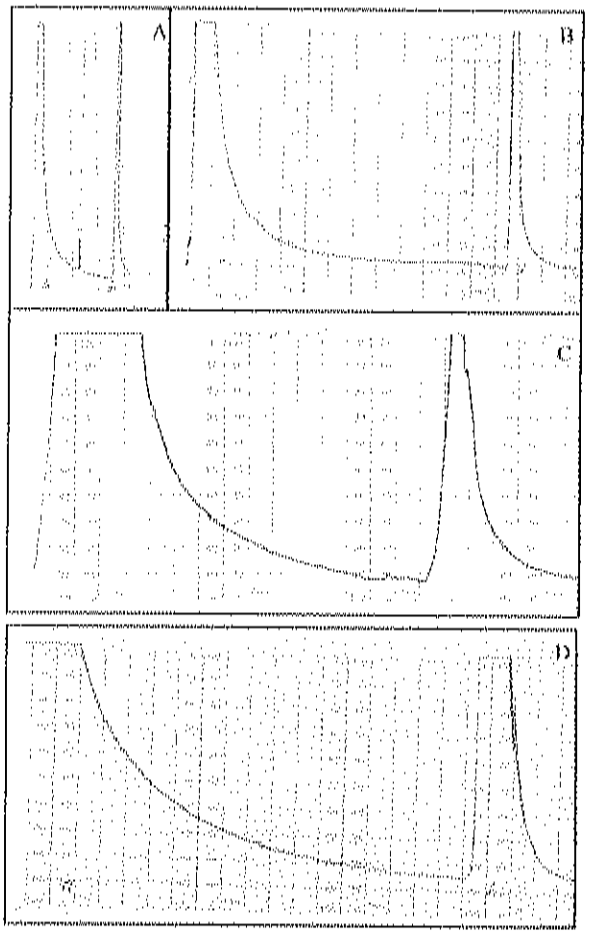

Figura 18. Resolución de Sefarosa HA a diferente concentración de proteínas séricas aplicadas. **A**. 80 mg, **B**. 240 mg, **C**. 480 mg, **D**. 640 mg.

Uno de los principales problemas que se presentaría en el escalamiento a nivel de planta piloto con Sefarosa-HA, es la disminución de la capacidad de adsorción al aumentar el volumen de cama, como indican la figura 16 y la tabla 8. Este efecto puede reducirse aumentando el diámetro de la columna (Sofer y Hagel, 1997). Adicionalmente puede utilizarse una columna de etapas en donde cada etapa puede visualizarse como un adsorbedor tipo tanque de volumen constante. El solvente fluye de una etapa hacia otra, mientras que el adsorbente permanece fijo (Tejeda *et al.*, 1995).

Para evitar problemas de distribución de flujo en columnas muy anchas, podría utilizarse la cromatografía de cama expandida EBA (por sus siglas en inglés). En esta cromatografía el adsorbente se expande por la acción de la presión con que se aplica la solución de equilibrio, formando un lecho fluidizado que permite la adsorción de la proteína de interés evitando la compresión de la matriz.

II.3.8 Comparación de Sefarosa HA con Gel T

El concepto del aislamiento de proteínas mediante cromatografía de adsorción tiofílica (TAC por sus siglas en inglés), fue desarrollado por Porath *et al.* (1985). Ligandos conteniendo grupos SH (originalmente mercaptoetanol), se inmovilizan a matrices de agarosa activada con divinilsulfona para formar los geles T. Estos geles exhiben una adsorción selectiva de inmunoglobulinas que se promueve en presencia de sal (Maisano *et al.*, 1985; Porath *et al.*, 1985; Belew *et al.*, 1987; Oscarsson y Porath, 1989). Por ello, Porath (1990) y Berna *et al.* (1998) reagruparon TAC y HIC como cromatografía de adsorción promovida por sal (SPAC, por sus siglas en inglés). En base a lo anterior se realizó la comparación con Sefarosa HA.

No se encontraron diferencias significativas entre los dos geles utilizando el esquema cromatográfico ya descrito. La capacidad dinámica del gel T fue de 3.63±0.3 mg/mL, mientras que la de Sefarosa HA fue de 3.9±0.1 mg/min, mientras que la estática (Fig. 19) fue de 3.7±0.1 y 3.9. El comportamiento de las dos matrices es diferente, en el gel T se observa una mayor adsorción de Ig´s a bajas concentraciones, mientras que ocurre lo contrario en Sefarosa HA. Lo anterior constituye una ventaja para el aislamiento con

Sefarosa HA ya que la muestra no tendrá que diluirse.

La Figura 20 muestra la electroforesis SDS PAGE de las fracciones cromatográficas de Sefarosa HA y del gel T. Las eluciones de ambos geles presentan la banda característica de las cadenas ligeras (23-25 KDa) y la de las cadenas pesadas cuya masa es de 55-58 KDa. En la elución de Sefarosa HA puede observarse también la banda de 72 KDa correspondiente a la IgM (Pastoret *et al.*, 1998). Las inmunodifusiones radiales (Tabla 9), mostraron que el gel T aísla preferentemente a la IgG, mientras que no adsorbe el 20% de la IgA y el 70% de la IgM. Como ya se mencionó, la Sefarosa HA retiene a la IgG, a la IgA y al 52% de la IgM. Lo anterior representa una ventaja cuando se pretende aislar la mayor cantidad de los tres idiotipos en un solo paso.

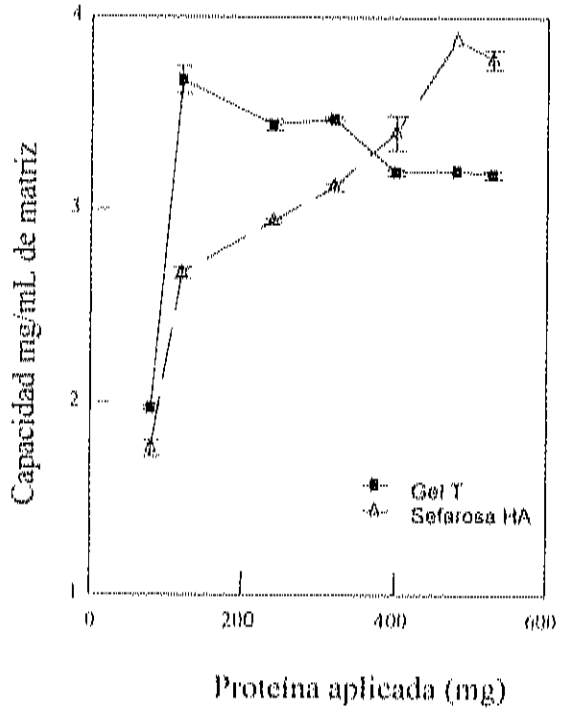

Figura 19. Capacidad de adsorción de inmunoglobulinas porcinas de Sefarosa HA (▲) y de gel T (■).Las matrices se equilibraron con Na_2SO_4 0.5M, pH 7.6, se cargaron con diferentes concentraciones de proteínas de suero porcino, se lavaron con Na_2SO_4 0.5M, pH 7.6 y se eluyeron con MOPS 10mM, pH 7.2. La capacidad se expresa como los mg de proteína eluida entre el volumen de cama de la matriz.

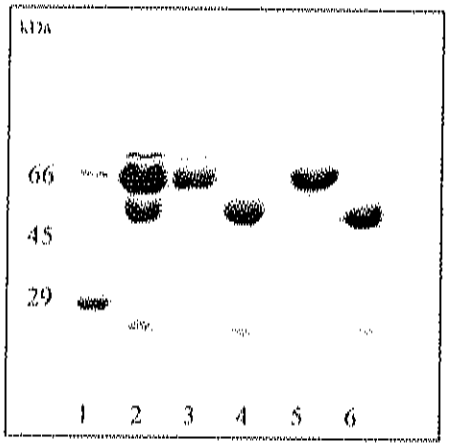

Figura 20. Electroforesis SDS PAGE de las fracciones cromatográficas de Sefarosa HA y Gel T. 1). Estándares de masa molecular. 2). Suero porcino. 3 y 4). Fracciones de lavado y elución de Sefarosa HA, respectivamente. 4 y 5). Fracciones de lavado y elución de Gel T, respectivamente.

Tabla 9. Contenido de inmunoglobulinas en las fracciones de Sefarosa HA y Gel T

Inmunoglobulina[a] mg/mL	Suero	Sefarosa HA Lavado	Sefarosa HA Elución	Gel T Lavado	Gel T Elución
IgA	2.3 ± 0.1	ND	2.2 ± 0.1	0.5 ± 0.03	1.8 ± 0.1
IgG	21.5 ± 0.7	ND	20.8 ± 0.9	ND	20.8 ± 0.3
IgM	4.0 ± 0.1	1.8± 0.1	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1	1.2 ± 0.04

[a] Concentraciones estimadas por IR deacuerdo a Fahey y McKelvey (1965)
[b] Media y desviación estándar de 6 determinaciones
[c] No detectada

En las condiciones de este estudio Sefarosa HA puede compararse con el gel T, lo que no ocurre con otras matrices de interacción hidrofóbica como la fenil y la octil sefarosa, que presentan una alta selectividad por la albúmina (Berna *et al.*, 1998). Adicionalmente el aislamiento de Ig´s en Sefarosa HA se lleva a cabo en un solo paso, mientras que en otras cromatografías, como la de afinidad, se requiere de una combinación de métodos, que incluyen a la cromatografía de intercambio iónico y a la de afinidad

antecedidas por la precipitación de proteínas con sulfato de amonio (Huse *et al.*, 2002).

Entre los métodos de afinidad utilizados en el aislamiento de Ig´s destaca el uso de columnas acopladas con receptores bacterianos que son reconocidos por el fragmento cristalizable (Fc), de los anticuerpos. Los más estudiados y utilizados son la proteína A de *Staphylococcus aureus* y la proteína G de *Streptococcus* spp, las cuales se unen a IgG de diferentes especies y con mucha menor afinidad a otras Ig´s (Forsgren y Sjoquist, 1966; Goodswaard *et al.*, 1978). Las principales limitaciones que presentan son el costo del proceso y el que las condiciones de elución se lleven a cabo en pH que pueden dañar a las inmunoglobulinas (Vijayalakshmi, 1998).

Por otro lado la proteína G posee sitios adicionales de unión para albúmina y $\alpha 2$ macroglobulina por lo que son frecuentes contaminantes en los aislados (Huse *et al.*, 2002). Algunos ligandos de bajo peso molecular que mimetizan los sitios de unión de la proteína A, presentan capacidades entre 29 y 51 mg/mL para la purificación de IgG humana, bovina o de cabra (Lihme y Hansen, 1997; Fascina, 2000). Sin embargo muestran una pobre selectividad para otro tipo de inmunoglobulinas, mientras que Sefarosa HA puede aislar los tres tipos en condiciones muy suaves de elución y sin contaminación por albúmina.

Algunas proteínas muestran afinidad por metales debido a que poseen regiones ricas en histidina. Por ejemplo, la IgG_1 murina posee un sitio afín a metales cerca de la región carboxilo terminal de la cadena pesada (Hale y Beidler, 1994). En base a lo anterior se ha utilizado la cromatografía de metales inmovilizados (IMAC) para aislar anticuerpos, principalmente del tipo IgG. Los principales contaminantes son la ferritina y la albúmina; las capacidades de las matrices van de 15 a 17 mg/mL dependiendo del flujo (Hale y Beidler, 1994; Baden *et al.*, 1995; Vaquero *et al.*, 1999; Zachariou y Eran, 2000; Ishibashi *et al.*, 2001). Vázquez-Moreno y Candia-Plata (1996), aislaron IgA, IgG e IgM porcinas, en un solo paso, utilizando Ni^{+2} quelado a una matriz de Sefarosa-IDA obteniendo una capacidad de 29 mg/mL. El principal problema que encontraron fue la lixiviación del níquel en las fracciones de elución.

Utilizando Sefarosa HA no se corre el riesgo de que el aislado de Ig´s contenga metales que pudieran ser tóxicos para el animal, sin embargo su capacidad de adsorción es baja comparada con la de IMAC. Lo anterior pudiera resolverse utilizando un mayor

volumen de cama en columnas más grandes y más anchas. Sin embargo la compresión de las esferas de agarosa limita la difusión entre partículas de la fase móvil y la velocidad a la que esta puede fluir. Estos problemas pueden disminuir considerablemente si se utiliza cromatografía de camas expandidas (EBA) o membranas cromatográficas (Huse *et al.*, 2002).

Concluido el estudio con Sefarosa HA y una vez que se obtuvo la cantidad suficiente de aislado de Ig´s se procedió a la elaboración de los concentrados líquidos de Ig´s. A éstos se les practicó un análisis microbiológico y un ensayo de reconocimiento con *E. coli* K 88. Debido a que durante el proceso del aislamiento se obtuvieron además de los aislados, cantidades considerables de fracción albúmina, se procedió a la caracterización fisicoquímica parcial de ésta, evaluando su contenido de aminoácidos y dos de sus propiedades funcionales, la solubilidad y la capacidad emulsificante. Estos temas son los que se tratarán en el siguiente capítulo.

CAPITULO III

PREPARACIÓN DE CONCENTRADOS DE INMUNOGLOBULINAS Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA PARCIAL DE LA FRACCIÓN ALBÚMINA

III.1 INTRODUCCION

III.1.1 Preparaciones orales de inmunoglobulinas

La aplicación por vía intravenosa con inmunoglobulinas ha sido establecida como terapia y prevención de infecciones bacterianas y virales (Kornhuber, 1984; Kliegman y Clapp, 1991). Después de la administración intravenosa de las Ig´s, aumenta el nivel de éstas en suero y tejidos, confiriendo inmunidad pasiva. Sin embargo, se ha observado que la administración intravenosa, no resulta útil para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, ni en humanos, ni en animales (Owen *et al.*, 1961; Stephan *et al.*, 1990). En cambio, los tratamientos orales con inmunoglobulinas humanas (Barnes *et al.*, 1982, Ebina, 1996), o bovinas (Tacket *et al.*, 1988; Stephan *et al.*, 1990) resultan más exitosos sobre todo en la prevención de diarreas infecciosas.

La administración oral de concentrados de Ig´s de calostro o huevo provenientes de animales hiperinmunizados, confieren inmunidad pasiva contra rotavirus (Bogstedt, 1996). También se ha demostrado que estas preparaciones previenen la diarrea por rotavirus cuando se usan como profilácticos (Ebina, 1996; Turner, 1993). Se piensa que estas preparaciones tienen la capacidad de inhibir la adhesión del virus a las mucosas intestinales. En mamíferos neonatos se ha observado que las preparaciones orales de Ig´s, resisten el ataque de proteasas y retienen su acción neutralizante (Blum, 1981; Hilpert, 1987).

Las preparaciones a partir de Ig´s séricas también se han utilizado en el tratamiento de diarreas por rotavirus en infantes mayores, observándose una reducción de la duración de la diarrea, en la excreción del virus y una recuperación significativamente (<0.05) más rápida que en los controles (Guarino, 1994). En cerdos privados de calostro e infectados con rotavirus, se observó que las Ig´s del plasma porcino, pueden conferir inmunidad

pasiva, aumentando la sobrevivencia del animal infectado (Gómez, 1997). En cerdos a los que se les suministraron Ig´s plasmáticas a partir del destete a los 21 días del nacimiento y hasta el día 58, se observó un efecto protector contra diarreas infecciosas, así como mejoras en el apetito y el crecimiento (Van der Peet-Schwering, y Binnendijk, 1995).

III.2 MATRIALES Y METODOS

III.2.1 Preparación y análisis microbiológicos de concentrados de inmunoglobulinas

La solubilidad de los aislados de Ig´s liofilizados se determinó según Hall (1996), como se describe en el artículo anexo. Los concentrados se prepararon a partir de éstos aislados solubilizados en PBS pH 7.2, a concentraciones de 50 mg/mL. Estas preparaciones se dividieron en 6 grupos para realizar los análisis de estabilidad microbiológica y presencia de virus. Los análisis microbiológicos se realizaron en 4 grupos de acuerdo al Manual Bacteriológico de la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (1995). Estos incluyeron cuenta total en placa, coliformes por número más probable (NMP), *Staphylococcus aureus* en agar Baird Parker y *Salmonella* sp (pre enriquecimiento en caldo lactosado, enriquecimiento en caldo tetrationato y siembra en los agares: Hektoen, sulfito de bismuto, xilosa-lisina desoxicolato y *Salmonella-Shigella*).

Los análisis se realizaron inmediatamente después de la preparación de los concentrados y 15 días después. Cada grupo de concentrado constituyó un tratamiento diferente. Grupo A: control almacenado a 25° C; grupo B: almacenado a 5°C; grupo C: con 0.1% de sorbato de potasio y almacenado a 25° C; grupo D: con 0.1% de sorbato de potasio y almacenado a 5° C. Los dos grupos restantes se enviaron a la Facultad de Veterinaria de la UNAM con la Dra. Rosalba Carreón para la detección de los virus por pruebas de seroneutralización. Las pruebas se aplicaron para los siguientes virus: Ojo Azul, Aujeszky, parvovirus porcino virus de la Gastroenteritis transmisible y Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS).

III.2.2 Interacción entre inmunoglobulinas porcinas y *E. coli* K88

La interacción de Ig´s con *E coli* K88, se determinó siguiendo los procedimientos de Ruhl *et al.* (1996) y de Wood y Warnke (1981) que se describen a detalle en el capítulo siguiente. Las eluciones de los aislados de Ig´s provenientes de las columnas de volúmenes de cama de 5, 23, 46 y 100 mL y el concentrado de Ig´s almacenado durante 15 días (refrigeración mas 0.1% de sorbato de potasio), se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa y se pusieron en contacto con *E. coli* K88 biotinilada. Se inmovilizaron dos concentraciones de Ig´s: 1 y 0.5μg. La interacción se reveló con el sistema avidina-fosfatasa alcalina utilizando el sustrato líquido BCIP/NBT (Sigma Aldrich, St Louis, MO.)

III.3. RESULTADOS Y DISCUSION

III.3.1 Preparación de concentrados de inmunoglobulinas

Previo a la preparación de los concentrados se determinó la solubilidad de las Igs aisladas. Esta se vio influenciada por el pH y en proporción directa por la fuerza iónica (Fig. 21). En soluciones con fuerza iónica de 0.25 M se encontraron valores del 74 al 97%. Los valores máximos se obtuvieron a pH 8. Las inmunoglobulinas se resuspendieron en PBS, pH 7.2 a concentración de 50 mg. Las preparaciones se dividieron en 6 grupos y se les practicó el análisis microbiológico.

La tabla 10 muestra el análisis microbiológico inmediatamente después de la preparación de los concentrados y luego de 15 días de almacenamiento en diferentes condiciones. No se detectó la presencia de patógenos en ninguno de los tratamientos. Después de 15 días de almacenamiento la cuenta total de organismos aerobios (UFC/mL) fue mayor en las preparaciones almacenadas a temperatura ambiente, que en las almacenadas en refrigeración. El efecto combinado de la refrigeración y del sorbato de potasio permitió que las preparaciones conservaran la calidad microbiológica inicial.

El ácido sórbico y sus sales no son tóxicos para el hombre ni los animales ya que se metabolizan por reacciones de β eliminación. La sal de potasio es la sal más utilizada, inhibe el crecimiento de hongos y de bacterias que atacan carne y derivados. (Robach y Sofos, 1982). También inhibe el crecimiento de *Salmonella, Staphylococcus aureus* (Yo y

Robach 1980), *Listeria monocytogenes* y otras psicrófilas (Moir y Eyles 1992; Hu y Shelef 1996).

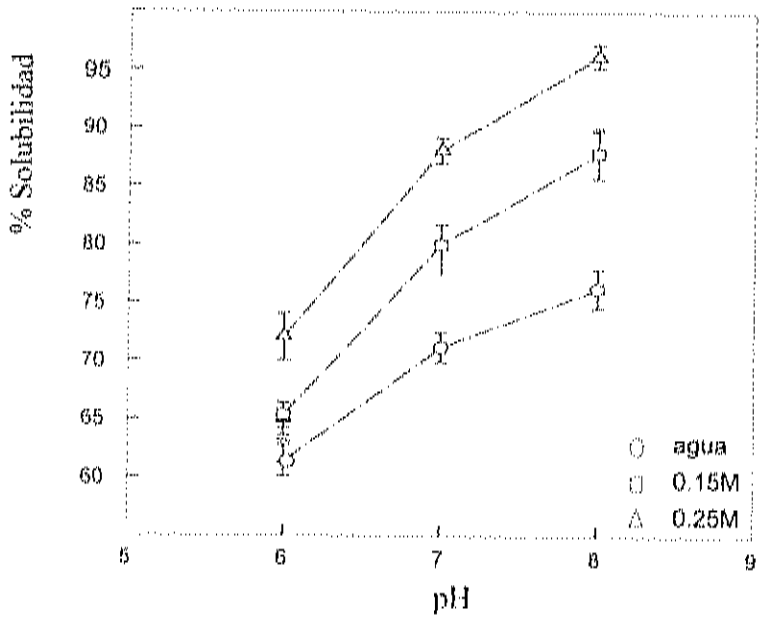

Figura 21. Influencia del pH y la fuerza iónica en la solubilidad de los aislados de inmunoglobulinas séricas porcinas

Tabla 10. Análisis microbiológico de los concentrados de inmunoglobulinas séricas porcinas después de 15 días de almacenamiento

Análisis	Inicial	Almacenamiento por 15 días			
		a	b	c	d
Mesofílicos aerobios (UFC/mL)	<10	100	20	10	<10
Coliformes (NMP/mL)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Salmonella spp	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus (UFC/mL)	< 10	<10	<10	<10	<10

a: temperatura ambiente b: 0.1 temperatura ambiente y 0.1% de sorbato de potasio
c: 5 °C d: 5 ° C y 0.1% de sorbato de potasio
n=4

Las pruebas de seroneutralización para la detección de los virus porcinos: Ojo Azul, Aujeszky, parvovirus porcino, gastroenteritis transmisible y síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), resultaron negativas lo que indica que las preparaciones cuentan con una excelente calidad microbiológica producto de las estrictas medidas de calidad impuestas en la granja y en el sacrificio, además de las buenas practicas de manufactura seguidas durante la separación cromatográfica y las operaciones de preparación de los concentrados.

III.3.2 Interacción de las Ig´s porcinas con *E. coli* K88

La interacción de las Ig´s de los concentrados y de las eluciones de los aislados obtenidos en diferentes volúmenes de cama, se probó inmovilizando 1 y 0.5 µg de Ig´s en tiras de nitrocelulosa y poniéndolas en contacto con *E. coli* K88 biotinilada. Esta bacteria es uno de los principales agentes patógenos de lechones neonatos y recién destetados (Carvajal, 2000; Mota, 1998). Todas las Ig´s interaccionaron con la bacteria (Fig. 22), lo anterior es un indicio de que el tiempo de permanencia en la matriz no afectó la funcionalidad de los anticuerpos y de que ésta permaneció estable en las preparaciones, después de 15 días de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración y con 0.1% de sorbato de potasio.

Figura 22. Interacción de Ig´s séricas porcinas con *E. coli* K88. La interacción se probó a dos niveles A, 1 (g, B, 500 ng, C, control. Se inmovilizaron Ig´s de los concentrados almacenados durante 15 días (carril 1) y de las eluciones de Ig´s obtenidas utilizando Sefarosa HA con volúmenes de cama de 5, 23, 46 y 100 mL (carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente).

La administración oral de Ig´s séricas protege a los cerdos neonatos y a los recién destetados contra las diarreas infecciosas (Scoot *et al.*, 1972; McCallum *et al.*, 1977; Drew y Owen, 1988; Gatnau y Zimmerman, 1991; Van der Peet-Schwering, y Binnendijk, 1995). En la figura 23 podemos observar que la reactividad de las Ig´s séricas con *E. coli* K88 es comparable a la de las Ig´s calostrales. La concentración mínima de Ig´s séricas en la que se observó reacción con *E. coli* K88 fue de aproximadamente de 63 ng. La reactividad fue similar con Ig´s calostrales aunque se observa una mayor intensidad en las manchas. Esta interacción debe comprobarse con estudios cuantitativos y queda por determinar si la concentración de 63 ng de Ig´s porcinas es útil para conferir protección a los lechones contra *E. coli* K88.

Debido a que existe una relación directa entre la concentración y el tiempo de administración de las Ig´s séricas y sus efectos protectores, pueden administrarse en mayor cantidad y durante un lapso mayor de tiempo, para igualar efectos de las calostrales (Owen *et al.*, 1961; Arthington *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998; Quiroz, *et al.*, 1998).

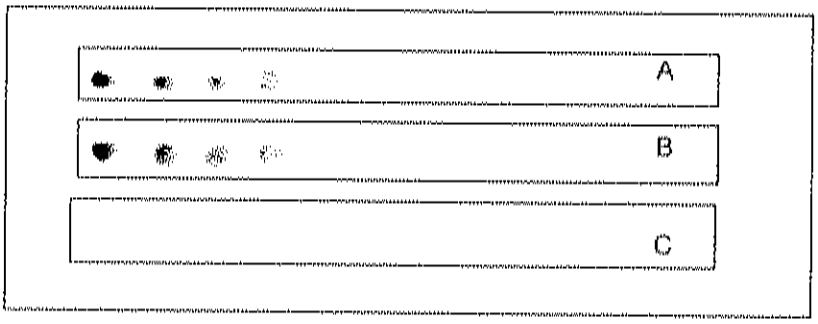

Figura 23. Comparación de la interacción de las Igs séricas y las Igs calostrales con *E. coli* K 88. Las Ig´s fueron inmovilizadas en doble dilución seriada desde 0.5 µg hasta 1 ng. A. Igs séricas, B. Igs de calostro, C. control.

Por definición, los anticuerpos son aquellas moléculas cuya producción viene provocada por la invasión de un antígeno al organismo. El anticuerpo tiene como principal objetivo el de reconocer específicamente al antígeno, a través de su región variable. De esta manera forma un inmunocomplejo que permitirá la posterior destrucción de la sustancia

invasora (Sánchez-Vizcaíno, 2000). Esta se lleva a cabo mediante el reconocimiento que se efectúa en la región Fc de los diferentes isotipos de Ig´s. Por ejemplo, la IgG1 y la IgG3 humanas son reconocidas por receptores Fc expresados en macrófagos y neutrófilos que se unen a ellas para destruir a los inmunocomplejos. Algunas bacterias como *Staphylococcus aureus*, expresan receptores bacteriales, que se unen de manera no inmune al fragmento Fc interfiriendo con sus funciones efectoras (Forsgren y Sjoquist, 1966; Goodswaard *et al.*, 1978).

Existe evidencia de otro tipo de interacción no inmune que se llevaría a cabo entre los oligosacáridos presentes en la región Fc de las inmunoglobulinas y las adhesinas que expresan algunos patógenos (Wold *et al.*, 1990; Ruhl *et al.*, 1996, Schroten *et al.*, 1998). Lamm (1997), indica que dichas interacciones pudieran estar involucradas en un mecanismo de defensa alternativo de los anticuerpos. De esta manera, al unirse las adhesinas del patógeno a los oligosacáridos de las Ig´s, se impediría la adhesión de los patógenos a las mucosas epiteliales. Para explorar esta hipótesis se realizó la tercera etapa de éste trabajo que consistió en purificar a los principales isotipos de Ig´s del cerdo, caracterizar a sus estructuras oligosacáridas y el posible reconocimiento de éstas por los dos principales patógenos bacterianos de lechones (E. *coli* K 88 y *Salmonella choleraesuis*).

Functional Properties of Protein Fractions Isolated from Porcine Blood

G. RAMOS-CLAMONT, S. FERNÁNDEZ-MICHEL, L. CARRILLO-VARGAS, E. MARTINEZ-CALDERÓN, AND L. VÁZQUEZ-MORENO

ABSTRACT: Red cell concentrate, serum, albumin, and immunoglobulin fractions were separated from porcine blood collected at a HACCP-implemented (Hazard Analysis and Critical Control Points system-implemented) slaughterhouse in Hermosillo, México. Functional and microbiological properties were examined. Red cell concentrate and serum isolates were high in protein (92 and 85%, respectively) but limited in methionine and isoleucine. Porcine serum and albumin fractions showed emulsifying properties comparable to bovine sources. Porcine immunoglobulins were 96% soluble. All fractions were of excellent microbiological quality. These results indicate the optimal sanitary conditions during slaughter and processing procedures, as well as the potential functionality of porcine protein fractions.

Keywords: HACCP, porcine serum, porcine albumin, porcine immunoglobulin, functional and microbiological properties

Introduction

BLOOD IS COMPOSED OF HIGHLY FUNCTIONAL PROTEINS, SUCH AS HEmoglobin, albumin, and immunoglobulin, and has a rich essential amino acid profile. In Mexico, porcine slaughterhouse blood is generally wasted, creating a serious pollution problem (Lopez and Rivera 1981; Pérez- Espejo 2000). A minimal part of this blood is processed into blood meal by extensive heat treatment, which destroys some of the protein functional properties (Bourgeois and Le Roux 1982); also, this type of processing results in products of inconsistent nutritional quality (Gordon 1971). Alternative porcine blood processing should be implemented in order to reduce contamination.

Proteins, like blood proteins, perform important roles in the functionality of foods and pharmaceuticals, as well as of biological systems (Vojdani 1996). Solubility is a functional property of primary importance due to its significant influence on the other properties of proteins (Halling 1981). In general, proteins used for functionality are required to have high solubility, in order to provide good emulsion, foam, gelation, and whipping properties (Vojdani 1996).

Blood products have been safely used for functionality in the European food industry for many years (Pearson and Dutson 1997). Bovine plasma is used as a surimi gel enhancement (Seymour and others 1997), as a textured meat protein (Terrel and others 1979; Welsmer-Pederson 1979; Rodas and others 1998), to clarify wine, as a foaming agent in baked goods, and in egg substitutes (Bates and others 1974). Plasma protein is a very strong binder upon heating; its proteins such as albumin and globulins are good emulsifiers (Ockerman and Hansen 2000). Oral ingestion of bovine immunoglobulin-enriched preparations have been found to be effective in experimental animal models as well as in human clinical trials against gastroenteritis (Tacket and others 1988, 1992; Lee and others 1994). Infants supplemented with bovine immunoglobulin preparations were protected against rotavirus (Brussow and others 1987).

In the past years, some authors have studied the nutritional effect of porcine blood in cereal fortification (Delaney 1975; Bates and others 1974). Autio and others (1984) studied the gelation properties of globin prepared from pig blood red cell concentrate. More investigation is needed about other functional properties of porcine blood protein fractions.

The successful usage of blood products depends on microbial safety, requiring close inspection and careful collection and handling procedures (Pearson and Dutson 1997). The microbiological safety of the food and feed supply, particularly animal products, has become an increasingly important concern to the public and is also a factor affecting international trade (Corlett 1998). Pig slaughter plants in Sonora have focused on the development and application of quality assurance programs such as the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system to control chemical, physical, and biological hazards during slaughter (Trueba-Rios 1998). The implementation of this system is being recommended for the control of food-borne pathogens in animal products (Corlett 1998).

In this paper some of the functional and microbiological properties of proteins isolated from porcine blood from a Federal Inspected Slaughter Plant complying with the HACCP system are reported.

Materials and Methods

Materials

Sepharose CL 6B was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden); microbiological media were obtained from Difco Lab (Detroit, Mich., U.S.A.); potassium sorbate was from Chisso Co. Inc. (Tokyo, Japan); all other reagents of analytical grade were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Mo., U.S.A.).

Sample preparation

Twelve samples of 10 L of blood each were collected in open trough in sterile containers at the bleeding line of a slaughterhouse (Federal Inspected Plant) in Hermosillo, México. This plant complies with the HACCP system. The Blood (no anticoagulant added) was transported in closed containers at 4 °C. Once in the laboratory, the blood coagulated at 25 °C, and serum separated from red cell concentrate by decantation. Half of the obtained serum and red cell concentrate were lyophilized and stored at −40 °C until analysis. Untreated serum was frozen at −40 °C until fractionation.

Critical control points

HACCP implemented system in the slaughter plant included testing of pig herds for *Salmonella* before dispatch to slaughtering.

© 2003 Institute of Food Technologists
Further reproduction prohibited without permission

sanitary dressing procedures, pre-evisceration antimicrobial wash, final wash step applied to the carcass, viscera and head, product wash, and proper chilling procedures. Also, monitoring of antimicrobial concentration in water, water pressure, carcass temperature, and verification of room temperature (data not shown). All operations in transporting, manufacture and storage of blood and blood fractions were conducted in accordance with good sanitation practices (Jouve 2000).

Analytical chromatography

Albumin and immunoglobulin fractions were obtained by hydrophobic interaction chromatography (HIC) using highly acetylated Sepharose 6B (HA-Sepharose) packed into a 10 × 2.5 cm column as described by Vázquez-Moreno and others (1992). Briefly, a HA-Sepharose column was equilibrated with 5 volumes of 0.5 M Na_2SO_4, 10 mM MOPS, pH 7.6 (Buffer A). A volume of 5 mL of serum was dissolved in equal volume of 1 M Na_2SO_4, 20 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), pH 7.5. The albumin fraction (unbound) was removed with buffer A. Immunoglobulins were eluted with 10 volumes of 10 mM MOPS, pH 7.2. All chromatographic procedures were monitored by adsorption spectrophotometry at 280 nm.

Proximate analysis

Composition of red cell concentrate, serum, and albumin fractions were determined as described by AOAC (1990). Protein, moisture, lipids, and ash were included in this analysis. Micro-Kjeldahl nitrogen was converted to percent protein using the factor 6.25. For amino acid determination the samples were hydrolyzed with 6 *N* HCl at 145 °C for 4 h (Lucas and Sotelo 1982). A Technicon amino acid analyzer model NC-2P (Terrytown, New York, N.Y., U.S.A.) was used. Tryptophan content was measured by the colorimetric method after alkaline hydrolysis (Rama Dao and Krishnan 1975; Lucas and Sotelo 1980).

Solubility

Nitrogen solubility (NS) of serum (S) and serum fractions (SF) was determined by the dye binding method of Bradford (1976). Briefly, 5 mL of S and SF protein dispersions were prepared into distilled deionized water to give suspensions containing 1 mg/mL. In addition, SF proteins were dispersed in 5 mL phosphate buffer saline (PBS) of ionic strength of 0.15 M and 0.25 M respectively. In serum dispersions, pH was adjusted from 5.0 to 8.0, while SF dispersions from 6.0 to 8.0. All preparations were shaken in a rocking plate shaker (Reliable Scientific 55, VWR, Batavia, Ill., U.S.A.) at 20 oscillations per min for 60 min at room temperature, and centrifuged at 4350 × *g* for 15 min (J2-MI Beckman Centrifuge, Palo Alto, Calif., U.S.A.). After microfiltration (0.22 μm) of supernatants, the protein contents were determined by the method of Bradford (1976) using a bovine serum albumin (BSA) standard curve. Solubility was expressed in percentage of total protein concentration. All determinations were done in triplicates.

Emulsifying activity index

Emulsions were prepared to contain 0.5% of protein (bovine or porcine serum, bovine albumin, and porcine albumin fraction) and 80 g of soybean oil (ϕ oil phase volume = 0.25). Emulsions were homogenized at 10000 rpm using an Ultraturrax T25 homogenizer (IKA® Works, Inc. Wilmington, N.C., U.S.A.) for 2 min at 25 °C.

Emulsifying activity was evaluated by spectroturbidity according to Pearce and Kinsella (1978). Triplicate aliquots of each emulsion were taken and diluted 500-fold with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution. The absorbance of the diluted emulsions were measured at 500 nm in a Spectronic 21 spectophotometer (Milton Roy, Rochester, N.Y., U.S.A.). The emulsifying activity was expressed as its emulsifying activity index (EAI). EIA = 2T/ϕc where T = turbidity; T = 2.3 A/l (A = absorbance at 500 nm and l = light path in mm); ϕ = oil phase volume, ϕ = 0.25, and c = concentration of protein (0.5%) before the emulsion is formed.

Emulsion stability

Emulsion stability (EA) was determinated in triplicate aliquots of each emulsion (see EAI) and according to Hill (1996). Briefly, 10 g aliquots of emulsions were placed in glass containers and transferred into a water bath at 80 °C for 1 h, then stored at 25 °C. EA was measured in samples after 24 h and 14 d of storage. Samples were centrifuged at 1400 × g for 15 min and the free oil expulsed was removed and weighted. The weight of released oil, divided by initial weight (oil in the sample) and multiplied by 100 was expressed as % of oil released from the emulsion. The more oil released the less the emulsion stability.

Immunoglobulin preparations

Eluted chromatographic fractions (immunoglobulin fractions) were extensively dialyzed against distilled water and freeze-dried (Virtis Bentchop 6.6, Gardiner, N.Y., U.S.A.). Immunoglobulin was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, to give solutions containing 50 mg/mL of protein. These preparations were distributed in 4 groups for microbiological analysis.

Microbiological analysis

The microbial quality of different fractions was conducted according to Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (FDA 1995). These analyses included aerobic plate count agar (Maturin and Peeler 1995) and coliforms by the most probable number (MPN) dilution technique (Hitchins and others 1995). *Staphylococcus aureus* by direct plate count method using Baird Parker agar (Bennett and Lancette 1995). *Salmonella* was isolated after a pre-enrichment in lactose broth followed by a selective enrichment in tetrathionate broth. Selective plating media included growth in Hektoen enteric (HE) agar, bismute sulfite (BS) agar, Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar, and *Salmonella-Shigella* (SS) agar (Andrews and others 1995). Analyses for immunoglobulin solutions were conducted immediately after preparation and 15 d later after storage at different conditions. Groups a and b were controls stored at 25 °C and 5 °C, respectively, while groups c and d were stored at 25 °C and 5 °C containing 0.1 % potassium sorbate.

Statistical analysis

Experiments were replicated 3 independent times. Descriptive statistics was conducted. All microbiological samples were plated in duplicate.

Results and Discussion

Proximate analysis

The compositions of serum, red cell concentrate, and albumin isolate are presented in Table 1. Moisture contents of all 3 fractions were from 2.0 to 2.7%. Protein ranged from 85% in serum, 92% in red cell concentrate, and 97% in the albumin fraction. The former fraction presented the lowest amount of minerals (ash) and lipids, and the highest concentration of protein. These results were consistent with those reported for red cell concentrate and plasma isolates from bovine blood (Tybor and others 1975).

Amino acid composition of serum, red cell concentrate, and albumin fractions (Table 2) showed all essential amino acids. However, methionine was the first limiting amino acid for serum and red cell concentrate and thryptophan for the albumin fraction. Isoleu-

cine in all fractions was lower than those levels indicated by FAO/WHO/UN (1985) for children 6 to 12 y. On the other hand, all 3 isolates appeared to be excellent sources of histidine, lysine, leucine, valine, phenylalanine, and threonine. In turn, serum and red cell concentrate could be complemented with proteins that provide methionine and isoleucine, such as caseinate (Ockerman and Hansen 2000). Albumin could be balanced with caseinate and synthetic tryptophan.

Concentration of threonine, valine, phenylalanine, and histidine of porcine serum were higher than those reported to be contained in bovine plasma, while levels of leucine and isoleucine were similar. However, values of lysine and methionine are lower for porcine than those reported for bovine plasma (Tybor and others 1975).

Solubility

Serum and blood fractions were freeze-dried since this procedure has little effect on protein solubility (Tybor and others 1975), a valuable characteristic for the functional application of proteins in food systems, that in turn affects emulsification, foaming and gelation (DeWit and Klarenbeek 1983). On the contrary, treatments that include drastic changes in pH, temperature (high), and ionic strength usually denature proteins, leading to formation of aggregates and loss of biological activities such as serum antibodies (Ustunil and Sypien 1997).

Protein solubility of porcine serum was determined as a function of pH (Figure 1). The minimum solubility occurred at pH 5.0, at which approximately 70% of the protein was soluble, while at pH 6 to 8.0, solubility increased from 85% to 92%. Bovine and poultry plasma proteins were reported to be soluble at 95% and 90 %, respectively, at pH 8 (Tybor and others 1975; Del Rio de Reys and others 1980). Porcine serum presented higher content of some hydrophobic amino acids, valine, leucine, and phenylalanine (Table 2) than bovine serum (Tybor and others 1975).). This fact, in part, explains the differences in their solubility behavior.

Both protein solubilities of porcine albumin and immunoglobulin fractions were little affected by changes in pH, while a significant effect was observed at different ionic strengths (Figure 2a and b). As expected, for albumin fraction, maximum solubility occurred in deionized water where approximately 90% of the protein was soluble a the tested pH values. Both 0.15 and 0.25 M salt concentrations showed less protein solubilized than in water (Figure 2a).

Porcine immunoglobulin fractions were more soluble in 0.25 M PBS than in 0.15 M salt and deionized water (Figure 2b) and maximum solubility occurred at pH 8.0, with approximately 96% of the protein soluble. Bovine Cohn fractions II and III (controls) showed 92% solubility at the same conditions (data not shown).

Emulsifying activity index (EAI)

To determine the ability of porcine serum proteins to aid formation and stabilization of oil-in-water (o:w) emulsions, the emulsifying activity index was investigated. Table 3 shows EAI of porcine serum and porcine albumin fraction, and also of bovine serum and albumin (as controls). The area of interface stabilized per unit weight of protein was slightly larger for porcine serum (172 units) than for its albumin fraction (165 units). Both bovine controls had more emulsifying activity probably due to their difference in solubility.

Porcine proteins had similar values as those reported by Pearce and Kinsella (1978) for sodium caseinate (EIA: 166), and higher than whey proteins (EIA: 101) and egg albumin (EIA: 49). Therefore, the proteins studied are suitable alternatives for forming and stabilizing o:w emulsions. It has been shown that proteins stabilize food emulsions and form films that impart greater stability to the

Table 1—Proximate composition of lyophilized porcine blood fractions

	Red cell concentrate			Serum			Albumin		
	%	sd	cv(%)	%	sd	cv(%)	%	sd	cv(%)
Moisture	2.7	0.24	8.8	2.3	0.12	5.2	2.0	0.078	4.0
Protein	92.0	0.89	1.0	85.0	2.17	2.6	97.0	0.40	0.4
Lipids	0.7	0.03	7.1	4.3	0.46	6.8	0.2	0.01	5.8
Ash	5.1	0.50	9.7	4.6	0.21	4.6	1.2	0.01	0.9

n = 24; Duplicates were conducted at each sample
sd: standard deviation, cv: coefficient of variation

Table 2—Amino acid composition* of lyophilized porcine blood protein fractions

Amino acid	Red cell concentrate (X ± SD)	Serum g/100g protein (X ± SD)	Albumin (X ± SD)
Essential			
Valine	15.64 ± 0.98	9.38 ± 0.35	3.01 ± 0.18
Methionine	[a]0.72 ± 0.04	[a]0.87 ± 0.01	[b]0.49 ± 0.03
Isoleucine[b]	2.00 ± 0.07	1.27 ± 0.10	1.56 ± 0.12
Leucine	12.80 ± 0.82	14.86 ± 1.35	6.83 ± 0.40
Tryptophan	1.39 ± 0.07	1.42 ± 0.09	[a]0.43 ± 0.03
Lysine	7.22 ± 0.12	7.74 ± 0.41	5.00 ± 0.37
Histidine	3.41 ± 0.10	9.36 ± 0.58	4.91 ± 0.33
Threonine	8.23 ± 0.16	7.15 ± 0.33	4.83 ± 0.33
Phenylalanine	7.22 ± 0.28	7.74 ± 0.46	5.00 ± 0.40
Nonessential			
Aspartic acid	13.57 ± 1.00	10.59 ± 0.85	17.33 ± 1.32
Glutamic acid	10.36 ± 0.82	5.38 ± 0.46	5.20 ± 0.44
Tyrosine	6.00 ± 0.45	3.06 ± 0.28	2.97 ± 0.22
Serine	6.42 ± 0.50	2.56 ± 0.20	4.44 ± 0.41
Proline	9.34 ± 0.77	2.25 ± 0.20	4.18 ± 0.40
Alanine+Glycine	6.05 ± 0.46	12.63 ± 1.00	3.34 ± 0.18
Cysteine	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.03	0.07 ± 0.00
Arginine	6.50 ± 0.60	5.47 ± 0.50	4.91 ± 0.28

(X ± SD):Mean values and standard deviation of 3 independent determinations
[a]1st limiting amino acid (Relative to FAO/WHO/UN 1985 Energy and protein requirements)
[b]2nd limiting amino acid

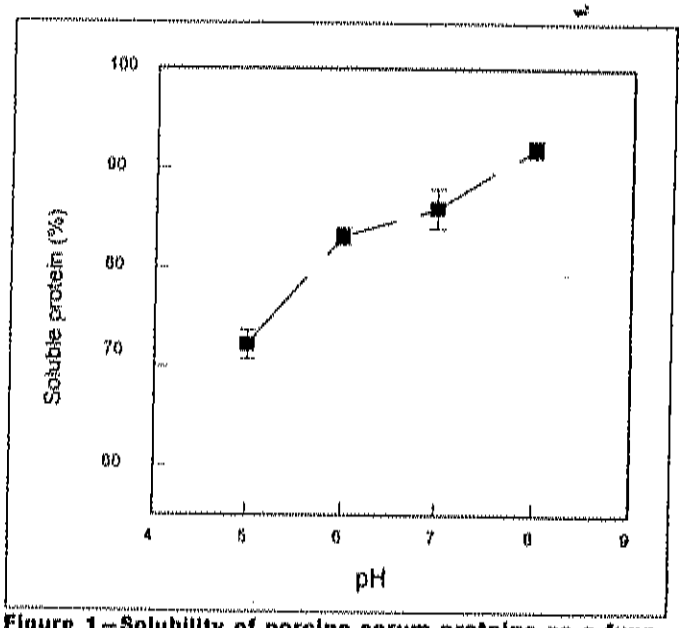

Figure 1—Solubility of porcine serum proteins as a function of pH

JFS is available in searchable form at www.ift.org

Table 3—Comparison of emulsifying activity and emulsion stability of serum and albumin fractions from porcine and bovine blood

Source	Emulsifying activity index m^2/g 0.5% (X ± SD)	Emulsion stability (% of oil released) 24 h (X ± SD)	14 d (X ± SD)
Porcine serum	76.2 ± 5.40	2.0 ± 0.09	3.4 ± 0.09
Bovine serum (control)	201.0 ± 4.53	1.0 ± 0.20	1.5 ± 0.12
Porcine albumin fraction	165.0 ± 5.65	0.5 ± 0.02	1.3 ± 0.07
Bovine albumin (control)	189.4 ± 6.75	0.4 ± 0.01	1.0 ± 0.06

(X±SD): Mean values and standard deviation of 3 independent determinations n=9.

Table 4—Microbiological analysis of porcine red cell concentrate, serum, and albumin fraction

	Red cell	Serum	Albumin fraction
Mesophilic aerobes (CFU/g)	< 100	< 10	< 10
Coliforms (MPN/g)	< 3	< 3	< 3
Salmonella *	nd	nd	nd
Staphylococcus aureus (CFU/g)	< 10	< 10	< 10

*Not detected in 25 g
n = 24. Duplicates were conducted at each sample.

Table 5—Microbiological analysis of liquid immunoglobulin preparations after 15 d of storage

	Initial	Stored for 15 d a	b	c	d
Mesophilic aerobes (CFU/mL)	<10	100	20	10	<10
Coliforms (MPN/ml)	<3	<3	<3	<3	<3
Salmonella *	–	–	–	–	–
Staphylococcus aureus (CFU/mL)	<10	<10	<10	10	<10

*Not detected in 25 mL
a: control at room temperature
b: 0.1%potassium sorbate at room temp
c: control stored at 5 °C
d: 0.1% potassium sorbate stored at 5 °C
n = 4. Duplicates were conducted at each treatment condition.

emulsion than smaller nonprotein amphiphiles such as monoglycerides or Tween 80 (Dickinson and Stainsby 1982).

Emulsion stability

The percent of oil released from emulsions prepared with porcine serum and albumin fractions was determined after 24 h and 14 d of temperature treatment (80 °C for 1 h). Emulsions prepared with albumin fractions (0.5 and 1.3%) were more stable than those prepared with serum (2.0 and 3.4%). Porcine albumin fraction showed a similar behavior as bovine albumin. Other frequently used blood proteins, such as egg albumin powder, casein, whey powder, soy flour, and soy isolate are reported to have 11.8, 5.2, 100, and 94% of oil released after 24 h of temperature treatment, respectively (Hill 1996).

Microbiological analysis

Freeze-dried serum, red cell concentrate, and albumin fractions were microbiologically analyzed (Table 4). Red cell concentrate fraction contained less than 100 viable aerobic CFU/gram, while in serum and albumin fractions, the total viable mesophilic aerobes (CFU/gram) were less than 10. All samples tested contained less than 3 MPN/g of coliforms and bacterial colonies, indicating the presence of *Salmonella* or *Staphylococcus aureus* was not observed.

Initial microbiological analysis for liquid immunoglobulin solutions showed high-quality preparations (Table 5). After 15 d of storage, total viable aerobic counts (CFU/mL) were higher in prepara-

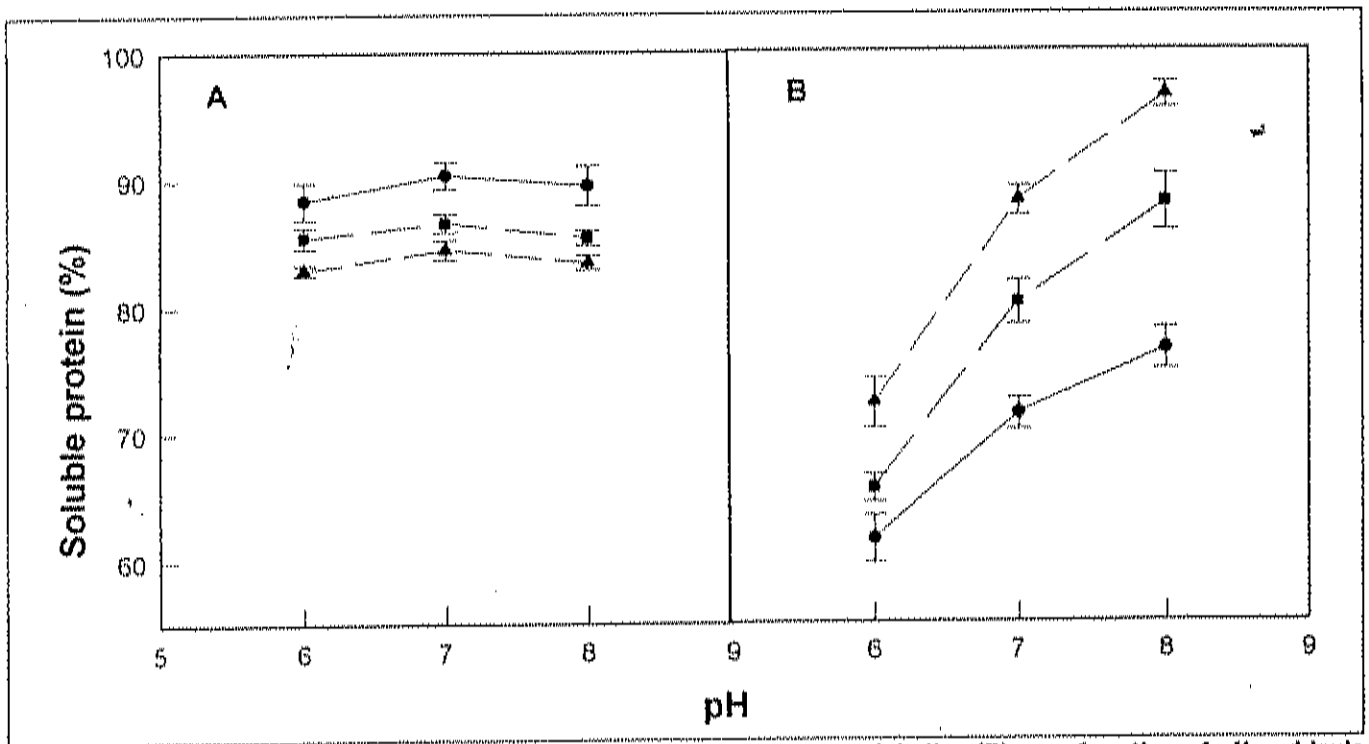

Figure 2—Solubility of porcine albumin fraction (A) and porcine immunoglobulins (B) as a function of pH and ionic strength. Deionized water (○), 0.15M (□), 0.25M (△).

tions stored at room temperature than those at 4 °C. The combined effect of low temperature and potassium sorbate showed no changes in total viable aerobic organisms, with respect to initial results. Potassium sorbate not only inhibits molds effectively but also has antimicrobial activity to many bacterial species that are involved in spoilage of fresh poultry, fish, and meats (Robach and Sofos 1982; Fenema 1996). In addition, there are reports where potassium sorbate is used to inhibit the growth of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (To and Robach 1980), *Listeria monocytogenes* and other psicrotrophic spoilage bacteria (Moir and Eyles 1992; Hu and Shelef 1996). The presence of coliforms, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were not observed initially and after 15 d. Further analysis of viral clearance is necessary to determine the safety of these preparations.

Conclusion

PORCINE PROTEIN FRACTIONS CONSTITUTE A GOOD ALTERNATIVE TO other protein sources. As expected, both red cell concentrate and serum isolates were high in protein but limiting in methionine and isoleucine, with values similar to equivalent bovine fractions. Porcine serum and albumin fraction have emulsifying properties comparable to bovine sources and are better than other reported proteins used in the food industry (such as casein, egg albumin, soy proteins). Porcine immunoglobulins isolation and processing methods employed did not affect solubility. This fraction was 96% soluble at pH 8.0; they can easily be incorporated into liquid preparations for veterinary prophylactic purposes. In this study, the microbial quality of blood and its components, serum, red concentrate, and albumin porcine fractions indicate the good sanitary conditions at the slaughterhouse and lack of contamination while obtaining blood protein fractions.

References

Andrews WH, June GA, Sherod P, Hammack TS Anagnostopoulos BH, 1995. *Salmonella* In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Arlington, Va.: AOAC International. p 5.1-20.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis.15th ed. Sections 960.62, 923.03, 934.01, 983.15. Washington, D.C. USA: Association of Official Analytical Chemists International. 1298 p.

Autio K, Kiesvaara M, Mäkki Y, Kanko S. 1984. Chemical and functional properties of blood globin prepared by a new meted. J Food Sci 49:859-62.

Bates RP, Wu L C, Murphy B. 1974. Use of animal blood and cheese whey in bread: nutritive value and acceptance. J Food Sci 39:585-7.

Bennett RW, Lancette GA. 1995. *Staphylococcus aureus* In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. USA: AOAC International. p 12.1-5.

Bourgeois CM, Le Roux P. 1982. Proteinas Animales. México: Editorial el Manual Moderno. 346 p.

Bradford MM.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54.

Brussow H, Hilpert H, Walther I, Sidoti J, Mietens C, Bachmann P.1987. Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastroenteritis. J Clin Microbiol 25(6):982-6.

Corlett DA.1998. HACCP user's manual. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers Inc. 519 p.

Delaney RAM. 1975. The nutritive value of porcine blood plasma concentrates prepared by ultrafiltration and spray drying. J Sci Food Agric 26:303-10.

Del Rio de Reys MTE, Constantinides SM, Sgarbieri VC, El-Dash AA. 1980. Chicken blood plasma proteins: Physicochemical, nutritional and functional properties. J Food Sci 45:17-20.

DeWit JN, Klarenbeek G. 1984. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. J Dairy Sci 67:2701-10.

Dickinson E, Stainsby G. 1982. The oil-water interface and emulsion stability. In: Colloids in Foods. London: Applied Science Publishers. p 158-62.

FAO/WHO/UN. 1985. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: World Health Organization, Geneva. 30 p.

FDA.1995. Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Arlington, Va.: Association of Official Analytical Chemists International. 510 p.

Fennema OR. 1996. Food Chemistry. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc. 1069 p.

Gordon A. 1971. Animal blood as a source of proteins in food products. Food Trade Rev 41(4):20.

Halling PJ. 1981. Protein-stabilized foams and emulsions. CRC, Crit Rev Food Sci Nutr 13:155-203.

Hill SE. 1996. Emulsions In: Hall GM, editor. Methods of testing protein functionality. London: Blackie Academic and Professional. p 153-63.

Hitchins AD, Feng P, Watkings WD, Rippey SR, Chandler LA. 1995. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Food and Drug Administration bacteriological analytical manual. 8th ed. Arlington, Va.: AOAC International. p 4.1-29.

Hu AC, Shelef LA. 1996. Influence of fat content and preservatives on the behavior of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage. J Food Safety 16:175-81.

Jouve JL. 2000. Good Manufacturing Practice, HACCP, and Quality Systems. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW editors. The microbiological safety and quality of foods. Gaithersberg, Md.: Aspen Pub. p 1627-55.

Lee G, Welzin R, Soman G, Georgakopoulos K, Houle D, Monath P. 1994. Oral administration of polymeric IgA prevents colonization with *Vibrio cholerae* in neonatal mice. Infection and Immunity 62(3):887-91.

López R, Rivera C, 1981, Estudio del secado por aspersión de masa celular y plasma de sangre de bovino (BSci dissertation). Orizaba, Veracruz: Facultad de Ciencias Químicas Univ. Veracruzana en Orizaba. 70 p. Available from: Univ. of Veracruz Library.

Lucas R, Sotelo A. 1980. Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and foods. Anal Biech 109:192-7.

Lucas R, Sotelo A. 1982. Amino acid determination in pure protein , foods and foods using 2 different acid hydrolysis methods. Anal Biochem 123:349-56.

Maturin LJ, Peeler JT. 1995. Aerobic plate count In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Arlington, Va.: AOAC International. p 1-10.

Moir CJ, Eyles MJ. 1992 Inhibition, injury, and inactivation of 4 psychrotrophic foodborne bacteria by the preservatives methyl p-hydroxybenzoate and potassium sorbate. J Food Protect 55:360-6.

Ockerman HW, Hansen CL. 2000. Animal by- product processing and utilization. Lancaster, PA,USA: Technomic Publishing Co. 523 p.

Pearce KN, Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of proteins. Evaluation of a turbidimetric technique. J Agri Food Chem 26:716-23.

Pearson AM, Dutson TR, 1997. Use of additives from plant and animal sources in the production of low-fat meat and poultry products. In: Eliert SJ, Mandigo RW, editors. Production and processing of healthy meat , poultry and fish products. Advances in meat research series, Vol 11. London: Blackie Academic and Professional. p 210-25.

Pérez-Espejo R. 2000. Porcicultura intensiva y medio ambiente en México. Instituto de Investigaciones Económicas, Univ. Nacional Autónoma de México. Available from: FAO (http://www.fao.org).

Rama Dao MV, Krishnan CK, 1975. Colorimetric estimation of tryptophan content in pulses. J Food Sci Tech 11:213-6.

Robach MC, Sofos JN. 1982. Use of sorbates in meat products, fresh poultry and poultry products: A review. J Food Protection 45:374-8.

Rodas A, Leal M, Arias de M B, Huerta N, Márquez E. 1990. Adición de plasma y paquete globular en la formulación de jaiones cocidos. Rev Cient FCV-LUZ. VIII (1):35-9.

Seymour TA, Peters MY, Morrissey MT, Ao R. 1997. Surimi gel enhancement by bovine plasma proteins. J Agric Food Chem 45:2919-23.

Tacket CO, Losonsky G, Link H, Hoang Y, Guerry P, Hilpert H Levine MM. 1988. Protection by milk immunoglobulins concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *E. coli*. N Engl J Med 318:1240-3

Tacket CO, Binion SB, Bostwewick E, Losonsky G, Roy M J, Edelman R, 1992. Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge. Am J Trop Med Hyg 47:276-83.

Terrel RN, Weinblatt P J, Smith GC, Carpenter Z L, Dill CW, Morgan RG. 1979. Plasma protein isolate effects on physical characteristics of alt-meat and extended frankfurters. J Food Sci 44:1041-8.

To EC, Robach MC. 1980. Potassium sorbate dip as a method of extending shelf life and inhibiting the growth os Salmonella and Staphylococcus aureus on fresh, whole broilers. Poultry Sci 59:726-30.

Trueba-Rios S.1998. Situación actual y proyecciones de la porcicultura. Desarrollo Porcícola 48:5-11.

Tybor P, Dill C, Landmann W. 1975. Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. J Food Sci 40:155-9.

Ustunll Z, Syplen C. 1997. Heat stability of bovine milk immunoglobulins and their ability to bind lactococci as determined by an elisa. J Food Sci 62:1218-22.

Vázquez-Moreno L, Porath J, Schlunt S F Marcalonis JJ. 1992 Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*) serum by gel-immobilized metal chromatography. Com Biochem Physiol 103B(3):563-8.

Vojdani F. 1996. Solubility, In: Hall CM, editor. Methods of testing protein functionality. London: Blackie Academic and Professional. p 11-60.

Weismer-Pederson J. 1979.Utilization of animal blood in meat products. Food Technol 33(8):76-80.

MS 20020536 Submitted 9/14/02, Revised 12/5/02, Accepted 12/9/02, Received 12/10/02

We express our appreciation to Dr. Angela Sotelo from the National Univ. of Mexico for technical support in the analysis of amino acid composition. The National Council of Science and Technology (CONACYT) supported this research financially, under project 31450-B.

Authors Ramos-Clamont and Vázquez-Moreno are with the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C, Coordinación de Ciencia de los Alimentos Apdo. Postal 1735, Hermosillo, México, 83000. Authors Fernández-Michel, Carrillo-Vargas, and Martínez-Calderón are with the Univ. Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, Prolongación Colonfort 721 Sur. Torreón, Coahuila, México, 27000. Direct inquiries to author Vázquez-Moreno (E-mail lvazquez@cascabel.ciad.mx)

JFS is available in searchable form at www.ift.org

CAPITULO IV

PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS PORCINAS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD, CARACTERIZACION PARCIAL DE SUS ESTRUCTURAS OLIGOSACÁRIDAS Y DE LA INTERACCIÓN *IN VITRO* DE PATÓGENOS ENTERICOS PORCINOS, A ÉSTAS

IV.1 INTRODUCCION

IV.1.1 Diarreas en cerdos

La mayoría de las enfermedades que pueden aparecer durante la cría de lechones son de carácter digestivo y atacan preferentemente a los más débiles provocando en algunos casos, el contagio del resto de la camada. Los procesos diarreicos ocasionan pérdidas de fluidos corporales dando lugar a la deshidratación (Carvajal, 2002). No prevenir estas diarreas, o no tratarlas cuando aparecen, conduce en la mayoría de los casos a la muerte de los animales. Si ésta no se produce, los lechones quedan débiles, enfermizos y con dificultad para salir adelante de forma rentable (Mota, 1998). Muchas de las enfermedades pueden ser prevenidas o se pueden reducir sus efectos, con una adecuada ingestión de calostro o de inmunoglobulinas durante los primeros días de vida del lechón (Carvajal, 2002; Mantecón, 2003).

Los problemas gastrointestinales en las granjas porcícolas son muy comunes, presentando una prevalencia del 30 al 50% (Carvajal, 2000). En lechones neonatos las diarreas infecciosas más frecuentes son causadas por los rotavirus y por *Escherichia coli* en el 63% de los casos (USDA, 1992). Mientras que en los cerdos recién destetados los principales agentes etiológicos son *E. coli* y *Salmonella choleraesuis*. Adicionalmente, otros agentes virales (fiebre porcina clásica, enfermedad de Auzesky, PRRS, síndrome del ojo azul) o bacterianos pueden generar cuadros clínicos entéricos debido a que afectan la capacidad de respuesta inmune de los cerdos, favoreciendo la proliferación de patógenos digestivos (Mota, 1998; Carvajal, 2000).

IV.1.1.1 Colibacilosis

Existen cepas de *E. coli* capaces de causar diarrea. Estas cepas se clasifican como enterotoxigénicas (ETEC), enteropatogénicas (EPEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC) y enterohemorrágicas productoras de verotoxinas (VETEC) (Walker, 2001). *E. coli* se encuentra ampliamente distribuida en las granjas porcinas presentando cepas particulares que causan estragos en las tres fases del desarrollo de los cerdos: lechones neonatos de 1 a 15 días, lechones en pre-destete y cerdos destetados a partir de las 3 semanas (Carvajal, 2000). La mortalidad por colibacilosis es del 70% en lechones de 1 semana o menos de vida, del 10 al 20% en lechones de más de 2 semanas y menos del 10% en cerdos que han superado la etapa de destete (USDA, 1991).

Las principales cepas que afectan a los lechones son las cepas ETEC productoras de toxina lábil al calor (LT) y de toxinas estables al calor (Sta y STb). Estas cepas producen hipersecreciones acuosas con moco, que provocan la deshidratación del animal (Winkelman, 1995; Wray y Woodward, 1997; Hall, 1989). También producen adhesinas fimbriales, las cuales median la adhesión de la bacteria a la superficie intestinal, como paso fundamental de la invasión bacteriana. Estas fimbrias incluyen a las K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41 (F107) y F18 (2134P) (Hall, 1989; Wray y Woodward, 1997). La *E. coli* que expresa la fimbria K88 es la más frecuente en las colibacilosis de los cerdos neonatos y recién destetados (Westerman *et al.*, 1988; Alexander, 1994; Hampson, 1994).

IV.1.1.2 Salmonelosis

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos anaeróbicos facultativos, Gram negativos, móviles, no esporulados y con flagelos perítricos (Schwartz, 1.998). Son capaces de sobrevivir en gran variedad de condiciones ambientales por largos períodos de tiempo. Se han identificado 2, 213 serotipos en función de sus características antigénicas y aunque se han aislado varios de ellos en carne de puerco, la enfermedad en los cerdos es producida por *Salmonella choleraesuis* y por *Salmonella typhimurium*.

La forma de salmonelosis que causa mayor impacto en las explotaciones porcinas de América es la septicémica, la cual se presenta en lechones entre el destete y los cinco meses de edad (Ferris y Thomas, 1995; Lazo *et al.*, 1999; Cano *et al.*, 2001). Esta es causada por *S. choleraesuis* y se caracteriza por inapetencia, letargia, fiebre, disnea, diarrea

amarillenta 4 días posteriores a la infección. Los brotes con alta mortalidad son asociados a condiciones de estrés y los lechones que mueren presentan hemorragias generalizadas y cianosis en las extremidades, las orejas, la nariz y el abdomen (Davies y Funk, 1999).

El cerdo se infecta con *Salmonella* vía la ingestión de alimentos contaminados aunque también es posible la transmisión por aerosoles (Davies y Funk, 1999). Tras la ingestión, *Salmonella* se adhiere por medio de fimbrias al epitelio intestinal en el íleon y penetra por endocitosis a través de las microvellosidades o por el espacio inter-enterocito. La multiplicación bacteriana se produce en el tejido linfoide con virulencia variable en función de la cepa (Coma, 1998). Los factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos del cerdo por *Salmonella sp* juegan un papel esencial en su patogenicidad.

IV.1.2 Factores bacterianos que promueven la colonización de las células eucariotas

La patogenicidad bacteriana se determina en base a los mecanismos estructurales y bioquímicos que permiten al microorganismo causar daño a las células eucariotas y a los tejidos que la conforman. Sus principales propiedades son la capacidad de invadir tejidos (invasividad) y la habilidad para producir toxinas (toxicigenicidad). (Heithoff; 1997; Quinn; 1997; Smith, 1998). La invasividad comprende los mecanismos de colonización, la habilidad para burlar o vencer a los mecanismos de defensa del huésped y la producción de sustancias celulares que facilitan la invasión. La toxigénesis requiere de la participación de sustancias solubles o asociadas a la bacteria, que provocan efectos citotóxicos en células remotas al punto de invasión (Quinn; 1997).

Para que la infección se inicie en el lechón, es esencial que se establezca una interacción estable que permita a la bacteria adherirse al epitelio intestinal del cerdo, para después colonizarlo. Los mecanismos iniciales de adhesión son reversibles, involucran a los exopolisacáridos del glicocalix que forman películas adherentes y a fuerzas de atracción no específicas como las interacciones hidrofóbicas, las electroestáticas y las vibraciones atómicas y moleculares que resultan de dipolos fluctuantes de frecuencias similares (Todar, 1998). Posteriormente se establece la adhesión irreversible mediante el reconocimiento biológico de las bacterias por receptores moleculares específicos localizados en la superficie de las células eucariotas (Heithoff *et al.*, 1997; Todar, 1998).

IV.1.2.1 Adhesinas fimbriales

En el transcurso de la evolución, muchos microorganismos patógenos han aprendido a explotar la presencia de glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos de la superficie celular, utilizándolos como receptores. El reconocimiento de lectinas microbianas (adhesinas), por los carbohidratos presentes en los glicoconjugados permite a los microbios adherirse e infectar la célula (Finlay *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1994; Rostan y Esko, 1997). Las adhesinas de los patógenos Gram negativos se encuentran principalmente en estructuras denominadas pili o fimbrias. Las fimbrias son apéndices largos y flexibles que se extienden de la superficie de la bacteria. Están constituidas de una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica (Dalton y March, 1998). La punta de las fimbrias se comporta como lectina específica para oligosacáridos superficiales de la célula hospedera (Hacker *et al.*, 1997; Dalton y March, 1998).

La secreción, el ensamble y el anclaje de las fimbrias son procesos complejos que requieren de numerosas proteínas auxiliares. La secreción de pilinas se lleva a cabo por transporte activo, desde el citoplasma hasta la superficie celular. El proceso es auxiliado por al menos 20 proteínas, entre las que destacan las chaperonas que estabilizan a las pilinas, evitando que se plieguen o se unan a otras proteínas (Hacker *et al.*, 1998). Las chaperonas transportan a las pilinas hasta un complejo proteico exterior, formado por proteína C, que regula el inicio del ensamblaje de la fimbria. El ensamble es secuencial, inicia con la porción adherente que es desplazada al exterior y el resto de las subunidades de pilina se van incorporando a su otro extremo, empujando la punta adherente hasta que la fibrilla adquiere la longitud adecuada. Por ultimo, la proteína periplásmica H señala el final del proceso y presumiblemente origina el anclaje de la fimbria a la pared celular (Hultrgren *et al.*, 1991; Heithoff, *et al.*, 1997).

La primera fimbria descrita como factor de adhesión fue la fimbria tipo I que se expresa en muchas cepas de *E. coli*, patogénicas o no. La adhesión de esta fimbria a la superficie intestinal de mamíferos se inhibe específicamente en presencia de D-manosa o de αD- metilmanosido, por ello es conocida como específica o sensible a manosa (Firon *et al.*, 1982; Eshdat y Sharon, 1984). Posteriormente Firon y colaboradores (1983), determinaron que la fimbria tipo I se une a receptores celulares que contengan la estructura

Man (1→3)Manβ(1→4)GlcNAc. Las cepas de *E. coli* enterotoxigénica que provocan diarreas en lechones expresan cinco tipos de fimbrias diferentes. Aquellas que expresan la fimbria K88 son las más frecuentes en diarreas de cerdos neonatos y recién destetados (Wilson y Francis, 1986; Moon y Bunn, 1993).

Existen tres variantes antigénicas de la *E. coli* K88 (K88ab, K88ac, K88 ad). Estas difieren en su especificidad y rutas de adhesión a las células epiteliales del intestino del lechón (Rapacz y Hasler-Rapacz, 1986). Además existe evidencia de que la K88 también se une a las mucinas intestinales (Conwey, 1991). Lo anterior sugiere la existencia de varios receptores para la K88 (Francis *et al.*, 1998).

Se han identificado varios posibles receptores (glicoproteínas y glicolípidos), utilizando glicoproteínas o lectinas de plantas para bloquear la hemaglutinación o la adhesión de K88 al borde cepillo. Se concluyó que los receptores son sialoglicoproteínas y que los residuos de fucosa, galactosa, GlucNac y GalNAc están involucrados en la interacción lectina-receptor. Las principales secuencias que median la unión lectina-receptor son Gal (β1-3) GalNAcFuc(α 1-2), Gal (β 1-3) GlcNAc, Gal (α1-3) Gal (Erickson *et al.*, 1994). Una lectina específica para Gal (β1-3) Gal inhibe la interacción de K88ab en las mucinas intestinales del cerdo (Metcalfe *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1993; Francis *et al.*, 1998). En lo que se refiere a *Salmonella* sp se ha reportado que posee fimbrias específicas para manosa (Firon *et al*, 1983).

IV.1.2.2 Consideraciones para realizar estudios de adhesión de bacterias

Las células epiteliales de los eucariotas superiores presentan una enorme diversidad en las estructuras oligosacáridas de sus glicoconjugados (Varki, 1993). En organismos de la misma especie los patrones de glicosilación del tracto gastrointestinal difieren dependiendo del tipo de células, de su estado de diferenciación/maduración y de la posición que ocupan en los ejes vellosidades/criptas. Las células menos diferenciadas presentan estructuras ricas en manosa, mientras que las maduras expresan oligosacáridos complejos (Paulson y Colley, 1989; Varki, 1993; Pusztai y Bardocz, 1996). La edad del animal también juega un papel importante. Se cree que la susceptibilidad de los lechones a *E. coli* K88 se debe a que la

adhesina puede reconocer a los receptores de las mucosas del lechón, mientras que no ocurre lo mismo con los receptores del cerdo maduro (Willemsen y De Graaf, 1992).

Los estudios de adherencia bacteriana a la mucosa del cerdo y otras especies presentan diversas limitaciones, entre ellas la de haberse realizado empleando modelos de células transformadas como las CaCo2, que presentan importantes cambios en sus patrones de glicosilación, con respecto a los de las células normales (Niv, 2000). Otros estudios no consideran los cambios en la glicosilación debidos a la edad, utilizando células o tejidos de animales maduros en vez de jóvenes o recién nacidos. Por ello, es necesario realizar estudios sistemáticos en la etapa de desarrollo de interés. Miller y Hoskins (1981) desarrollaron un sistema para aislar las mucinas a partir del moco de las heces. Con este sistema pueden monitorearse cerdos en diferentes etapas de maduración sin necesidad de sacrificarlos y estudiar la adhesión de las bacterias a dichas mucinas.

IV.1.3 Medidas preventivas para combatir las diarreas porcinas

El uso frecuente de antibióticos para controlar patógenos y promover el crecimiento del lechón, ha contribuido en gran medida a la resistencia antimicrobiana de importantes patógenos del cerdo. Adicionalmente, puede conducir a que cepas patógenas al hombre también la adquieran (Witte, 1998). Lo anterior constituye un problema para la industria porcícola y para la salud pública. En consecuencia la lista de antibióticos autorizados para acelerar el crecimiento del cerdo disminuye año con año, creando la necesidad de explorar diferentes alternativas para mantener la salud de los hatos ganaderos.

La búsqueda de formas eficaces para prevenir enfermedades infecciosas ha conducido al establecimiento de medidas de índole higiénico sanitario, al diseño de nuevas vacunas y al uso de productos inmunoprofilácticos. Las preparaciones de Ig's provenientes de animales hiperinmunizados o no, se prueban continuamente en el control de diarreas en los animales de granja (Jin *et al.*, 1998). Por otro lado, el descubrimiento de que la adherencia representa uno de los pasos determinantes en el proceso infectivo, ha conducido a investigar si las adhesinas de los agentes causales pueden significarse como componentes de vacunas. En consecuencia, tales organelos están siendo probados como inmunógenos

(Wizzeman, 1999). Adicionalmente se estudia la habilidad de algunas bacterias probióticas para inhibir la adhesión de bacterias patógenas al tracto gastrointestinal (Bloomberg *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1996; Lehto y Salminen; 1997; Jin *et al.*, 2000).

Se cree que una de las estrategias de los probióticos es la de competir con los patógenos por los oligosacáridos de los receptores de la mucosa intestinal (Reid *et al.*, 2001). En cambio, algunas glicoproteínas presentan oligosacáridos que son reconocidos por las lectinas microbianas, evitando por competencia la unión de éstas al intestino. Tal es el caso de la lactoferrina bovina cuyos glicanos pueden actuar como receptores para las adhesinas de *E. coli* y *Shigella flexneri* (Izar *et al.*, 1982; Longhi *et al.*, 1993; Teraguchi *et al.*, 1996). Los oligosacáridos de la inmunoglobulina A humana también presentan receptores para adhesinas específicas a manosa (Wold *et al.*, 1990).

IV.1.4. Inmunoglobulinas porcinas

IV. 1.4.1 Características estructurales

Las inmunoglobulinas (Ig´s) son glicoproteínas sintetizadas por el sistema inmune humoral de los vertebrados, en respuesta específica a una sustancia extraña. Se encuentran en el suero y fluidos tisulares de todos los mamíferos en forma de secreción (anticuerpos) o unidas a la membrana de los linfocitos B (receptor BcR). Las Ig´s se forman con cuatro cadenas polipeptídicas, 2 pesadas o H, con masa molecular de 55 a 77 kDa y dos ligeras o L con masa molecular de 23 a 26 kDa. Las dos cadenas pesadas se unen por puentes disulfuro, al igual que la cadena pesada con la ligera.

Las cadenas H y las L mantienen idéntica estructura entre ellas. Cada cadena se divide conceptualmente en dominios de 110 aminoácidos (Butler y Brown, 1994). Las cadenas L constan de dos dominios, uno variable (VL) hacia el término amino y otro constante (CL), hacia el término carboxilo (Sánchez-Vizcaíno, 2000). Aproximadamente una cuarta parte de la cadena pesada, hacia el extremo amino, constituye su región variable (VH). Dependiendo del tipo de inmunoglobulina, la cadena pesada constará de tres (en IgG e IgA) o cuatro (en IgM e IgE) regiones constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4) (Sánchez *et al.*, 1997). En las cadenas H existe una región adicional, que no forma parte de los dominios, denominada región bisagra. Se localiza entre los dominios CH1 y CH2,

proporcionando flexibilidad a la molécula. Los dominios variables (VL y VH) se unen específicamente al antígeno, mientras que los constantes permiten la diferenciación de los isotipos. En la región constante de las cadenas H, en particular en la zona CH2 y en la región bisagra, se localizan cadenas de oligosacáridos unidas a las Ig´s (Sánchez Vizcaíno, 2000).

En el cerdo se han descrito cuatro isotipos de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM e IgE (Butler y Brown, 1994). La existencia de la IgD porcina no ha podido demostrarse de manera concluyente (Butler *et al.*, 1996).

Las cadenas ligeras de las Ig´s porcinas (κ y λ) muestran homología con las secuencias de aminoácidos (aa) de las Ig´s humanas (Butler *et al.*, 1996). Los cerdos presentan proporciones iguales de cadenas κ y λ igual que los humanos (Butler y Brown, 1994). La IgG porcina presenta secuencias de aa similares a la humana, aunque se caracteriza por ser una molécula mas compacta debido a una deleción de 4 aa en la región bisagra (Butler *et al.*, 1996). Se han determinado 5 subclases de IgG porcina (IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3 e IgG_4), aunque estudios de hibridación de DNA indican la existencia de por lo menos 8 genes que codifican para la región constante Cγ (Mezger *et al.*, 1971; Butler *et al.*, 1996).

La IgA porcina se encuentra en forma dimérica (Courtis y Bourne, 1971). Existe un solo gene que codifica para la Cα de la IgA pero ocurre en 2 formas alélicas IgA^a e IgA^b que se diferencian en la región bisagra, la primera se compone de 10 aa mientras que la segunda de 6 aa. Las dos formas se encuentran en la misma proporción sin que se conozca si estas diferencias estructurales afectan la función de la IgA (Butler *et al.*, 1996). La IgM se presenta en su forma pentamérica unida por cadenas J. No se han descrito diferentes subclases de IgM en el cerdo, aunque sí se ha podido observar una variante alotípica en algunos animales (Sánchez-Vizcaíno, 2000).

La IgG es la inmunoglobulina predominante en el suero y calostro porcinos constituyendo el 88 y 80% respectivamente, mientras que en la leche constituye el 20% de las Ig´s presentes. La IgA se encuentra en un 3% en suero, 14% en el calostro y 82% en la leche madura, mientras que la IgM, constituye el 14, el 6 y el 18 % respectivamente (Courtis y Bourne, 1971). Bourne y Curtis (1973), reportan que toda la IgG, la mayoría de

la IgM y cerca del 40% de la IgA del calostro son de origen sérico. La IgG del calostro parece estar compuesta principalmente por la subclase IgG_2.

La constitución de la placenta porcina impide el paso de Ig´s de la madre al feto, por ello, los cerdos nacen sin anticuerpos circulantes y requieren de la inmunización pasiva obtenida mediante la ingesta de calostro. La absorción intestinal de Ig´s durante el periodo postnatal es inmediata (Bourne y Curtis, 1973). El cese de la absorción no selectiva, depende del régimen alimenticio y de la edad del cerdo, ocurre entre las 24 y 36 h de edad y se extiende hasta 86 h en condiciones de ayuno (Lecce y Morgan, 1962; Butler *et al.*, 1981). En cerdos de 1 semana de vida, se observa que la IgA y la IgM se acumulan en las criptas intestinales donde se cree, actúan como barrera de defensa contra la invasión de patógenos (Butler *et al.*, 1981; Lamm, 1997). La IgA utiliza varios mecanismos para atacar microorganismos: aglutinándolos, interfiriendo con la acción de sus flagelos y bloqueando las interacciones entre las adhesinas microbianas y sus receptores epiteliales en las mucosas. Existe evidencia de que los oligosacáridos de las inmunoglobulinas pueden actuar como receptores de algunas adhesinas fimbriales, interfiriendo con la unión de éstas últimas, a las células epiteliales (Lamm, 1997).

IV.4.1.2 Importancia de los oligosacáridos de las inmunoglobulinas

Al remover a los oligosacáridos de las glicoproteínas queda de manifiesto que intervienen en la actividad biológica y la estabilidad de la molécula, también se ha comprobado que confieren protección al calor y a la proteólisis, modulan interacciones proteína-proteína y dirigen a la proteína hacia sitios particulares de la célula u organismo (Varki, 1993).

En las inmunoglobulinas la glicosilación es característica de la región constante y la región bisagra, aunque también se han encontrado anticuerpos glicosilados en la región variable (Carayannopoulos y Capra, 1993). La composición de los carbohidratos de las inmunoglobulinas varia considerablemente sugiriendo que un isotipo presenta varias isoformás, cada una con propiedades ligeramente diferentes (Jefferis *et al.*, 1999; Jefferis *et al.*, 1990). La presencia de carbohidratos influye en la conformación, solubilidad y secreción de las Ig´s y en la regulación de su vida media (Deisenhofer *et al.*, 1976;

Hickman y Kornfeld; 1978; Lund *et al.*, 1990; Matsuda *et al.*, 1990). En el caso de la IgG, se ha comprobado que al deglicosilarla, pierde o disminuye su capacidad para unirse a receptores celulares, para inducir las reacciones de citotoxicidad mediadas por anticuerpos y para activar el complemento (Hickman y Kornfeld, 1978; Koide *et al.*, 1977; Sánchez-Vizcaíno, 2000; Varki, 1993).

Existe evidencia de interacciones no inmunológicas entre los carbohidratos de las Ig´s humanas y algunas adhesinas bacterianas. Lamm (1997), indica que estas interacciones pudieran estar involucradas en un mecanismo de defensa alternativo de los anticuerpos. Se ha observado que la capacidad de la IgA de calostro de inhibir la adhesión de *Helicobacter pylori* al epitelio gástrico, se reduce significativamente al tratar a la IgA con α-L fucosidasa (Falk *et al.*, 1993). Las cadenas Manα 1-6 (Man α 1-3) Manα 1-6 (Manα 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc, de la IgA secretoria (IgAs) y la IgA_2 inhiben la adhesión mediada por la fimbria tipo I de *E. coli* (Wold *et al.*, 1990), las cadenas sialil α 2-3 galactosa de IgAs e IgA1 inhiben la adhesión de la fimbria S de la *E. coli* causante de meningitis y sepsis en neonatos (Schroten *et al.*, 1998) y los receptores Gal (β 1-3) GlcNAc y sialilados de IgAs e IgA1 inhiben la adhesión de las adhesinas de *Actinomyces naeslundii* y *Streptococcus gordoni* respectivamente (Ruhl *et al.*, 1996). No se han realizado estudios de este tipo con Ig´s porcinas, pero es muy probable que sus oligosacáridos también puedan actuar como receptores de las lectinas microbianas, añadiendo una característica más a la perspectiva profiláctica de los concentrados de inmunoglobulinas.

IV.2 MATERIALES Y METODOS

IV.2.1. Purificación de IgA, IgG e IgM por cromatografía de afinidad

Se acoplaron por separado 2mL de antisueros anti IgA, anti IgG y anti IgM de cerdo a 1 gramo de Minileak ™ medio (Kem-En-Tec., Copenhagen, Denmark) o a agarosa activada con divinil sulfona según el procedimiento indicado por el proveedor. Los geles fueron lavados con agua bidestilada, suspendidos en carbonato de sodio 0.3 M e incubados por 24 h con 2 mL del antisuero (40 mg de proteína) diluidos en polietilenglicol al 7 %, pH 8.6. Posteriormente se empacó el gel en columnas cromatográficas abiertas de 0.5 x 10 cm.

a flujo de 0.5 mL/min y se bloquearon los grupos activos restantes recirculando etanolamina 0.2 M pH 9.0, por 4 h. Los geles se lavaron con 3 volúmenes de PBS, pH 7.2, 3 volúmenes de glicina-HCl pH 3.0 y nuevamente con 3 volúmenes de PBS, pH 7.2.

A cada columna se le aplicaron de 2 a 15 mg de proteína de la fracción de elución de Sefarosa HA dializada contra PBS, pH 7.2. Las columnas se lavaron con PBS, pH 7.2 a flujo de 0.25 mL/min y se eluyeron con glicina-HCl, pH 3.2 con flujo de 0.5 mL/min. La fracción de elución se neutralizó con Trizma base 0.2 M, pH 8.0. Las corridas cromatográficas se monitorearon espectrofotométricamente a 280 nm. La concentración de proteína se determinó a 595 nm por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como estándar y por espectrofotometría a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción de 1.22 (A_{280} para 1 mg/ml), previamente determinado para el aislado de inmunoglobulinas obtenido por HIC. Dicho coeficiente es similar al reportado para las Ig´s humanas, bovinas y de conejo (Pharmacia, 2000; Deuisher, 1990)

La pureza de las inmunoglobulinas se determinó por SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas (Laemmli, 1970). La confirmación de la presencia de los tres isotipos, por inmunodetección en membranas de nitrocelulosa utilizando en cada caso antisueros anti IgA, anti IgG o antiIgM de cerdo como anticuerpo primario y anti IgG de cabra unido a peroxidasa o anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina, como anticuerpo secundario.

IV.2.2 Caracterización parcial de los oligosacáridos de las inmunoglobulinas

IV.2.2.1 Ensayos de manchas y lectinoensayos

Para el ensayo de manchas se inmovilizaron IgA, IgG o IgM, de suero y calostro porcinos y de suero humano, en tiras de nitrocelulosa. Se aplicó 1µL por mancha, en doble dilución seriada, desde 1µg o 250 ng, hasta a 0.12 ng. Las interacciones no específicas se bloquearon con TTBS (NaCl 0.15 M, Tris HCl 20 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM y 0.05% de Tween 20), conteniendo 4% de leche descremada. Posteriormente se incubaron con diferentes lectinas biotiniladas (Ruhl *et al.*, 1996; Sumar *et al.*, 1990). La afinidad lectina-Ig se observó utilizando el sistema avidina-fosfatasa alcalina y NBT/BCIP como sustrato.

En el caso de los lectinoensayos (ELLAS, por sus siglas en inglés), las placas se bloquearon según el procedimiento descrito en el párrafo anterior. Se aplicó cada

inmunoglobulina de manera individual en placas de ELISA según el procedimiento de Rhodes *et al.* (1993). Las inmunoglobulinas en TBS, pH 7.5, se aplicaron a las placas de ELISA en doble dilución seriada, incubándolas por 16 h a 4 °C, se lavaron tres veces con la misma solución amortiguadora y se bloquearon por 3 h a con TBS conteniendo 0.5% tween y 1% de leche descremada. Posteriormente las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, con la batería de lectinas biotiniladas (10 μg/ml) (Candia-Plata, 2000). La interacción se reveló con avidina-peroxidasa (1/1000 en TBS, pH 7.5), con ortofenilendiamina y H_2O_2 como sustrato. Se utilizó un lector de ELISA (Microplate Reader450, BioRad, CA, USA) para medir la absorbancia a 450 nm. Los análisis se realizaron por triplicado. El punto de corte se determinó con la media aritmética del control negativo más dos veces su desviación estándar. Las diferencias entre las afinidades de las Ig´s porcinas, séricas y calostrales se obtuvieron por medio de un análisis de Kruskal-Wallis.

La batería utilizada estuvo constituida por las siguientes lectinas: *Canavalia ensiformis (Con A), Pisum sativum (PSA), Mackia amurensis (MAA), Eritrina cristagalli (ECA), Triticum vulgaris (WGA), Artocarpus integrifolia (Jacalina), Ulex europaeus (UEA-I), Ricinus communis (RCA- I), Sambucus nigra (SNA), Phaseolus vulgaris (PHA-E) y Vicia villosa (VVA).* La jacalina se incluyó en este estudio debido a que reconoce a los O-oligosacáridos de la región bisagra de la IgA1 humana (Skea *et al.*, 1988).

IV.2.2.2 Determinación de la presencia de O-glicanos en las Inmunoglobulinas porcinas

Para determinar la presencia de O-oligosacáridos en la IgA sérica porcina, cuya interacción resultó positiva en el ensayo de manchas con Jacalina y *Vicia villosa* (lectinas que reconocen O-oligosacáridos), la IgA inmovilizada en membranas de Immobilon P se sometió a una β eliminación según el método de Duk *et al.* (1997). Se utilizó IgA sérica humana como control. Después de incubar las tiras en NaOH por 16 h a 40 °C, se procedió al ensayo de manchas con las mismas lectinas como en la sección anterior. La presencia de O-oligosacáridos se confirma al observar una disminución en la intensidad de las manchas después del tratamiento (Duk *et al.*, 1997).

IV 2.3 Interacción *in vitro* de las Inmunoglobulinas porcinas con *E. coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*

IV.3.1 Cultivo y biotinilación de bacterias

Las cepas de *E. coli* K 88 y *Salmonella choleraesuis* fueron donadas por el Dr. Carlos Eslava de la Facultad de Medicina de la UNAM a través de la Dra. Evelia Acedo Félix. Las bacterias se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron durante 36 h a 37 °C, en una incubadora con agitación Lab-line Instruments (Melrose, Park, Ill, USA) a 100 rpm. Posteriormente se centrifugaron a 13, 000 x g y se lavaron 3 veces con solución balanceada de Hanks y se ajustó la turbidez con un nefelómetro de Mc Farland y espectrofotométricamente a una concentración aproximada de bacterias de 2 x 10^9 organismos/mL (Ruhl *et al.*, 1996)

Las bacterias se biotinilaron según Ruhl *et al.* (1996) con ligeras modificaciones. Se mezclaron 0.9 mL de bacterias en solución de Hanks, con 0.1 mL de dimetilsulfóxido conteniendo 0.2 mg de NHS-LC biotina (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA). Se incubaron por 4 h en la oscuridad a 25 ° C con agitación lenta y se lavaron 5 veces con solución de Hanks.

IV 2.3.2 Ensayo de manchas

Para el ensayo de manchas se inmovilizaron las Ig´s de suero y calostro en tiras de nitrocelulosa. Se utilizó como control la siguiente batería de glicoproteínas: ovoalbúmina, asialofetuina bovina, fetuina bovina, mucina gástrica porcina y mucina maxilar bovina. Como control negativo se utilizó albúmina de suero bovino y como control positivo BSA-gal (1-3) gal (Glicorex, Sweden). Este control consiste de albúmina unida covalentemente al epítope gal (1-3) gal que reconoce la *E. coli* K 88 (Erickson *et al.*, 1994).

Todas las proteínas se aplicaron en doble dilución desde 1 μg hasta 1 ng. El tratamiento de las membranas se llevó a cabo según Ruhl *et al.* (1996) con modificaciones en el procedimiento de bloqueo. Para el bloqueo de las interacciones no específicas, se probaron diferentes tiempos y concentraciones de leche descremada, BSA o gelatina en TTBS, pH 7.8. Las mejores condiciones se dieron utilizando 4% de leche descremada y 6 h de bloqueo. Sin embargo, hubo que añadir el procedimiento de Wood y Warnke (1981),

agregando biotina y avidina libres, para garantizar la total inhibición de las interacciones inespecíficas. Posteriormente se pusieron en contacto con 5 x 10^8 células/mL de bacterias biotiniladas, se incubaron por 12 h a 4 °C, se lavaron con TTBS, pH 7.8, se incubaron por media hora con avidina-fosfatasa alcalina, se lavaron nuevamente y se desarrollaron las manchas utilizando el sustrato líquido BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO. USA).

IV 2.3.3. Interacción con inmunoglobulinas disociadas

La adhesión *in vitro* de *E. coli* y *S. choleraesuis* se examinó en muestras de cada isotipo de Ig's, separadas por electroforesis SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semi-dry bloter modelo 433-2900 (Bluchler Ins. Labconco, USA), utilizando una corriente de 2.5 mA/cm^2, durante 40 min. Las membranas fueron puestas en contacto con las bacterias biotiniladas según el procedimiento descrito en el paso anterior. Al mismo tiempo se llevó a cabo la inmunodetección de cada inmunoglobulina como se describió anteriormente

IV 2.3.4 Actividad hemaglutinante de las adhesinas de E. coli K88 y S. choleraesuis empleando eritrocitos de lechón y cerdo adulto

Se ajustó la concentración de bacterias a aproximadamente 10^{10} organismos/mL (Meng *et al.*, 1998) y se pusieron en contacto con eritrocitos de cerdos adultos y de lechones de 10 días. Se ensayaron eritrocitos tripsinizados y sin tripsinizar. El ensayo de hemaglutinación se llevó a cabo según Jaffe (1980), por la técnica de doble dilución seriada en presencia y en ausencia de Ca^{++} y Mg^{++}.

La inhibición de la hemaglutinación se ensayó con mucina bovina, asialofetuina y fetuina bovinas, ovoalbúmina, inmunoglobulinas porcinas, mucus intestinal obtenido de lechones de 10 días de vida.

Las mucinas intestinales se aislaron de las diferentes porciones del intestino delgado y de las heces de lechones, por doble precipitación etanólica (Miller y Hoskins, 1981). Posteriormente las mucinas se liofilizaron y al momento de su uso se resuspendieron en solución balanceada de HEPES-Hanks conteniendo un coctel de inhibidores de proteasas (Hoffman-La Roche, Suiza).

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1.Purificación de IgA, IgG e IgM por cromatografía de afinidad

La IgA, la IgG y la IgM porcinas, fueron purificadas por cromatografía de afinidad, a partir del aislado de Ig´s obtenido de Sefarosa HA. Se utilizaron columnas abiertas empacadas con matrices de agarosa activada con divinil sulfona (DVS) o la matriz comercial Mini Leak (Kem-En-Tec., Copenhagen, Denmark). A estas matrices se les acopló para cada caso anti IgA, Anti IgG o Anti IgM de cerdo (Bethyl Labs, USA). Para la purificación se aplicaron a las columnas entre 2 y 15 mg del aislado de Ig´s, previamente dializado contra agua bidestilada, liofilizadas y resuspendidas en PBS pH 7.2. Se siguió el esquema cromatográfico de Vázquez Moreno *et al.* (2000), con ligeras modificaciones. Las proteínas no adsorbidas se lavaron con PBS pH 7.2 hasta OD_{280} nm < a 0.01 y las adsorbidas se eluyeron con Glicina-HCL pH 3.5 (se utilizó este pH para prevenir la posible hidrólisis de los ácidos siálicos presentes en la molécula).

La figura 24 muestra un cromatograma típico de éstas purificaciones. Las capacidades obtenidas para estas matrices fueron 0.6, 0.4 y 0.2 mg/mL de matriz para Agarosa Anti IgG, Agarosa Anti IgA y Agarosa Anti IgM, respectivamente.

En la figura 25 se aprecia la electroforesis SDS PAGE en geles de poliacrilamida al 10% y el ensayo de inmunodetección para la IgG porcina. Las bandas en las que se cargó la proteína eluida de la columna Agarosa-Anti IgG (Fig. 25A, carriles 3 y 5) presentaron una mása molecular correspondiente a 52-54 kDa lo que concuerda con la mása reportada para las cadenas pesadas de la IgG porcina (Pastoret *et al.*, 1998; Crawley y Wilkie, 2003). También se observó la banda correspondiente a las cadenas ligeras (23-25 kDa). La interacción de la proteína eluida transferida a membranas de nitrocelulosa (Fig. 25B) y puesta en contacto con anti IgG porcina dirigida a la cadena pesada γ, fue positiva.

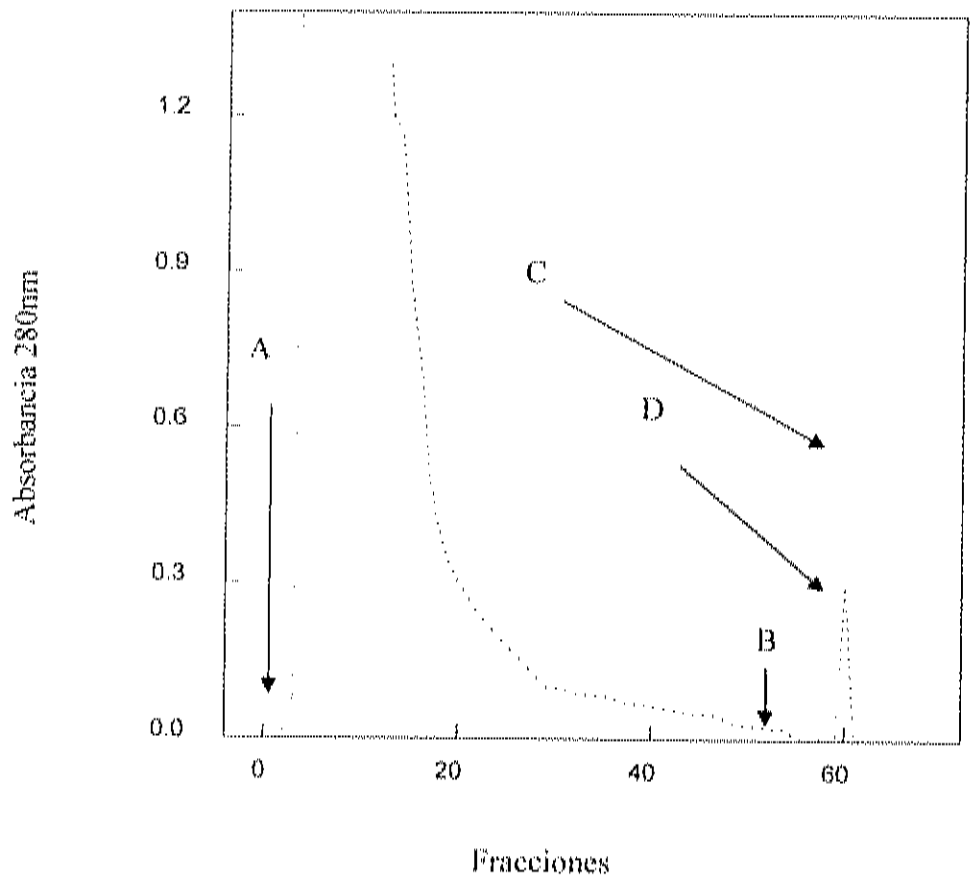

Figura 24. Cromatograma típico de la purificación de inmunoglobulinas porcinas en matrices de agarosa activada con DVS, acopladas para cada caso con Anti- IgA, Anti IgG o Anti IgM de cerdo. A. Las Ig´s aisladas de Sefarosa HA se aplicaron a las columnas y las proteínas no adsorbidas se lavaron con PBS pH 7.2. B. La fracción adsorbida fue eluida con Gli-HCl, pH 3.5. C. Pico de elución típico para IgG, D. Pico de elución típico para IgA o IgM.

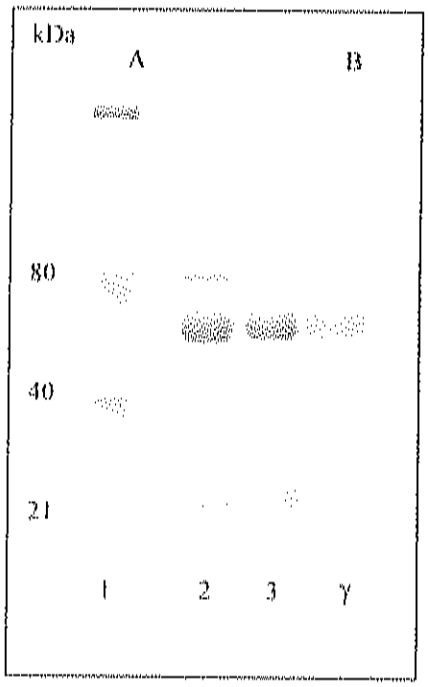

Figura 25. Electroforesis SDS PAGE y ensayo de inmunodetección para IgG porcina **A**. Gel de poliacrilamida al 10%, carril 1 estándares de masa molecular, carriles 2 y 4 aislado de inmunoglobulinas de Sefarosa HA, carriles 3 y 5 elución de Agarosa Anti IgG. **B** Confirmación de la presencia de IgG por inmunodetección con Anti IgG de cerdo específica para el fragmento Fc.

La figura 26 muestra la electroforesis SDS PAGE en gel de poliacrilamida al 10% y el ensayo de inmunodetección para IgA porcina. Las banda correspondiente a la fracción de elución de la columna Agarosa-Anti IgA (Fig.26A carril 3) coincide con una mása molecular de 56-58 kDa correspondiente a las cadenas pesadas de la IgA porcina (Pastoret *et al.*, 1998). También se observó la banda típica de las cadenas ligeras (23- 25 kDa). La interacción de la proteína eluida transferida a membranas de nitrocelulosa (Fig. 26B) y puesta en contacto con anti IgA porcina dirigida a la cadena pesada α, fue positiva.

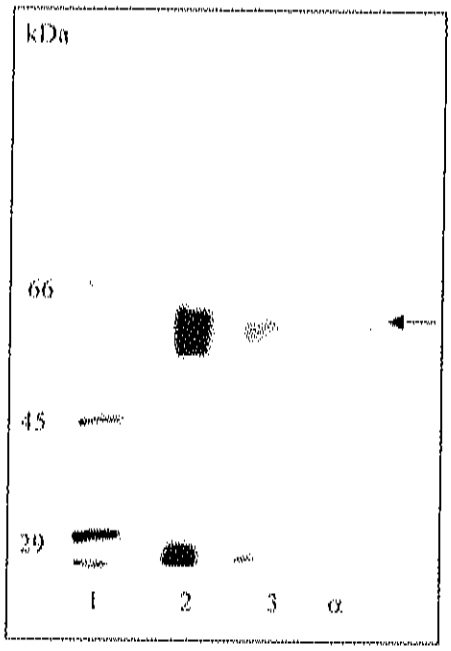

Figura 26. Electroforesis SDS PAGE y ensayo de inmunodetección para IgA porcina **A.** Gel de poliacrilamida al 10%, carril 1 estándares de masa molecular, carril 2 aislado de inmunoglobulinas de Sefarosa HA, carril 3 elución de Agarosa Anti IgA. **B** Confirmación de la presencia de IgA por inmunodetección con Anti IgA de cerdo específica para la cadenaα.

Una segunda confirmación de la presencia de IgA consistió en inmovilizar proteína de las fracciones de elución de agarosa Anti IgA y Agarosa Anti IgG y ponerlas en contacto con jacalina biotinilada. Como se observa en la figura 27, la reacción de la elución de Agarosa anti IgA fue positiva. Al comparar a la IgA porcina con la IgA humana se observó que esta última presentó una mayor respuesta. Lo anterior puede deberse a que la IgA humana presenta 5 sitios de O-glicosilación en la región bisagra mientras que la IgA porcina, solo 1(Brown y Butler, 1994).

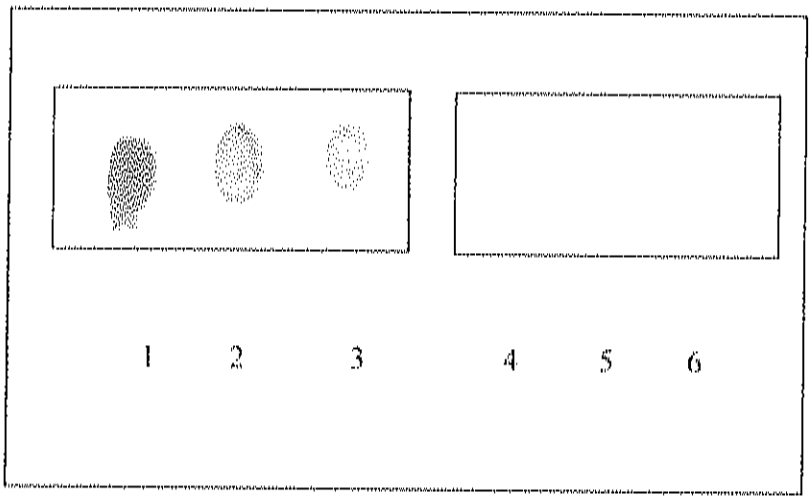

Figura 27. Ensayo de manchas con jacalina para las eluciones conteniendo IgA e IgG purificadas por cromatografía de afinidad. 1) IgA humana 2) IgA porcina sérica, 3) IgA porcina calostral, 4) IgG humana, 5) IgG porcina sérica, 6) IgG porcina calostral.

La electroforesis SDS PAGE en gel de poliacrilamida al 10% y el ensayo de inmunodetección para IgM porcina se muestran en la figura 28. Las banda correspondiente a la fracción de elución de la columna Agarosa-Anti IgM (Fig. 28A carril 3) coincide con una mása molecular de 72 kDa correspondiente a las cadenas pesadas de la IgM porcina (Pastoret *et al.*, 1998). La interacción de la proteína eluída transferida a membranas de nitrocelulosa (Fig. 28B) y puesta en contacto con anti IgM porcina dirigida a la cadena pesada μ, fue positiva.

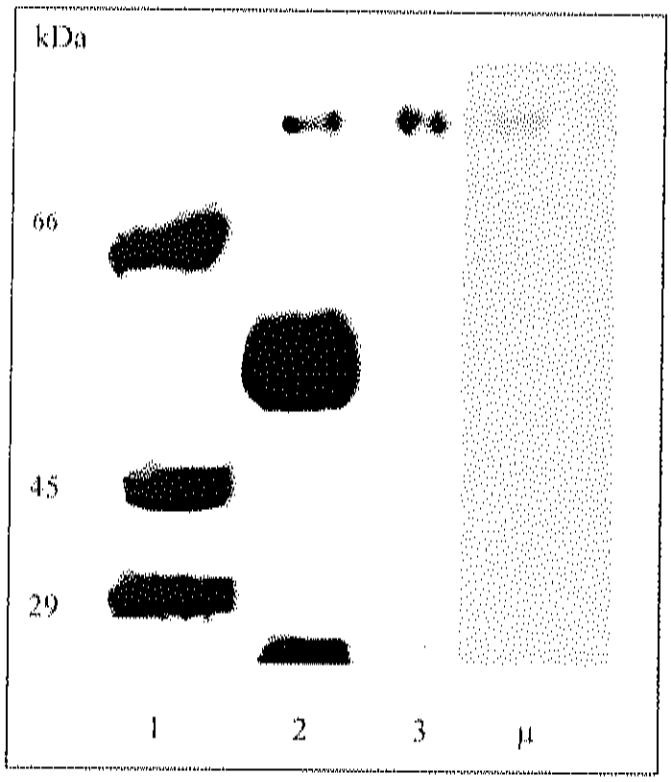

Figura 28. Electroforesis SDS PAGE y ensayo de inmunodetección para IgM porcina **A.** Gel de poliacrilamida al 10%, carril 1 estándares de masa molecular, carril 2 aislado de inmunoglobulinas de Sefarosa HA, carril 3 elución de Agarosa Anti IgM. **B**, Confirmación de la presencia de IgM por inmunodetección con Anti IgM de cerdo específica para la cadenaμ.

IV.3.2.Ensayos de Manchas

IV.3.2.1. Ensayo de manchas para IgA

Para iniciar la caracterización de los carbohidratos de IgA porcina se inmovilizaron en tiras de nitrocelulosa 2 μg de IgA humana (IgA), IgA sérica porcina (IgAS) e IgA de calostro porcino (IgAC) y se dejaron interaccionar con las diferentes lectinas biotiniladas. Posteriormente se realizaron dobles diluciones seriadas de las Ig´s (500ng a 1 ng), se inmovilizaron en tiras de nitrocelulosa y se pusieron en contacto con las lectinas que dieron positiva la interacción en el ensayo anterior.

La figura 29 muestra los resultados obtenidos al inmovilizar 2μg de las IgAs. Por inspección visual se encontró que la interacción con Jacalina fue mayor en la IgAH, después en la IgAS y más leve en la IgAC. Lo anterior puede deberse a que en la región bisagra de la IgA_1H se encuentran 9 sitios potenciales para O-glicosilación, de los cuales 5 están ocupados (Allen, 1999). En cambio, la región bisagra de la IgA_nS posee únicamente un sitio potencial para O-glicosilación (Brown y Butler, 1994; Brown *et al.*, 1995). Respecto a las diferencias entre la IgAS y la INAC (Fig. 30), se sabe que la IgA porcina puede encontrarse en dos formas la IgA_a y la IgA_b, ésta última contiene únicamente 2 aminoácidos en su región bisagra y ninguno de estos es un sitio potencial de glicosilación (Brown *et al.*, 1995). En el calostro humano la IgA predominante es la IgA_2 (Royle et al., 2003). No existen trabajos en calostro de cerdo sin embargo, una posible explicación sería que en el calostro porcino hay mayor cantidad de IgA_b, que de IgA_a. Esto indicaría la presencia de una menor proporción de O-Oligosacáridos, otro indicio de que esto puede ocurrir son los resultados con la lectina VVA (Fig. 31), que siguen el patrón de la Jacalina.

Todas las IgAs reaccionaron con Con A, PHA-E y WGA (Fig. 29). Esto indica la presencia de estructuras biantenarias y biantenarias bisectadas (DiVirgilio, 1998). La IgA humana, presentan dos sitios conservados de glicosilación en Asn 263 y Asn 459 de la región Fc, ocupadas en su mayoría por estructuras biantenarias, alrededor del 20% de las cuales se encuentran bisectadas con N acetil glucosamina (GlucNac) (Mattu et al., 1998). La IgA porcina también muestra dos sitios potenciales para N glicosilación en su cadena pesada (Brown y Butler, 1994). Por lo que es probable que estos sitios también se encuentren ocupados por N-glicanos biantenarios, algunos de los cuales estén bisectados. Las diferencias entre IgAS e INAC (Fig. 30), pudieran deberse a la presencia del componente secretorio en ésta última. No existen estudios del componente secretorio de la IgAC de cerdo pero en humano se han encontrado 7 sitios glicosilados ocupados principalmente por N-glicanos biantenarios (Royle et al., 2003).

En las estructuras biantenarias de los N glicanos de la IgA humana, las galactosas pueden encontrarse unidas a Ac. Siálico por enlaces α 2-6 y α 2-3 (Mattu et al., 1998). Una evidencia de que existen siálicos en α 2-6 en la IgA porcina, es la respuesta

observada con la lectina SNA (Fig. 31). En cambio la respuesta con la lectina MAA fue muy débil, indicando que probablemente el nivel de siálicos en α 2-3 es muy bajo. Las IgAs porcinas reaccionaron con la lectina ECA que reconoce estructuras oligosacáridas del tipo I con terminación en Galβ1-4GlcNAc (Di Virgilio, 1998). Lo anterior, aunado al resultado con la lectina MAA, pueden ser un indicio de que parte de las estructuras biantenarias de las IgAs porcinas presentan terminaciones en galactosa. La respuesta de las IgAs porcinas con la lectina UEA1, fue menor que la encontrada con la IgA humana. Debido a que UEA es específica para α Fucosa, estos resultados pudieran indicar un menor grado de estructuras fucosiladas en las IgAs porcinas.

Las tres IgAs reaccionaron con PSA indicando la posible presencia de estructuras triantenarias complejas terminadas en galactosa. Se observó reacción, aunque débil de las IgAs porcinas con RCA_I (Fig. 29 y Fig. 31). Esta lectina es específica a estructuras tetrantenarias terminadas en galactosa. En la IgA1 humana, este tipo de estructuras (tri y tetrantenarias), constituyen aproximadamente el 13% de los N-glicanos presentes y se encuentran principalmente en el fragmento Fab (Mattu et al., 1998). La lectina RCA reconoce Galβ1-4 terminal, lo cual también podría ser un indicio de que parte de las estructuras biantenarias de la IgAS y la IgAC terminan en galactosa.

Para confirmar la presencia de O-Oligosacáridos en la IgA porcina la IgAS y la IgAH fueron sometidas a una β eliminación (Duk *et al.*, 1997). Las Ig´s se aplicaron a tiras de Immobilon P y se incubaron en NaOH por 16 h a 40 °C, posteriormente se procedió al ensayo de manchas con las mismas lectinas, para observar los posibles cambios en la intensidad de las manchas, al compararlas con los controles. Se pudo observar que en efecto, tanto la intensidad de las manchas de IgAS como de IgA disminuye, concluyendo que IgAS también contiene O-oligosacáridos (datos no mostrados).

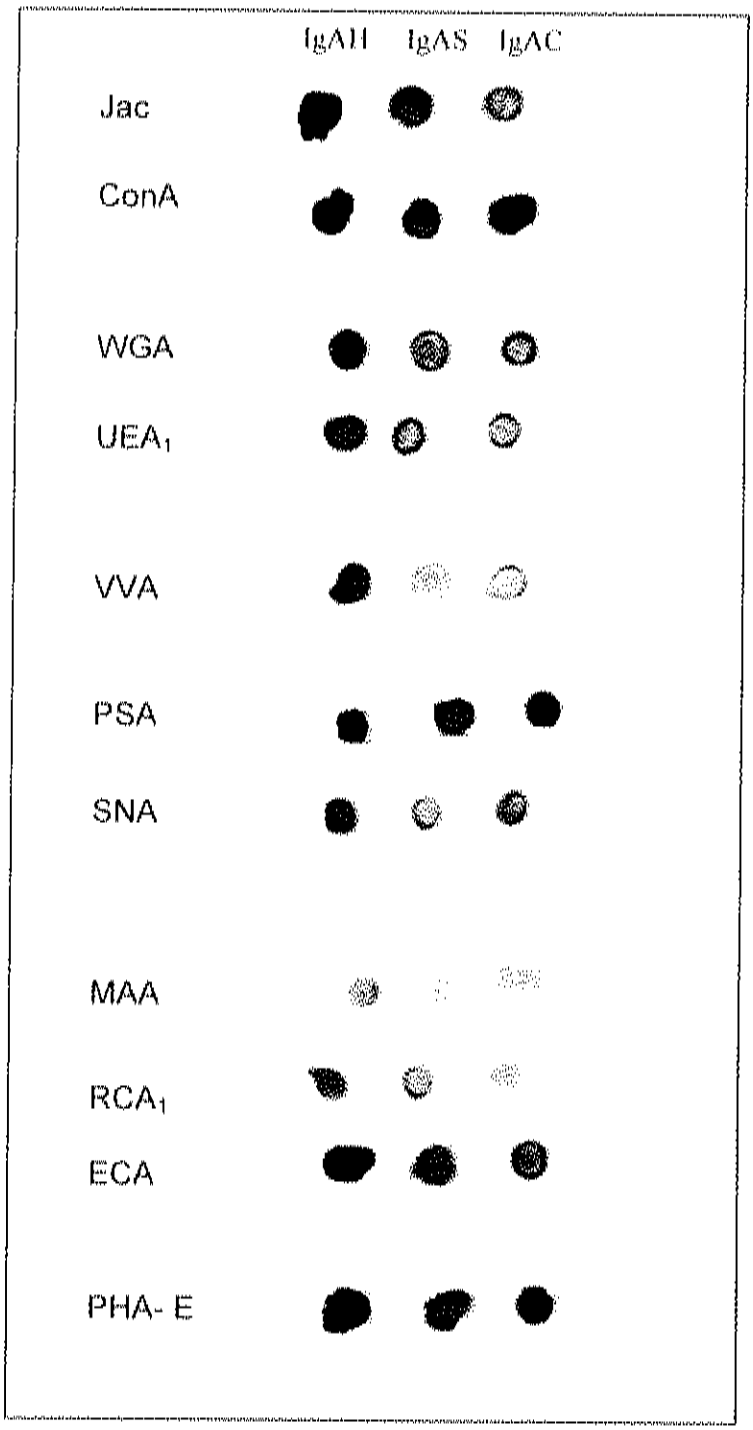

Figura 29. Ensayos de manchas para inmunoglobulinas A. Se inmovilizaron 2 μg de inmunoglobulina en tiras de nitrocelulosa y se incubaron con las diferentes lectinas biotiniladas. IgAH, IgA humana, IgAS, IgA sérica porcina, IgAC, IgA de calostro porcino.

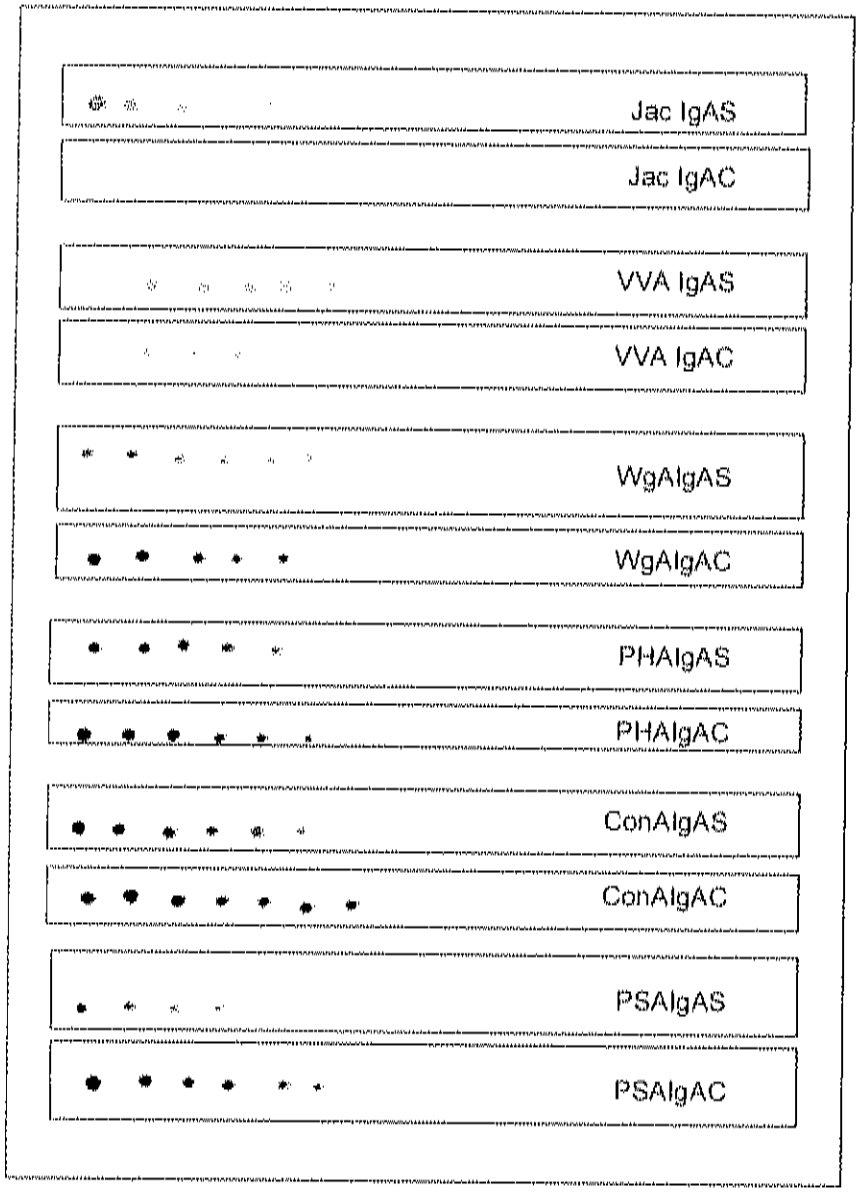

Figura 30. Diferencias en la interacción de las IgAs porcinas con algunas lectinas. La IgA sérica (IgAS) y la IgA de calostro (IgAC) se inmovilizaron en tiras de nitrocelulosa en doble dilución seriada (250 ng a 0.12 ng) y se pusieron en contacto con las lectinas de Jacalina (JAC), *Vicia villosa* (VVA), *Triticum vulgaris* (WGA), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E), *Canavalia ensiformis* (Con A) *y Pisum sativum* (PSA).

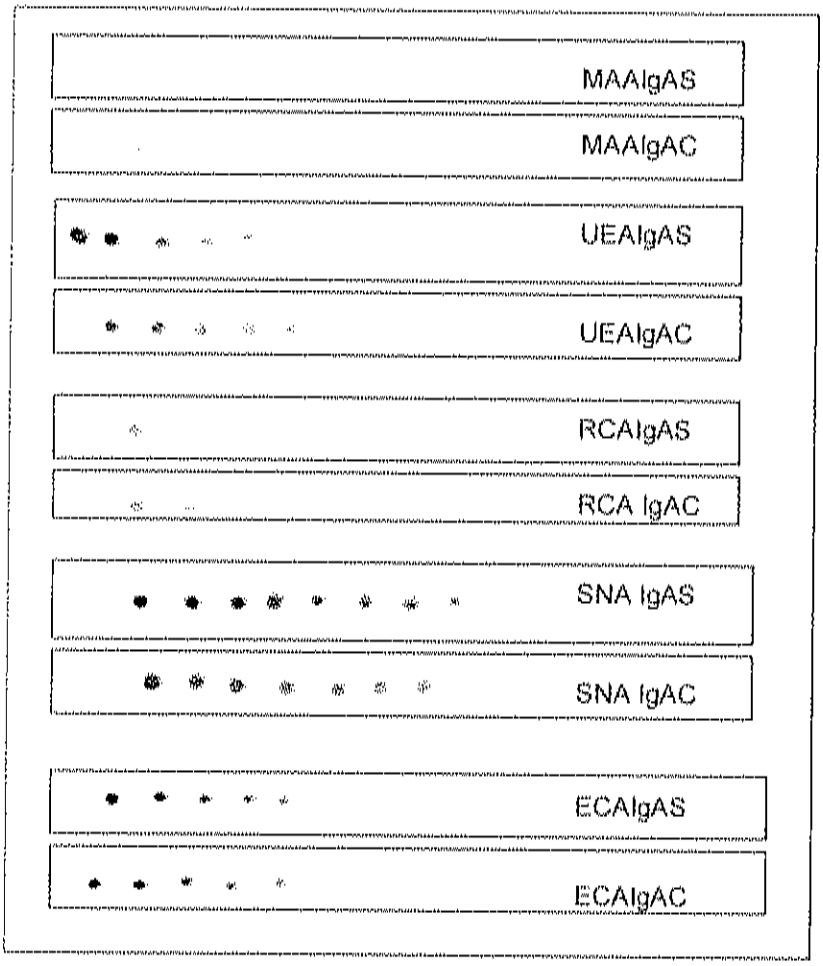

Figura 31. Similitudes en la interacción de las IgAs porcinas con algunas lectinas. La IgA sérica (IgAS) y la IgA de calostro (IgAC) se inmovilizaron en tiras de nitrocelulosa en doble dilución seriada (250 ng a 0.12 ng) y se pusieron en contacto con las lectinas de *Mackia amurensis* (MAA), *Ulex europaeus* (UEA-I), *Ricinus communis* (RCA- I), *Sambucus nigra* (SNA), *y Eritrina cristagalli* (ECA).

IV.3.2.2. Ensayo de manchas para IgG

La figura 32 indica que la especificidad que mostraron las diferentes lectinas biotiniladas para: IgG humana (IgGH), la IgG sérica porcina (IgGS) y la IgG de calostro porcino (IgGC), concuerda con las estructuras encontradas en IgGH, reportadas en la literatura. La IgG humana presenta un sitio de glicosilación en la Asn 297 del fragmento Fc (Holland y Jefferis, 2002). Este sitio se encuentra ocupado por estructuras biantenarias y puede presentar diferentes isoformas, dependiendo de la presencia de fucosa en el centro quitobiosa, de la presencia de un bisecto con N- acetil glucosamina y la presencia de una o dos galactosas terminales. Una característica de la IgG es que únicamente el 10% de sus estructuras se encuentra sialilada (Radaev y Sun, 2001).

La respuesta observada en la interacción de las IgGs porcinas con las lectinas Con A, PHA, y WGA (Fig. 33) indica la presencia de estructuras biantenarias complejas que pueden presentar una bisecto con N-acetil glucosamina (Di Virgilio, 1998). La interacción que se presentó con ECA es un indicio de la presencia de galactosas terminales unidas a GlcNAc por enlaces α 1-4. Otra información que apoya lo anterior es que observó una interacción muy leve con SNA que reconoce a siálicos en α 2-6 y ninguna con MAA, que reconoce a siálicos en α 2-3. Lo anterior indica que existen escasas estructuras terminadas en Ac. Siálico y mayor número de estructuras terminadas en galactosa. Sin embargo, no se presentó interacción con RCA1, que también reconoce galactosas terminales. Se desconoce el porque ocurrió esto, aunque existen reportes de escaso reconocimiento de RCA1 por algunas galactosas terminales en algunas proteínas plasmáticas (Ellies et al., 2002).

Las diferencias principales entre la IgGS y La IgGC se observaron con SNA y UEA1 (Fig. 33). SNA presentó mayor interacción con IgGC y menor con IgGS. Lo anterior pudiera ser un indicio de la presencia de una mayor cantidad de estructuras sialiladas en el calostro. En calostro bovino se han encontrado pequeñas diferencias en la concentración de ácido siálico de la IgG (Morgan *et al.*, 1981). En el caso de UEA1, se también se observó una mayor interacción con la IgGC que con IgAS.

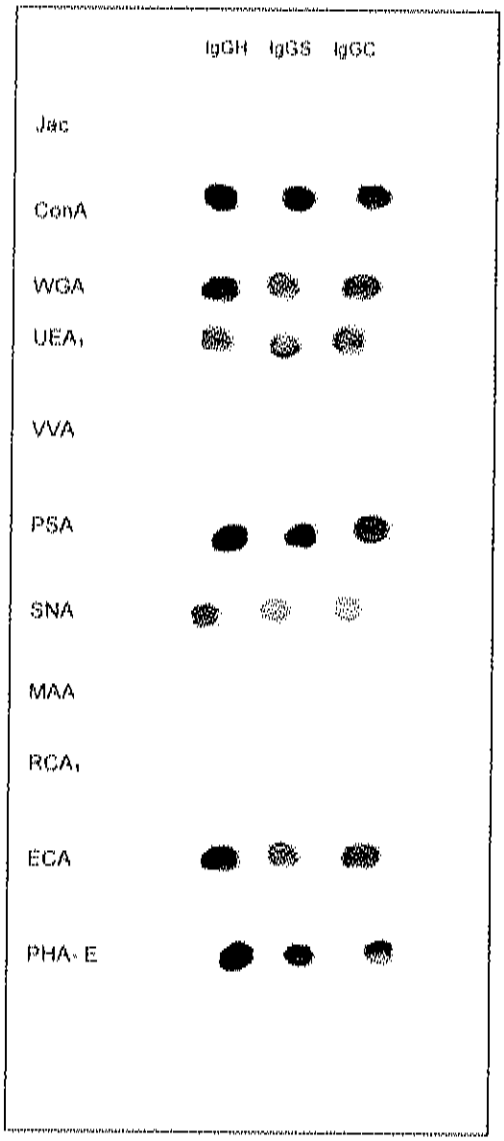

Figura 32. Ensayos de manchas para inmunoglobulinas G. Se inmovilizaron 2 μg de inmunoglobulina en tiras de nitrocelulosa y se incubaron con las diferentes lectinas biotiniladas. IgGH, IgG humana, IgGS, IgG sérica porcina, IgGC, IgG de calostro porcino

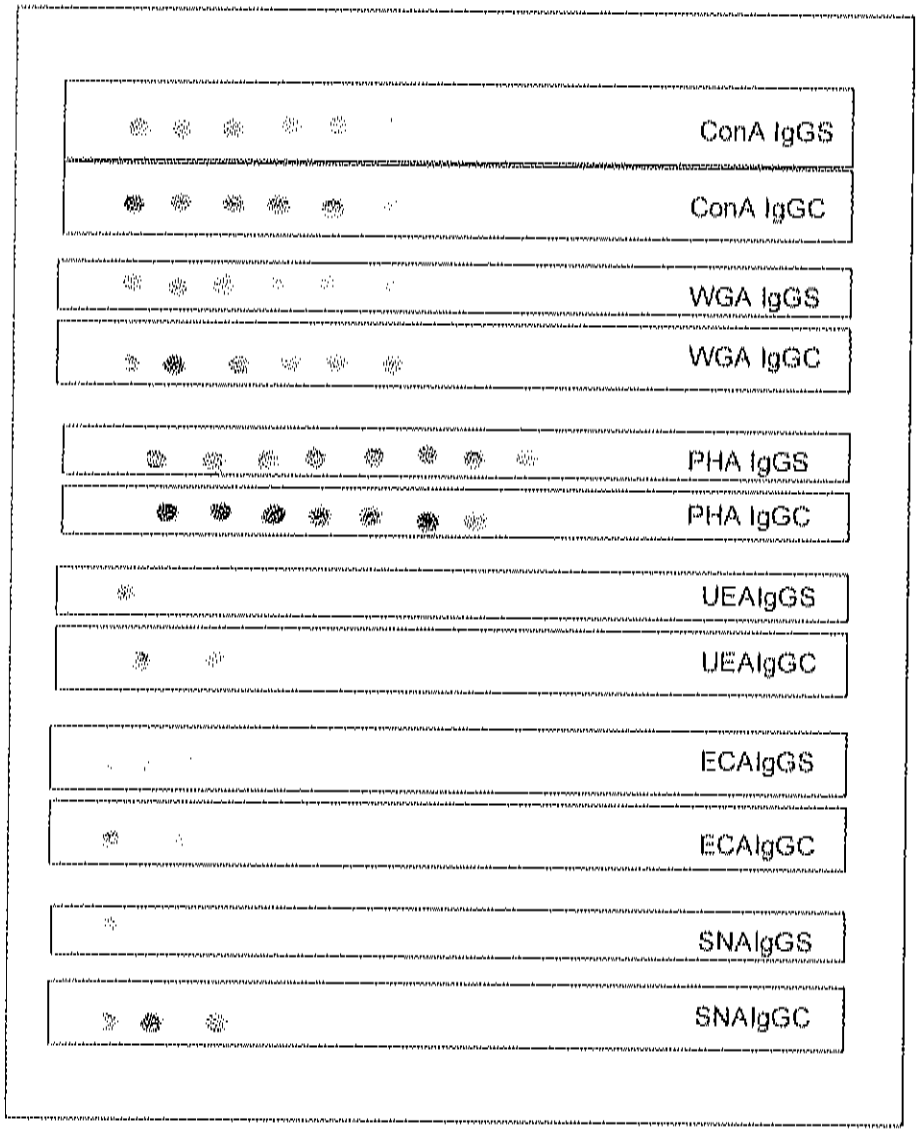

Figura 33. Interacción de las IgGs porcinas con algunas lectinas. La IgG sérica (IgGS) y la IgG de calostro (IgGC) se inmovilizaron en tiras de nitrocelulosa en doble dilución seriada (250ng a 0.12 ng) y se pusieron en contacto con las lectinas de *Canavalia ensiformis* (Con A), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E), *Ulex europaeus* (UEA-I), *Eritrina cristagalli* (ECA) y *Sambucus nigra* (SNA).

IV.3.2.3. Ensayo de manchas para IgM

La IgM humana es una glicoproteína que contiene del 7 al 12% de carbohidratos distribuidos en 5 sitios de N-glicosilación localizados en el fragmento Fc de su molécula, en las posiciones Asn-171, Asn-332, Asn-395, Asn-402 y Asn-563 (Hickman *et al.*, 1972; Ohbayashi *et al.*, 1989). Los oligosacáridos unidos a la Asn402 y a la Asn-563 son del tipo altos en manosa, mientras que el resto (Asn-171, Asn-332, y Asn-395) son estructuras triantenarias complejas que contienen fucosa, Ac. Siálico, galactosa, N acetilglucosamina y manosa. (Ohbayashi *et al.*, 1989). En la Figura 34 podemos observar que las diferentes IgMs interaccionaron con la lectina de PSA que reconoce estructuras triantenarias y con la lectina de Con A que es específica para estructuras altas en manosa. Lo anterior es un indicio de que existen este tipo de estructuras en las IgM del cerdo.

Se observó interacción de las IgMs porcinas con SNA, que detecta Ac. Siálico en posición α2- 6, pero no con MAA que es específica para siálico α2-3. Lo anterior coincide con lo reportado en IgM de ratón y de humano, que presentan principalmente ácidos siálicos en posición α2- 6 (Hickman *et al.*, 1972). En el caso de las lectinas que reconocen a galactosas terminales con enlaces b 1-4, las IgMs porcinas no reaccionaron (RCA1), o su reacción fue visualmente menor que la de IgM humana, indicando que probablemente la mayor parte de las estructuras terminadas en estas galactosas se encuentren sialiladas. También se observó respuesta con UEA1, aunque esta fue visualmente menor que la de de la IgM humana, indicando que probablemente existan menos estructuras fucosiladas en las IgM porcinas que en las humanas, aunque esto deberá comprobarse con posteriores análisis. Las IgMs no interaccionaron con las lectinas JAC ni VVA, las cuales reconocen O-oligosacáridos. Lo anterior concuerda con lo reportado para la IgM humana que contiene únicamente N-glicanos en sus estructuras oligosacáridas conservadas (Hickman *et al.*, 1972; Ohbayashi *et al.*, 1989). En los ensayos de manchas en que se aplicaron las IgMS e IgMC en dilución, no se observó diferencia visual en las interacciones lo cual podría indicar que los carbohidratos de ambas inmunoglobulinas son muy parecidos.

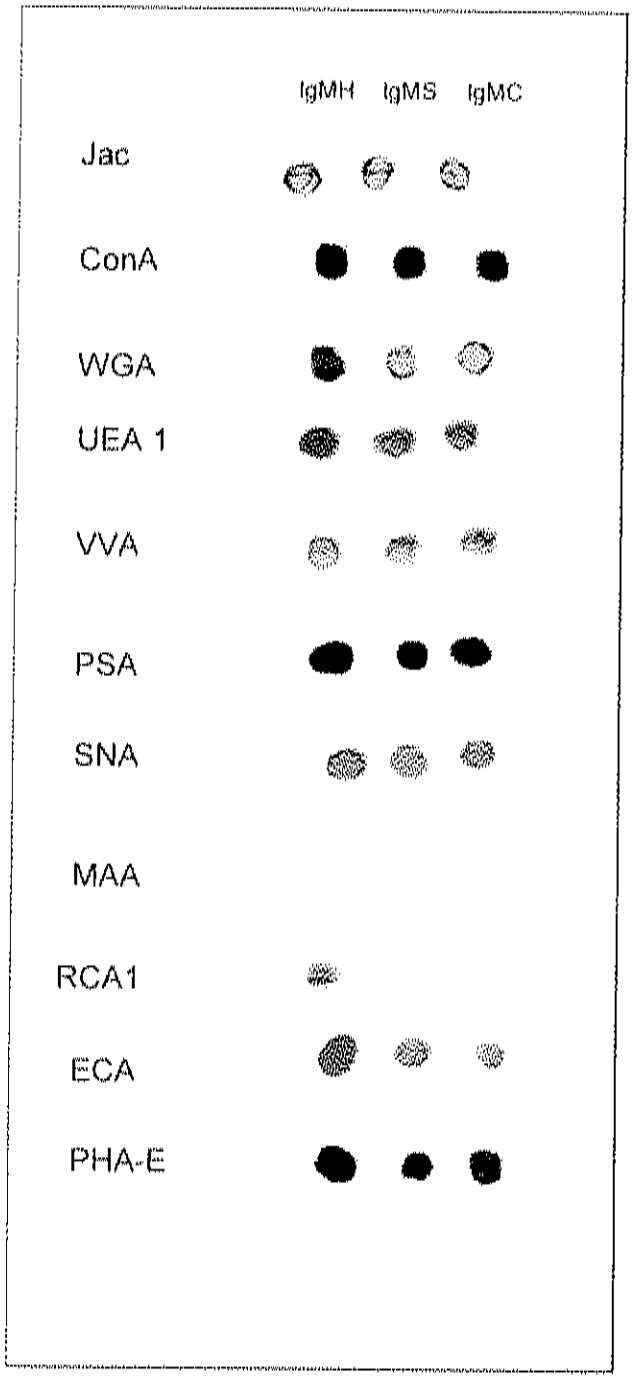

Figura 34. Ensayos de manchas para inmunoglobulinas M. Se inmovilizaron 2 μg de inmunoglobulina en tiras de nitrocelulosa y se incubaron con las diferentes lectinas biotiniladas. IgMH, IgG humana, IgMS, IgM sérica porcina, IgMC, IgM de calostro porcino.

IV.3.3 Lectinoensayos

Los lectinoensayos se practicaron con el objeto de observar posibles diferencias entre los carbohidratos de las inmunoglobulinas porcinas provenientes de suero y de calostro. La figura 35 muestra que las interacciones entre la IgA sérica y la IgA calostral y las lectinas JAC, VVA, WGA y PHA-E fueron diferentes. La IgA sérica muestra valores más altos con JAC y VVA que la IgA de calostro. Lo anterior es un indicio de una mayor O-glicosilación en la fuente sérica. Las interacciones con WGA y PHA-E indican que la IgA de calostro presenta una mayor cantidad de estructuras biantenarias bisectadas, probablemente debido a la presencia del componente secretorio glicosilado. En la figura 33 se observan las interacciones entre las IgAs séricas y de calostro y las lectinas ConA, UEA1, SNA, MAA, ECA y RCA1. No se encontraron diferencias significativas con el análisis de Kruskal- Wallis, entre las interacciones de las lectinas y las IgAs de las dos fuentes. Lo anterior es un indicio de que el grado de fucosilación, sialilación y galactosilación de ambas IgAs es similar.

Las interacciones de la IgG sérica y la IgG calostral con diferentes lectinas fueron similares excepto con UEA I, donde se observó mayor interacción con la IgG de calostro indicando la posible existencia de mayor grado de fucosilación (Fig. 36). En el caso de la IgM, no se observaron diferencias entre las dos fuentes estudiadas, por lo que se deduce que presentan estructuras de oligosacáridos muy similares (Fig. 37).

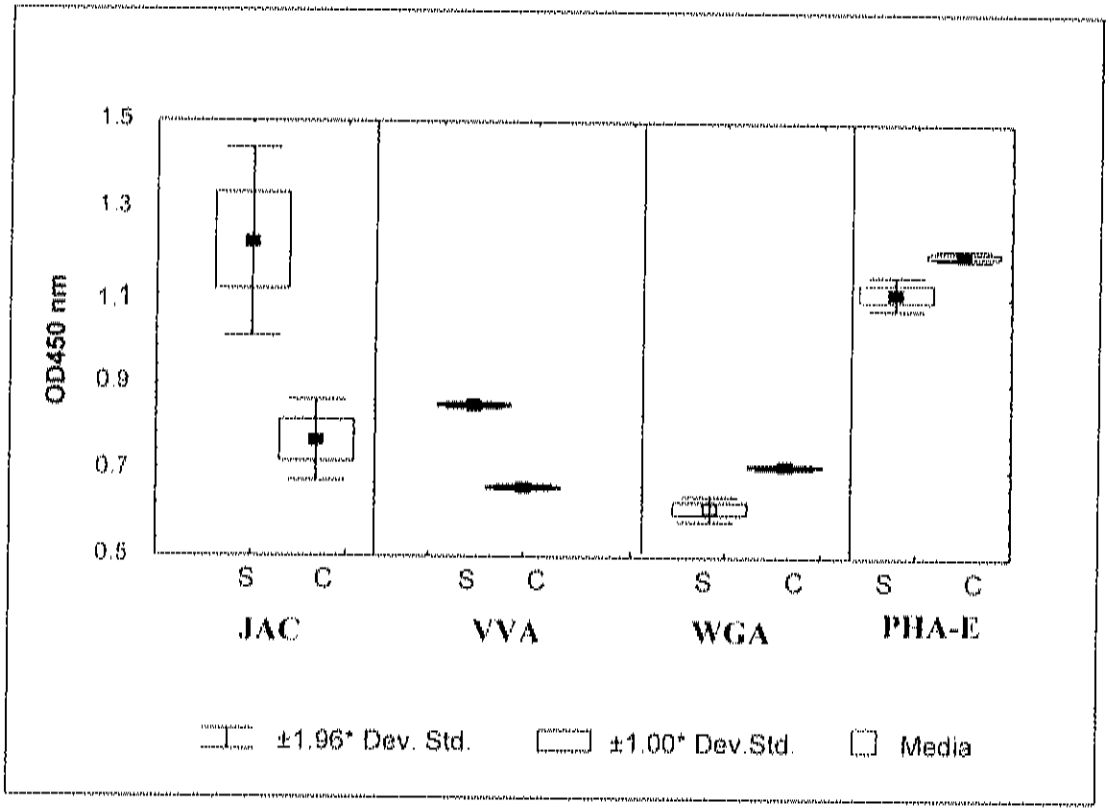

Figura 35. Interacción de IgA sérica (S) e IgA de calostro (C) con las lectinas jacalina (JAC), *Vicia villosa* (VVA), lectina de trigo (WGA) y lectina E de frijol (PHA-E).

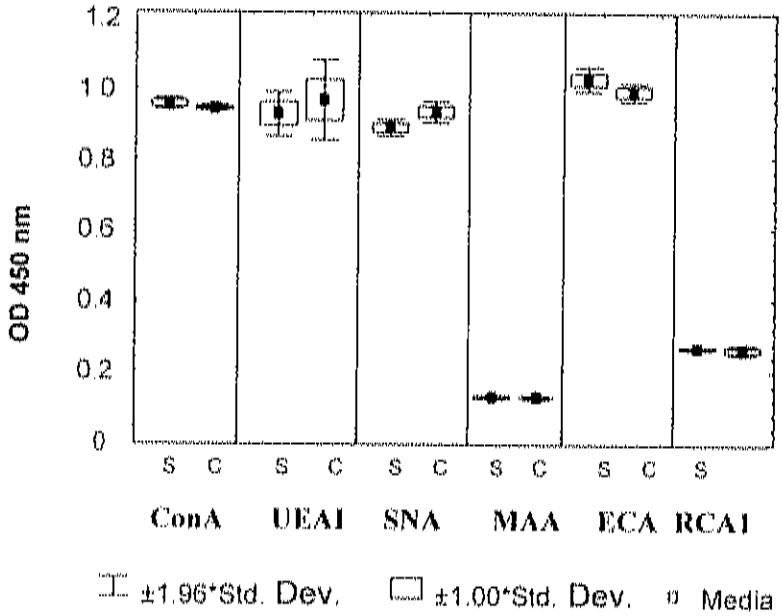

Figura 36. Interacción de IgA sérica (S) e IgA de calostro (C) con las lectinas de: concanavalina A (ConA), *Ulex europaeus* (UEAI), *Sambucus nigra* (SNA) *Mackia amurensis* (MAA), *Eritrina cristagalli* (ECA) y *Ricinus communis* (RCA I).

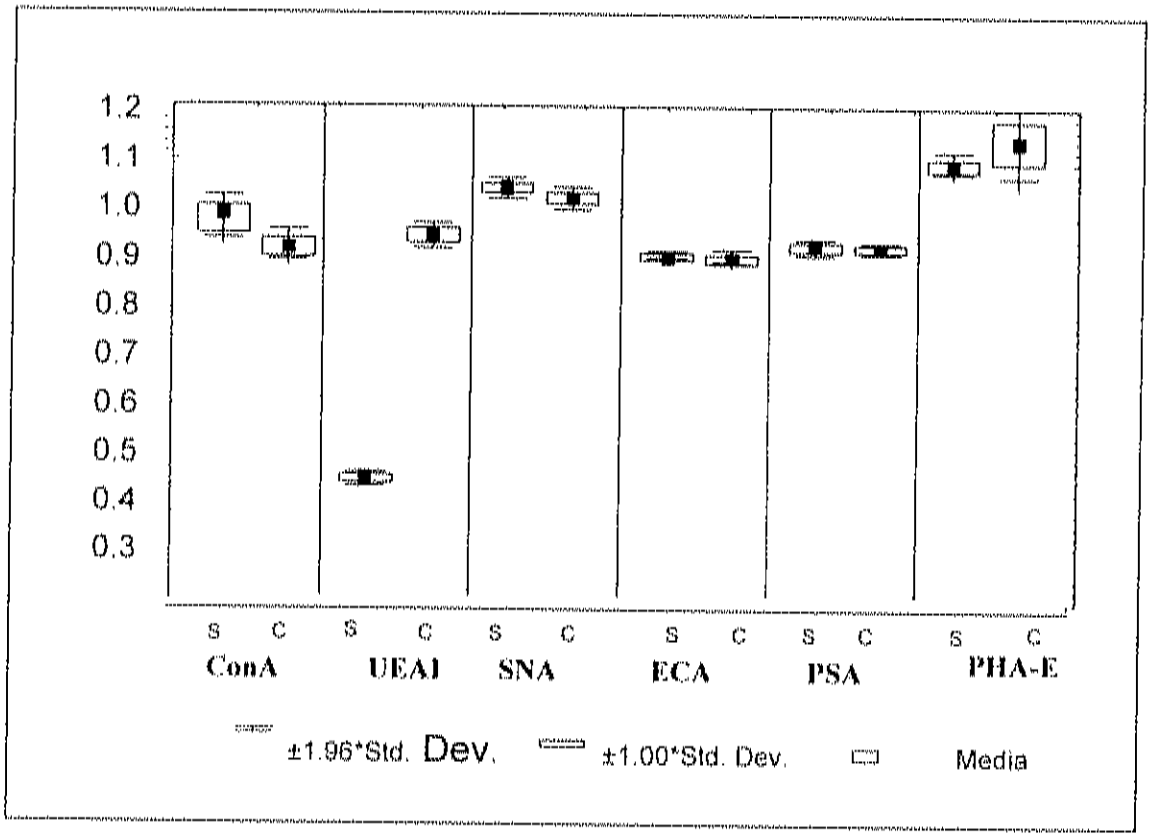

Figura 37. Interacción de IgG sérica (S) e IgG de calostro (C) con las lectinas de: concanavalina A (ConA), *Ulex europaeus* (UEAI), *Sambucus nigra* (SNA) *Pisum sativum* (PSA), y *Phaseolus vulgaris E* (PHA-E).

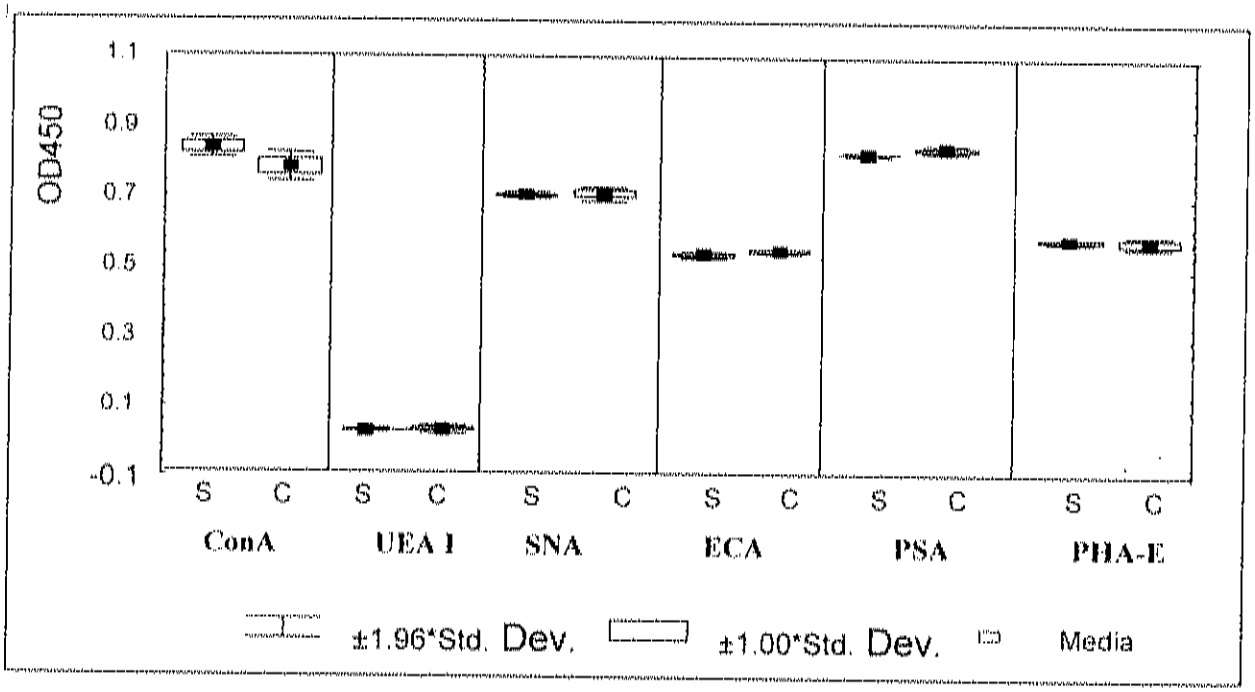

Figura 38. Interacción de IgM sérica (S) e IgM de calostro (C) con las lectinas de: concanavalina A (ConA), *Ulex europaeus* (UEAI), *Sambucus nigra* (SNA) *Pisum sativum* (PSA), y *Phaseolus vulgaris E* (PHA-E)

IV.3.4 Interacción *in vitro* de las Inmunoglobulinas porcinas con *E. coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*

IV.3.4.1 Interacción con E. coli K88

La figura 39 muestra el ensayo de manchas que reveló la unión de *E. coli* K88 con las diferentes Ig´s. Como puede observarse, la bacteria interaccionó con el aislado de Ig´s (humanas y porcinas), con el suero porcino y con la IgA e IgG porcinas; no se presentó interacción con la IgM. Para explorar la posibilidad de que la interacción fuera del tipo no inmunogénico, la IgG y la IgA porcinas fueron disociadas en sus cadenas ligeras y pesadas en un gel de poliacrilamida al 8%, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con la *E. coli* K88 biotinilada . La IgA (Fig. 40) presentó reconocimiento en la banda correspondiente a la masa molecular de la cadena pesada. Lo anterior es un indicio de que

la interacción que presenta la IgA se esté estableciendo entre la adhesina de la bacteria y los carbohidratos del anticuerpo. Existen reportes de que este tipo de interacciones pueden establecerse con los oligosacáridos de las diferentes IgA humanas (Wold *et al.*, 1990; Falk *et al.*, 1993; Rhul *et al.*, 1996; Schroten *et al.*, 1998). Queda por ensayar el reconocimiento de la *E. coli* K88 por el fragmento Fc de la IgA porcina, ya que se conoce que existe un tipo de anticuerpo en camellos, constituido únicamente por cadenas pesadas. De esta manera el antígeno reconoce una secuencia específica de esta región (Ewert *et al.*, 2002). Sin embargo, un punto a favor de nuestro ensayo es que la proteína se encuentra desnaturalizada y por tanto el sitio de reconocimiento alterado por el desdoblamiento de la proteína.

Se ha observado que la capacidad de la IgA de calostro humano de inhibir la adhesión de *Helicobacter pylori* al epitelio gástrico, se reduce significativamente al tratar a la IgA con α-L fucosidasa (Falk *et al.*, 1993). Por otro laso, las cadenas Man (α 1-6)Man α 1-3) Man(α 1-6)Man(α 1-3) Man (β 1-4) GlcNAc(β 1-4)GlcNAc, de la IgA secretoria y la de IgA_2 humanas inhiben la adhesión mediada por la fimbria tipo I de *E. coli* (Wold *et al.*, 1990), las cadenas sialil (α 2-3) galactosa de IgAs e IgA1 inhiben la adhesión de la fimbria S de la *E. coli* causante de meningitis y sepsis en neonatos (Schroten *et al.*, 1998) y los receptores Gal(β 1-3)GlcNAc y sialilados de IgAs e IgA1 inhiben la adhesión de las adhesinas de *Actinomyces naeslundii* y *Streptococcus gordoni* respectivamente (Ruhl *et al.*, 1996).

En la Fig. 41 se observan las interacciones de *E. coli* K88 con IgA de suero y calostro porcino. La IgA de calostro presentó mayor interacción aunque se requieren estudios cuantitativos mediante ensayos de ELISA para poder determinar se existen diferencias. Debido a que la IgA de porcino presenta un solo sitio potencial para la glicosilación de O-glicanos, podría ser que el reconocimiento de la adhesina de la *E. coli* K88 fuera por las estructuras las estructuras de los N glicanos. Existe estudios que indican que la adhesina de ésta bacteria reconoce a las estructuras biantenarias complejas presentes en la transferrina humana (Grange *et al.*, 2002). Estas estructuras son del mismo tipo que los N-glicanos presentes en la IgA humana y, de acuerdo a los ensayos con lectinas, también se encuentran en la IgA porcina.

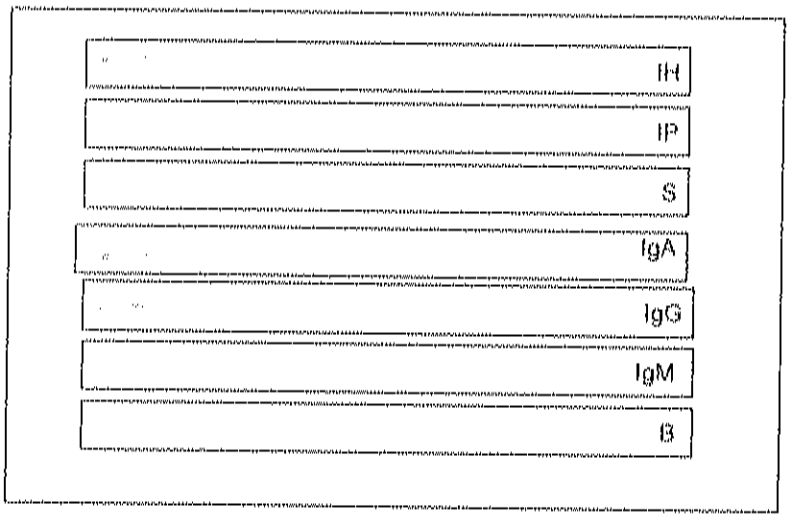

Figura 39. Interacción de *E. coli* K88 con diferentes fuentes de inmunoglobulinas. **A**: inmunoglobulinas IH. Igs séricas humanas, IP Igs séricas porcinas, S: suero porcino IgA: IgA sérica porcina, IgG: IgG sérica porcina IgM: IgM sérica porcina, B: blanco.

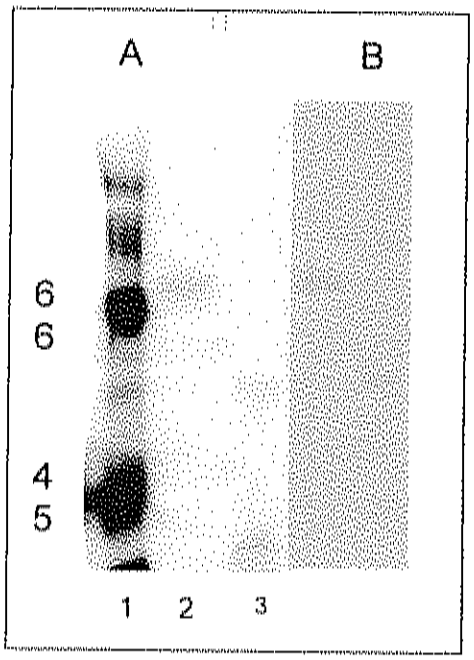

Figura 40. Interacción de IgA en condiciones reductoras y desnaturalizantes con *E. coli K88*. A, Gel SDS PAGE de acrilamida al 8%; carril 1 estándares de masa molecular, 2 BSA-gal (α 1-3) gal, 3 IgA sérica; B Western blot de carriles 2 y 3 en contacto con la *E. coli* K88 biotinilada.

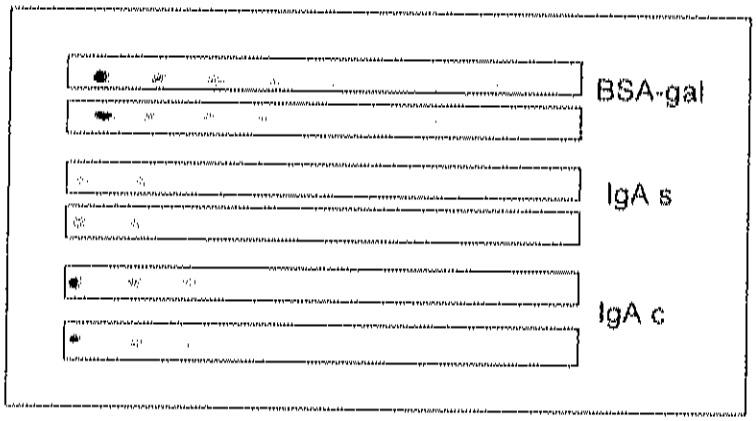

Figura 41. Comparación de la interacción de IgA sérica y de IgA de calostro con *E. coli K88*. **BSA-gal control** de BSA-gal (α1-3) gal, **IAc** IgA de calostro porcino, **IA** IgA sérica porcina

La interacción *E. coli* K88-IgA sérica, no se vio afectada por el pH (Fig. 42). Lo anterior representa una ventaja para la efectividad de los concentrados de Ig´s.

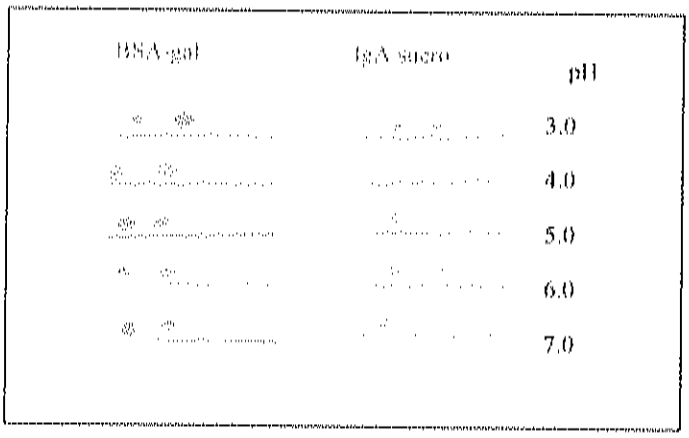

Figura 42. influencia del pH en la interacción de IgA sérica con *E. coli* K88. **A.** control de BSA-gal (α1-3) gal, **B.** IgA: IgA sérica porcina

En la figura 43 se observa que la *E. coli* K88 interaccionó fuertemente con la BSA-gal (α1-3) gal por ser este uno de los epítopes que reconoce la adhesina presente en la bacteria (Francis *et al.*, 1998). También se observó interacción con mucina bovina maxilar

y con asialofetuina.

Entre los principales receptores para *E. coli* K88 se encuentran glicolípidos y glicoproteínas, especialmente del tipo sialoglicoproteínas o aquellas con terminación en galactosa. Adicionalmente se sabe que los residuos de fucosa, galactosa, y GalNAc están involucrados en la interacción lectina-receptor (Francis, 1998). La estructura de la mucina submaxilar bovina (MSB), está compuesta en un 56.7% por oligosacáridos, la mayoría del tipo O-glicanos (Pigman, 1968; Bettelheim *et al.*, 1972). Los principales monosacáridos de la fracción carbohidrato de la MSB, son la GalNAc, el ácido siálico, la galactosa y la fucosa. Lo anterior explicaría la interacción de la bacteria con la glicoproteína bovina.

La molécula de fetuina completa no fue reconocida por la *E coli* K88, mientras que la fetuina desialilada si (Fig. 43). Lo anterior puede ser un indicio de que la adhesina de la bacteria está reconociendo residuos de galactosa β 1-4, como los presentes en las estructuras glicosiladas de la IgA. Se sabe que la fetuina presenta 5 sitios de glicosilación, 3 de los cuales son para N-glicanos (Nilsson *et al.*, 1979). Otra proteína que ha mostrado ser reconocida por la adhesina de *E coli* K 88 a través de estos residuos es la transferrina (Grange *et al.*, 2001).

Los carbohidratos presentes en la mucina gástrica porcina no fueron reconocidos por la adhesina de la *E. coli* K88, aún cuando se aplicó un tratamiento a la glicoproteína para eliminar el ácido siálico (Fig. 43). Lo anterior pudiera deberse a diferencias en el tipo de mucina. Se sabe que los animales pueden expresar mucinas diferentes en diferentes tejidos, por ejemplo, las mucinas del estómago de los cerdos difieren en las de su intestino en las secuencias de sus oligosacáridos, en los isómeros que presentan y en sus terminaciones (Pérez-Vilar y Hill, 1999; Thomsson *et al.*, 1999).

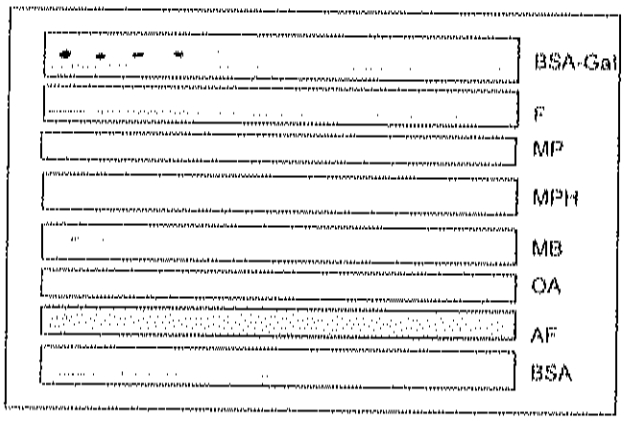

Figura 43. Interacción de *E. coli* K88 con diferentes glicoproteínas. **BSA. gal**: BSA gal (α1-3) gal (control positivo), **F** fetuina, **MP**, mucina porcina, **MPH** mucina porcina desialilada, **MB**, mucina submaxilar bovina, **AF** asialofetuina, **OA** ovoalbúmina, **BSA** albúmina de suero bovino (control negativo).

Para ensayar la adhesión de la *E. coli* K 88 en el intestino de cerdos de la región, se aislaron las mucinas de 4 lechones neonatos de 10 días. Las mucinas se obtuvieron por doble precipitación etanólica, a partir de las diferentes porciones del intestino delgado de los lechones (duodeno, yeyuno e íleon) y de las heces de los mismos.

El ensayo de manchas de las mucinas con *E. coli* K 88 (Fig. 44) mostró una mayor interacción con las mucinas de duodeno, posteriormente con las de yeyuno y por último por las de ilíon. Lo anterior concuerda con lo reportado en la bibliografía (Francis *et al.*, 1998). No se observó interacción con las mucinas aisladas de las heces (datos no mostrados).

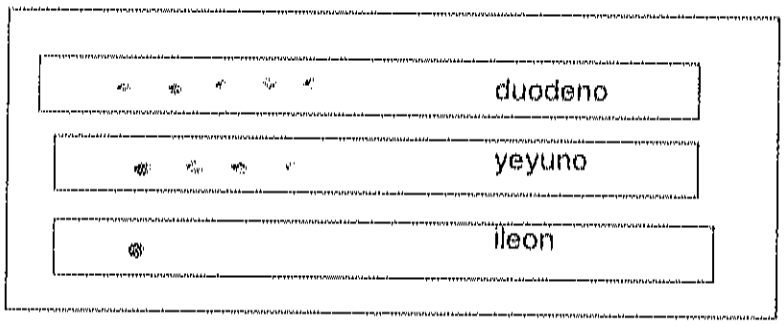

Figura 44. Ensayo de manchas de la interacción de *E. coli* K88 con mucinas de lechones de 10 días. D: duodeno, Y: yeyuno, I: ilion.

IV.3.4.2 Interacción con Salonella choleraesuis

La *S. choleraesuis* interaccionó con el aislado de Ig´s humanas y porcinas y con mayor intensidad con la IgA y IgM séricas porcinas (Fig. 45A). En el caso de las glicoproteínas se observó interacción con ovoalbúmina y con la BSA-gal (α1 -3) gal (Fig. 45B). Firon *et al.* (1983), reportaron la presencia de una fimbria que reconoce manosa, mientras que Giannasca *et al.* (1996) observaron la adhesión de de *Salmonella* typhimurium a estructuras gal (α1-3) gal. Lo anterior coincide con las respuestas observadas con BSA-gal (α1-3) gal y con la ovoalbúmina que se encuentra glicosilada con estructuras altas en manosa.

La interacción de la IgA disociada con *S. choleraesuis* fue negativa, mientras que con IgM no fue reproducible. Se requieren posteriores análisis para comprobar si ésta interacción se lleva a cabo. La posibilidad existe debido a la presencia de oligosacáridos altos en manosa en la molécula de IgM.

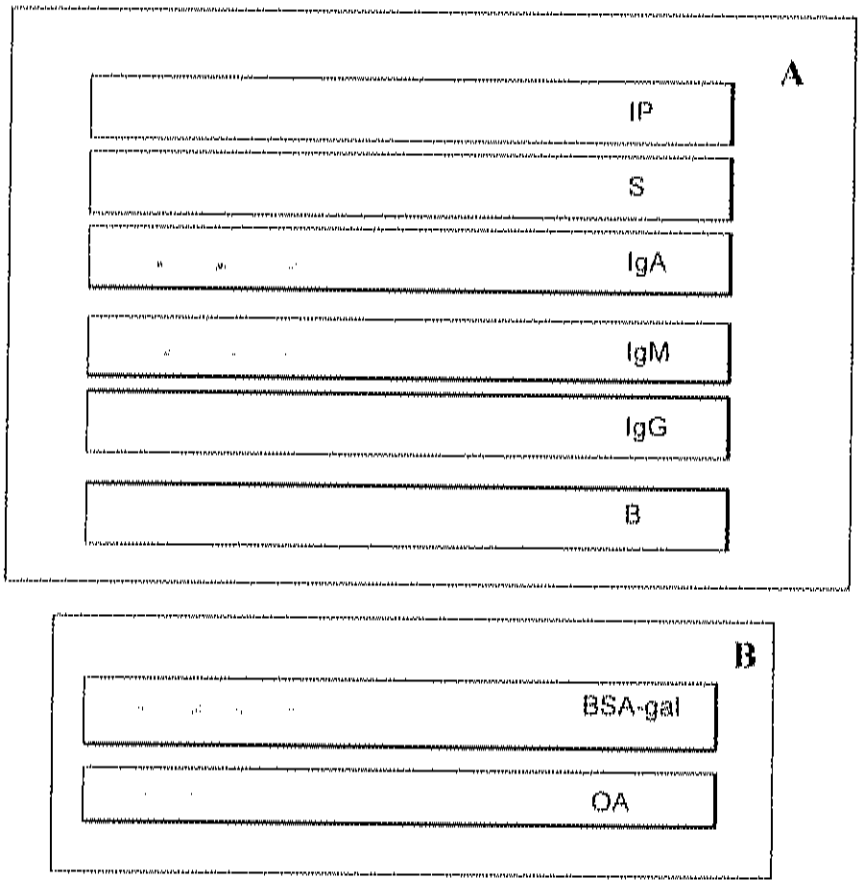

Figura 45. Interacción de *Salmonella choleraesuis* con las Ig´s porcinas y con otras glicoproteínas **A**: Interacción con inmunoglobulinas IH, aislado de Igs séricas humanas, IP, aislado de Igs séricas porcinas, S, suero porcino IgA, IgA sérica porcina, IgG, IgG sérica porcina IgM, IgM sérica porcina, B blanco. **B**: BSA gal (1-3 gal, F, fetuina, MP, mucina porcina, MB, mucina bovina, AF asialofetuina, OA ovoalbúmina, BSA albúmina de suero bovino (control negativo)

La figura 46 presenta las interacciones de *S. choleraesuis* con las diferentes porciones de intestino de lechón. A diferencia de la *E. coli* K88 que interaccionó en mayor medida con el aislado de mucinas del duodeno, la *Salmonella* interaccionó de igual manera con todas las porciones.

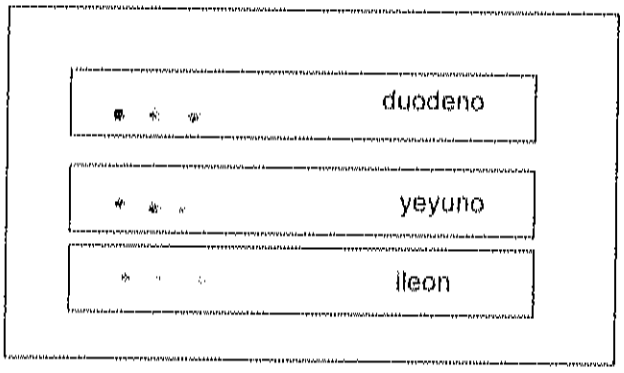

Figura 46. Ensayo de manchas de la interacción de *Salmonella choleraesuis* con mucinas de lechones de 10 días. B control negativo, BSA-gal control positivo, Clave 100 lechones tratados con probióticos, clave 129 lechones no tratados. D: duodeno, Y: yeyuno, I: ilion, H: heces.

IV.3.4.3 Actividad hemaglutinante de las adhesinas de E. coli K88 y S. choleraesuis en eritrocitos de lechón y cerdo adulto

La actividad hemaglutinante de las adhesinas de las bacterias patógenas se ensayó a partir de la sangre de 5 lechones y de 5 cerdos adultos. En la tabla 11 podemos notar que ambos patógenos presentaron mayor título de hemaglutinación en animales neonatos que en adultos. Lo anterior puede deberse a que los receptores a los que reconocen estas adhesinas, cambian a través de la maduración del cerdo. Existen evidencias de que esto ocurre en el tracto gastrointestinal y a partir de ellas se ha originado la explicación de la susceptibilidad de los lechones al ataque de estos patógenos (Francis *et al.*, 1998; Grange *et al.*, 1998).

La fimbria de *E. coli* K88 presentó mayor capacidad hemaglutinante. Esta se vio influida por el tipo de tratamiento, presentando dependencia por Ca^{+2} y Mg^{+2} .Adicionalmente se observó que los eritrocitos sin tripsinizar se aglutinar más que los no tripsinizados. Este comportamiento se ha observado en ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de conejo, en presencia de *E. coli* K88 (Meng *et al.*, 1998). Lo anterior puede constituir un indicio de que el receptor reconocido en el eritrocito por la adhesina, pertenece al tipo de las glicoproteínas. A partir del intestino de lechones se han aislado

receptores para *E. coli* K88 del tipo glicoproteína (Francis *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000), y glicolípidos (Grange *et al.*1999). En el caso de *S. choleraesuis* se observó un título de hemaglutinación muy bajo, probablemente debido a que el receptor que reconoce no se encuentra en los eritrocitos.

Tabla 11. Actividad hemaglutinante de *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* en eritrocitos de cerdo adulto y lechón

	AH *E. coli* K 88		AH *S. choleraesuis*	
Tratamiento	Adulto	Lechón	Adulto	Lechón
Tripsinizados	2	8	(-)	2
Tripsinizados + Ca^{+2} y Mg^{+2}	4	16	(-)	2
Sin tripsinizar + Ca^{+2} y Mg^{+2}	8	32	2	4

AH: Actividad hemaglutinante

Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación de las adhesinas de *E. coli* K88 se realizaron con mucina submaxilar bovina, mucina gástrica porcina, ovoalbúmina, albúmina de suero bovino, asialofetuina, aislado de mucinas de duodeno de lechón, aislado de Ig´s e IgA. Se utilizaron concentraciones de 2mg hasta 0.5 µg/mL. La tabla 18 resume los resultados obtenidos. Como era de esperarse las mucinas del duodeno del lechón inhibieron la hemaglutinación a muy bajas concentraciones (0.5 µg/mL). La mucina submaxilar bovina y la asialofetuina también mostraron inhibición a concentraciones del orden de los nanogramos coincidiendo con los resultados observados en los ensayos de manchas. Las preparaciones de Ig´s porcinas inhibieron la hemaglutinación a concentraciones de 8µg /mL probablemente por la acción conjunta de la IgG y la IgA que en el ensayo de adhesión mostraron actividad contra *E. coli* K88. La mínima concentración inhibitoria de IgA fue de 4 µg/mL. Lo anterior es un indicio de la importancia de esta inmunoglobulina en la protección del lechón contra las enfermedades patógenas. Sin embargo deben realizarse ensayos para observar la efectividad de las inmunoglobulinas en animales vivos.

Tabla 12. Inhibición de la adhesina de E coli K 88 en presencia de glicoproteínas

Glicoproteína	Mínima concentración inhibitoria (mg/ml)
Preparaciones de Ig´s	0.007
IgA porcina	0.004
Aislado de mucina de duodeno de lechón	0.0005
Mucina submaxilar bovina	0.008
Asialofetuina	0.062
Mucina gástrica porcina	2
Mucina gástrica porcina desialilada	2
Ovoalbúmina	N.I
Albúmina de suero bovino	N.I

CAPITULO V
RESUMEN DE HALLAZGOS Y CONCLUSIONES

Resumen de hallazgos

- Las matrices de Sefarosa HA y Novarosa EDA HA son capaces de aislar Ig´s séricas y de calostro porcino en un solo paso
- Sefarosa HA presento una capacidad de 3.9±0.1 mg/mL de matriz en el aislamiento de Igs séricas porcinas y de 4.1± 0.2 mg/mL de matriz en el aislamiento de Ig´s de calostro porcino. Ésta capacidad superó a la capacidad de adsorción de Novarosa EDA HA en un 18%.
- La matriz de Sefarosa HA adsorbe el total de la IgG y el de la IgA y el 52% de la IgM presentes en suero porcino, mientras que la matriz de Novarosa EDA HA adsorbe el 79% de la IgG, el 17% de la IgA y el 89% de la IgM. Esta selectividad tan notable de Novarosa EDA HA puede aprovecharse en el aislamiento de IgM.
- La adsorción específica de las Ig´s séricas porcinas a Sefarosa HA fue mayor (6.5±0.3 mg/mL de matriz) que la de Novarosa EDA HA (4.5±0.4 mg/mL de matriz).
- La capacidad de Sefarosa HA se vio afectada por el tiempo de acetilación de la matriz, el diámetro de la columna, el tiempo de almacenamiento de la matriz no acetilada y el volumen de cama. La matriz no perdió su capacidad después de 20 corridas continuas, ni se vio afectada durante el almacenamiento por 7 días en Guanidina 4M, pH 7.6.
- Con el esquema cromatográfico utilizado en este estudio no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las capacidades del gel comercial T (3.63±0.3mg/mL de matriz) y la capacidad de Sefarosa HA (3.9±0.1 mg/mL de matriz). Sin embargo, Sefarosa HA muestra mayor selectividad para los tres tipos de inmunoglobulinas, mientras que el gel T es más selectivo para IgG.
- El patrón de adsorción de la matriz de Sefarosa HA permite aplicar el suero porcino

a altas concentraciones (40 mg/mL de proteína), mientras que para el gel T sea efectivo requiere de diluciones mayores.

- El índice de actividad emulsificante de la fracción albúmina fue de 165 m^2/g. Es menor que el encontrado para la albúmina sérica bovina, pero mayor que el de el caseinato de sodio, las proteínas del suero de la leche, las proteínas de la soya y la ovoalbúmina. La estabilidad de las emulsiones formadas con la fracción albúmina porcina es mayor a la de todas las proteínas mencionadas excepto a la de la albúmina sérica bovina. Lo anterior demuestra la potencialidad de esta fracción como aditivo alimentario.

- La fracción albúmina presentó una solubilidad máxima en agua de 91% a pH 7.0. Esta característica facilita su incorporación en alimentos líquidos.

- La solubilidad de las inmunoglobulinas porcinas fue de 90 a 96% en soluciones salinas 0.25M siendo aceptable para la elaboración de preparaciones orales.

- La refrigeración y la adición de 0.1% de sorbato de potasio evitaron la proliferación de mesofílicos aerobios en las preparaciones líquidas de inmunoglobulinas. En dichas preparaciones no se detectaron organismos coliformes, *Salmonella* ni *Staphylococcus aureus* en las preparaciones de inmunoglobulinas en los diferentes tratamientos. Además, no se detectó la presencia de los virus porcinos: del Ojo Azul, de Aujeszky, del parvovirus porcino, de gastroenteritis transmisible y del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS).

- Las preparaciones de inmunoglobulinas almacenadas por 15 días, mostraron una actividad contra *E. coli* K88 comparable a la de las inmunoglobulinas de calostro.

- Se logró la purificación de la IgA, la IgG y la IgM de suero y calostro porcinos por cromatografía de afinidad. Las capacidades de las matrices agarosa Anti IgG, agarosa Anti IgA y agarosa Anti IgM fueron 0.6, 0.4 y 0.2 mg/mL de matriz respectivamente.

- Los ensayos de manchas y los lectinoensayos indican que las estructuras oligosacáridas de las IgAs porcinas son similares a las estructuras de N- glicanos presentes en la IgA humana. También se observó que contienen menos estructuras del tipo O-glicanos que ésta inmunoglobulina. En lo que se refiere a las IgGs porcinas se encuentra una concordancia con las estructuras de la IgG humana. Adicionalmente se observó que la IgG de calostro porcino se encuentra más sialilada y fucosilada que la IgG sérica porcina. En el caso de las IgMs porcinas no se observan diferencias entre las estructuras de las fuentes séricas y de calostro.

- Los aislados de Ig´s porcinas, la IgG y la IgA séricas porcinas interaccionan con *E. coli* K88. Se encontraron fuertes indicios de que la interacción con IgA se establece a través de sus estructuras oligosacáridas. Esta interacción es independiente del pH, similar a la de la IgA de calostro porcino y pudiera constituir una estrategia adicional de defensa de la inmunoglobulina para evitar la adhesión de patógenos al tracto gastrointestinal del lechón.

- Los aislados de Ig´s porcinas, la IgA y la IgM séricas porcinas interaccionaron con *S. choleraesuis*. No se encontró evidencia concluyente de que la existencia de una interacción entre los oligosacáridos de la IgM porcina y el patógeno.

- Las preparaciones de Ig´s porcinas y la IgA porcina inhiben la hemaglutinación de los eritrocitos de lechones de 10 días provocada por la adhesina de *E. coli* K 88

Conclusiones

- Las inmunoglobulinas séricas porcinas fueron aisladas rápida y eficientemente empleando cromatografía de interacción hidrofóbica: la capacidad de la matriz de Sefarosa HA fue igual a la del gel T, sin embargo mostró mayor especificidad por los tres tipos de inmunoglobulinas. El proceso de aislamiento utilizando Sefarosa HA, fue escalable a nivel laboratorio.
- Los concentrados de inmunoglobulinas séricas porcinas mostraron excelente calidad microbiológica y reactividad contra *E. coli* K88 después de 15 días de almacenamiento.

- *E. coli* K 88 interaccionó con la IgA y la IgG porcinas mientras que *Salmonella choleraesuis* con la IgM y la IgA. En el caso de la IgA, se encontró fuerte evidencia de que parte de esta interacción ocurre entre los oligosacáridos y las adhesinas del patógeno y de que no se ve afectada por el pH.

- Las estructuras de los oligosacáridos de las Ig´s séricas y de calostro porcino son semejantes, por lo que pueden utilizarse indistintamente, a las concentraciones adecuadas.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alais, C. 1980. Quesos en: Ciencia de la leche. Editorial CECSA. México. Pp 112.
- Allen, A.C. 1999. Methodological approaches to the analysis of IgA O-glycosylation in IgA nephropaty. J. of Nephrology. 12(2): 76-84.
- Alexander, T.J.L. 1994. Neonatal diarrhea in pigs, En: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C.L. Gyles Ed, CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 151-170.
- Allee, G.L. y Touchette, K.J. 1998. Efectos de la nutrición sobre la salud intestinal y el crecimiento de lechones. XIV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. UVESA Navarra.
- Angelova, M.K., Dimov, N.P., Nachev, N.D. y Tsvetkov, A.B. 1997. Preparative hydrophobic interaction chromatography as effective stage in the purification of glucagons and insulin. Bulg. Chem. Commun. 29: 90-100.
- Anónimo.1993.Experimental design en: Hydrophobic interaction chromatography, principles and methods. Pharmacia Uppsala Sweden. pp 29-74.
- Arthington, J.A., Weaver, E., Chi, F. y Russell, L. 1997. The use of concentrated spray dried plasma protein in preweaned/neonatal pig. American Association of Swine Practitioners pp. 123-124.
- Badui, S.1990. Proteinas en: Quimica de Alimentos. Editorial Alhambra México. Pp 148-163.
- Barnes, G.L., Doyle, L.W., Hewson, P.H., Knoches, A., Mc Lellan, J.A., Kitchen, W.H y Bishop, R.F. 1982. A randomized trial of oral gammaglobulin in low birth weight infected with rotavirus. Lancet. I: 1371-1373.
- Bettelheim, F., Hashimoto, Y., and Pigman, W.1972. Light-Scattering Studies of Bovine Submaxillary Mucin. Biochem. Biophys. Acta.63, 235-242.
- Belew, M., Juntti, N., Larsson, A. y Porath, J.1987. A one-step purification method for monoclonal antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a 'thiophilic' adsorbent. J Immunol. Methods.102:173 – 82.
- Berna, P.P., Berna, N., Porath, J. y Oscarsson, S.1998. Comparison of the protein adsorption selectivity of salt-promoted agarose-based adsorbents, hydrophobic, thiophilic and electron donor-acceptor adsorbents. J Chromatogr. A.800:151 – 159.
- Blomberg, L., Henriksson, A. y Conway, P.L. 1993. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 59: 34-39.
- Blum, P.M., Phelps, D.L., Ank .B.J., Krantman, H.J. y Stiehm, E.R.1981. Survival of oral human serum globulin in the gastrointestinal tract of low birth weight infants. Pediatr Res 1981; 15:1256-60.
- Bogstedt, A.K., Johansen, K., Hatta, H., Kim, M., Casswell, T., Svensson, L. y Hammarstrom, L. 1996.Passive immunity against diarrhoea. Acta Paediatr. 85:125-8.
- Borbolla, S.G. y Aubert de la P.I. 1997. Digestión de proteinas y su efecto en la integridad intestinal. Memorias del curso sobre avances recientes en fisiología

nutritiva del lechón y talleres sobre nutrición de reproductoras. Ed. Amena. México. 54-60.

- Borja, E. 1998. Avances en la alimentación de porcino: Lechones y cerdos en engorde. XIV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. UVESA Navarra.
- Bosi, P., Han, K., Perine, S. Casini, L., Creston, D., Gremokolini, C. y Mattuzzi, S. 1999. Effect of different spray dried plasmás on growth, ileal digestibility and health of early weaned pigs challenged with *E. coli* K88. Book of Abstracts of the 50th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. p. 334.
- Bourne, F.J. y Curtis, F., 1973. The transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM from serum to colostrums and milk in the sow. Immunology 24: 157-162.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Brandon, M.R., Watson, D.L. y Lascelles, A. K. 1971. The mechanisms of transfer of immunoglobulins into mammary secretion of cow. Australian J.Exp. Biol.. Med. Sci. 49:613-618.
- Braun, R. 1966. Une nouvelle méthode de préparation des farines de sang. Colloque Internacionale "Le traitement du sang et thes déchets à l'abattoir". RTVA 12-16.
- Brown. W.R. y Butler, J.E. 1994. Characterization of a C alpha gene of swine. Mol. Immunol. 31(8): 633-642.
- Brown, W. R., I. Kacskovics, B. A. Amendt, N. B. Blackmore, M. Rothschild, R. Shinde, and J. E. Butler. 1995. The hinge deletion allelic variant of porcine IgA results from a mutation at the splice acceptor site in the first C alpha intron J.Immunol. 154:3836-3848.
- Burnouf, T. 1995. Chromatography in plasma fraction: benefits and future trends. J. Chromatogr B. 664: 3-15.
- Burgeois, C-M. y Le Roux, P. 1982. Proteínas de la sangre animal en: Proteínas Animales.. Editorial el Manual Moderno. México.pp 311-333
- Butler, J.E., Klobasa, F. y Werhahn, E. 1981. The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. Vet Immunol. Immunopathol. 1981 Feb; 2(1): 53-65.
- Butler, J.E. y Brown, W.R. 1994. The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine. Vet. Immunol. Immunopath. 43: 5.12.
- Butler, J.E., Sun, J., Kacskovic, I. Brown, W.R. y Navarro, P. 1996. The VH and CH immunoglobulin genes of swine: implications for repertoire development. Vet. Immunol. Immunopath. 54: 7-17.
- Candia- Plata, M.C. 2000.Caracterización de los oligosacáridos del Fc de la IgA1 sérica de pacientes con Diabetes Mellitus tipo II. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Candia-Plata, M.C., Garcia, J., Guzmán, R., Porath, J. Y Vázquez-Moreno, L. 2001. Isolation of human serum immmunoglobulins with a new hydrophobic interaction chromatography (HIC) adsorbent.14th International Symposium on Affinity Interactions. International Society for Molecular Recognition. San Carlos, México. Pp 27.
- Cano, J.P., Utrera, V., Márquez, Z., Fuentes, D., Zannin, L., Cordero, F. y Sogbe.

E. 2001. Diagnóstico y control de la Salmonelosis porcina. http://www.ppca.com.ve/vp/articulos/vp41p23.htm

- Carvajal, V.A. 2000. Problemás entéricos. Porcicultura. http://www.porcicultura.com
- Casadevall A.1999. Passive antibody therapies: progress and continuing challenges. Clinical Immunology. 93(1):5-15.
- Caseres –Carrisosa, N.2003. Elaboración y caracterización de membranas de quitina para la separación de inmunoglobulinas de cerdo. Tesis maestría del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.eC. Hermosillo, Sonora, México.
- Caseres, N y Mata, M.L. 2001. Caracterización parcial de la especificidad antigénica de la IgA1 polimérica y monomérica séricas de pacientes con Diabetes Mellitus tipo II. Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora. México.
- Castillo, R.L., Montoya, H.L. y Ruiz, G.J. 2002. Tratamiento de residuos en rastros. Ciencia y Desarrollo. XXVII (160): 48-53.
- Cera, K.R., Mahan, D.C., Cross, R.F., Reinhart, G.A. y Whitmoyer, R.E. 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. J. Anim. Sci. 66: 574-584.
- Coffey, R.D. y Cromwell, G.L. 1995. The impact of environment and antimicrobial agents on the growth response of early-weaning pigs to spray-dried porcine plasma. Journal of Animal Science. 73: 2532-2539.
- Coma, J. 1998. Control de *Salmonella* en carne de porcino: efecto de la alimentación animal. XIV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. UVESA Navarra.
- Commings, D.E., Miguel, A.G. y Lesser, B.H. 1979. Nuclear proteins. VI. Fractionation of chromosomal non-histone proteins using hydrophobic chromatography. Biochem. Biophys. Acta. 563: 253-260.
- Conway, P.L., Blomberg, L., Welin, A. y Cohen, P.S. 1991. The role of piglet intestinal mucus in pathogenicity of *Escherichia coli* K88. FEMS. 59: 335-337.
- Cordle, C.T., Schaller, J.P., Winship, T.R., Candler, E.L., Hilty, M.D., Smith, K.L., Saif, L.J., Kohler, E.M. and Krakowska, S. (1991). Passive immune protection from diarrhea caused by rotavirus or *E. coli*: An animal model to demonstrate and quantitate efficacy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 310, 317-327.
- Crawley A. y Wilkie, B.N. 2003. Porcine isotypes: function and molecular characteristic. Vaccine 3785:1-12.
- Curtis, J., Bourne, F.J. 1971. Immunoglobulins quantitation in sow serum, colostrums milk, and serum of young pigs. Biochem. Biophys. Acta. 236: 319.
- Dalton, H.M. y March, P.E. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling, Curr Opin Biotechnol. 9(3): 252-255.
- Deisenhofer, J., Colman, P.M., Epp, O. y Huber, R. 1976. Crystallographic structural studies of a human Fc fragment. II. A complete model based on a Fourier map at 3.5 A resolution. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 357: 1421-1434.
- Dickinson, E. y Stainsby, G. 1982. The oil-water interface and emulsion stability, en: "Coloids in Foods". Applied Science Publishers, London.
- DiPaola, L., Marrelli,L., Maschietti, M., Milozzi, R. y Terranova, A.Solubility of casein in ammonium sulphate aqueous solutions. Proceedings of the IcheaP-6. The Sixth Italian Conference on Chemical and Proceess Engineering. www.aidic.it.html.

- DiVirgilio, S.N.A. 1998. High performance lectin affinity chromatography for fractionation and sequence determination of oligosaccharides. En: Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Volume 12. Eds Van Driessche, E., Beeckmans, S. y Bog-Hansen, T. http://plab.ku/tcbh/Lectins.
- Doyle, M.E. 2001. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. FRI Briefing. Abril:1.
- Drew, M.D. y Owen, B.D. 1988. The provision of passive immunity to colostrum-deprived piglets by bovine or porcine serum immunoglobulins. Can. J. Anim. Sci. 68: 1277-1284.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Duk, M., Ugorski, M. y Lisowska, E. 1997. (-Elimination of O-glycans from glycoproteins transferred to Immobilon P membranes: Method and some applications. Anal. Biochem. 253: 98-102.
- Dupjohann, J. 1999. A Technique for processing animal blood with particular emphasis on blood plasma recovery. Westfalia Separator Brochure. Germany.
- Ebina, T. 1996. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. Arch Virol Suppl.12:217-23.
- Ekström, B. y Jacobson, G. 1984. Differences in retention between small and large molecules in Ion Exchange Chromatography and Reverse Phase Chromatography. Anal. Biochem. 142: 134-139.
- Ellies, L., Ditto, D., Levy, G.G., Wahrenbrock, M., Ginsburg,D., Varki, A., Le,D. y Marth, D.2002.Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands. PNAS 99: 10042-10047.
- Engfer, M.B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G y Hannelore, D. 2000. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract.American Journal of Clinical Nutrition. 71(6): 1589-1596.
- Er-el, Z., Zaidenzaing, Y. y Shaltiel, S. 1972. Hydrocarbon coated sepharoses. Use in purification of glycogen phosphorilase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49: 383-390.
- Erickson, A.K., Baker, D.R., Bosworth, B.T., Casey, T.A., Benfield, D.A. y Francis, D.H. Characterization of porcine intestinal receptor for the K88ac Fimbrial Adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins. Infec. Immun. 62: 5404-5410.
- Eshdat, Y. y Sharon, N. 1984. Recognitory bacterial surface lectin which mediate its mannose specific adherence to eukariotic cells. Biol. Cell 51: 259-266.
- Evans, M., Waxler, G. y Newman, J. 1986. Prevalence of K88, K99 and 987p pili of *Escherichia coli* in neonatal pigs with enteric colibacillosis. Am. J. Vet. Res. 47: 2431-2434.
- Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K y Plückthun, A.2002. Biophysical Properties of Camelid VHH Domains Compared to Those of Human VH3 Domains. Biochemistry. 41: 3628-3636.
- Fahey, J.L., McKelvey, E.M. 1965. Quantitative determination of serum Ig's in antibody agar plates. J. Immunol. 94: 84-90.
- Falk, P.K., Roth, A., Boren, T., Westblom, T.U., Gorden, J.I. y Normark, S. An *in*

vitro adherence assay reveals that Helicobacter pylori exhibits cell-linage specific tropism in the human gastric epithelium. Proc. Nstl. Acad. Sci. USA. 90: 2035-2039.

- FAO, 2000. Slaughterhouses. Problems and potential impacts. http://www.fao.org/lead/toolbox/indust/indslau.htm
- Fascina, G. 2000. Protein A mimetic (PAM) affinity chromatography. Immunoglobulins purification. Methods Mol Biol 2000;147:57 –68.
- Fausnaugh, J.L. y Regnier, F.E. 1986. Solute and movile phase contributions to retention in hidrophobic interaction chromatography of proteins. J. Chromatogr. 359: 131-146.
- Ferris, K.E. y Thomás, L.A. 1995. *Salmonella* serotypes from animals and related sources reported during July 1993-june 1994. Pig News and Information 16(4): 358.
- Finlay, B.B., Heffron, F. y Falkow, S. 1989. Epithelial cell surfaces induce Salmonella proteins required for bacterial adherence and invasion. Science 243: 940-943.
- Firon, N., Okef, I. y Sharon, N. 1983. Interaction of mannose-containing oligosacharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105: 1426-1432.
- Firon, N., Okef, I. y Sharon, N. 1983. Carbohydrate specificity of the surface lectin of Escherichia *coli*, Klebsiella *pneuminiae* and *Salmonella typhimurium*. Carbohydr. Res. 120: 235-249.
- Fleenor, W.A. y Stott, G.H. 1981. Single radial immunodiffusion for quantitation of colostral immunoglobulins concentration. J Dairy Sci. 64: 740-747.
- Forsgren, A. y Sjoquist, J.1966. Protein A from *S. aureus*: I. Pseudo-immune reaction with human immunoglobulin. J Immunol. 97:822– 7.
- Foster, P.R. 1994. Blood plasma fractionation. En: TheKirk-Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology, 4th edn, Wiley, New York. Vol. 11, 990–1021.
- Francis, D.H., Grange, P.A., Zeman, D.H., Baker, D.R., Sun, R. y Erickson, A.K. 1998. Expression of Mucin-Type Glycoprotein K88 Receptors Strongly Correlates with Piglet Susceptibility to K88+ Enterotoxigenic Escherichia *coli*, but Adhesion of This Bacterium to Brush Borders Does Not. Infect. Immu. 66: 4050-4055.
- Gatnau, R. y Zimmerman, D.R. 1990. Evaluation of different sources of protein for weanling pigs. Iowa State University Swine Report pp 14-15.
- Gatnau, R. y Zimmerman, D.R. 1991. Spray-dried porcine plasma (SDPP) as a source of protein for weanling pigs in two environments. J. Anim. Sci. 1 69 (Suppl.1): 103.
- Giannasca, K., Giannasca, P y Neutra, M. 1996.Adherence os Salmonella typhimurium to Caco-2 cells: Identification of a glycoconjugate receptor. Infec. Immun. 64(1): 135-145.
- Gómez, G.G. 1997. The colostrums-deprived, artificially-reared, neonatal pig as a model animal for studying rotavirus gastroenteritis. Frontiers in Bioscience 2: 471-481.
- Gómez, G.G., Phillips, O. y Goforth, R.A. 1998. Effect of Immunoglobulin Source on survival, growth and hematological and immunological variables in pigs. J. Anim. Sci. 76: 1-7.

- Goodswaard, J., van der Dank, J.A., Noardizij, A., van Dam, R.H., Vaerman, J.P. 1978. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. Scand J Immunol 8:21 – 8.
- Grange, P. A., Erickson, A. K., Anderson, T. J., Francis, D. H. (1998). Characterization of the Carbohydrate Moiety of Intestinal Mucin-Type Sialoglycoprotein Receptors for the K88ac Fimbrial Adhesin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 66: 1613-1621.
- Grange, P. A., Erickson, A. K., Levery, S. B., Francis, D. H. (1999). Identification of an Intestinal Neutral Glycosphingolipid as a Phenotype-Specific Receptor for the K88ad Fimbrial Adhesin of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 67: 165-172
- Grange, P.A. , Mouricout, M. A. , Levery, S. B. Francis, D. H. y Erickson, A. K.2002.Evaluation of Receptor Binding Specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) Fimbrial Adhesin Variants Using Porcine Serum Transferrin and Glycosphingolipids as Model. Receptors. Infection and Immunity. 70(5): 2336-2343.
- Grund, E. 1998. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. Biosep. Bioprocess. 1: 65-88.
- Guarino, A., Canani, R.B., Russo, S., Albano, F., Canani, M.B., Ruggeri, F.M., Donelli, G. y Rubino, A.1994. Oral immunoglobulins for treatment of acute rotaviral gastroenteritis. Pediatrics.93:12-6.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, Y. y Tschäpe, H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23(6): 1089-1097
- Hahn, R., Deinhofer, K., Machold, C. y Jungbauer, A.2003. Hydrophobic interaction chromatography of proteins II. Binding capacity, recovery and máss transfer properties.
- Haidacher, D., Vailaya, A y Horváth C. 1996. Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2290-2295.
- Hale, J. E.y Beidler. D.E.1994. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. Anal. Biochem 222: 29-33.
- Hall, R.L., Miller, R.J., Peatfield, A.C., Richardson, P.S., Williams, I. y Lampert, I. 1980. A colorimetric assay for mucus glycoproteins using alcian blue. Biochem. Soc. Trans. 8: 72.
- Hall, G. M.1996. Solubility in Methods to testing protein functionality. Chapman and Hall 2-6 Boindary Row, London. Pp 10-56.
- Hall, W. 1989. A review of colibacillosis in neonatal swine. Veterinary Medicine. 4: 428-431.
- Halling, P.J.1981. Protein-satbilized foams and emulsions. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 13: 155-203.
- Halperin, G., Breintenbach, M., Tauber-Finkelstein, M. y Shaltiel, S. 1981. Hidrophobic chromatography on homologous series of alkyl agaroses. A comparison of charged and electrically neutral column materials. J. Chromatography 215: 211-228.
- Hampson, D.J. 1994. Postweaning *Escherichia coli* diarrhea in pigs. En: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. : C.L. Gyles (ed.), CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 171-191.

- Hansen, J.A., Nelssen, J.L., Goodband, R.D., Weeden, T.L. 1993. Evaluation of animal protein supplements in diets of early-weaned pigs. Journal of Animal Science 71: 1853-1862.
- Haque, N. 1997. Acetylation of Corsican pine sap wood. http://www.Geocites.com/Research triangle/Lab/2810/cmod2.html.
- Heithoff, D.M., Conner, C.P. y Mahan, M.J. 1997. Dissecting the biology of a pathogen during infection. Trends Microbiol. 12: 509-513.
- Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C. K., and Kornfeld, S. (1972) The structure of the glycopeptides of a human M-immunoglobulin *J. Biol. Chem.* 247, 2156-2163
- Hickman, S. y Kornfeld, S. 1978. Effect of tunicamycin on IgM, IgA and IgG secretion by mouse plasmacytoma cells. J. Immunol. 121: 990-996.
- Hidiroglou, M., Batra, T.R. y Nielsen, K.H. 1992. Effect of vitamin E supplementation and of health status of mammary gland on immunoglobulins concentration in milk of dairy cows. Ann. Rech. Vet. 23: 139-146.
- Hill, S.E. 1996. Emulsions en: Methods of testing protein functionality. Hall, G.M. (ed). London: Blackie Academic and Professional. p 153-183.
- Hilpert, H., Brussow, H., Mietens, C., Sidot,i J., Lerner, L. y Werchau, H.1987. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. J Infect Dis. 156:158-66.
- Hjertén, S., Rosengren, J. y Palman, S. 1974. Hydrophobic interaction chromatography. The syntesis and the use of some alkyl and aryl derivates of agarose. J. Chromatogr. 101: 281-288.
- Hjertén, S. 1977. Fractionation of proteins by hydrophobic interaction chromatography, with reference to serum proteins. Proceedings Intl. Workshop on Technology for Protein Separation & Improvement of Blood Plasma Fractionation. Reston, Virginia, 1977, 410–421.
- Hickman,S., Kornfeld, R., Osterland,K. Y Kornfeld, S. 1972. The Structure of the Glycopeptides of a Human M-Immunoglobulin. JBC. 7(10): 2156-2163
- Hofstee, B.H.J. 1973. A hydrophobic affinity chromatography of proteins. Anal. Biochem. 52: 430-448.
- Hog, A. y Torres, A. 1997. Enteric diseases of swine. University of Nebraska Report. G85-747-A.
- Holland, M., Jefferis, R., *et al.* (2002) Hypogalactosylation of serum IgG in patients with ANCA-associated systemic vasculitis. Clin.exp.Immunol. 129:183-190.
- Horton, 1995. Commercial utilization of minor milk components in the health and food industries. J Dairy Sci. 78: 2584-2589.
- Hrkal, Z. y Rejnková, L. 1982. Hydrophobic interaction chromatography pf serum proteins on phenyl-Sepharose CL-4B. J. Chromatogr. 242: 385-388.
- Hu, A.C. y Shelef, L.A. 1996. Influence of fat content and preservatives on the behavior of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage. J Food Safety 16:175-181.
- Hultren, S.L., Normark, S. y Abram, S.N. 1991. Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pilli. Annu Rev of Microbiol. 45: 383-415.
- Hurley, W.L y Bryson, J.M. 1999. Enhancing sow productivity through an underestanding of mammary gland biology and lactation physiology. PigsNew information 4: 125N-130N.
- Hurley, W. L. 2002. The neonate and colostrum.

http:// classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/neonatecolostrum.htmL.

- Huse, K., Böhme, H-J. y Scholz, G.H 2002. Purification of antibodies by affinity chromatography. J. Biochem. Biophys. Methods 51 : 217–231.
- INEGI. 1997. La Porcicultura en el Estado de Sonora. Instituto Nacional de Geografía Estadística e Informática. Pp 4-56.
- Ishibashi, M., Tokunaga, H., Arakawa, T. y Tokunaga, M. 2001. Expression, purification, and characterization of the active immunoglobulin-like domain of human granulocyte-colony-stimulating factor receptor in Escherichia coli. Protein Expression Purif.21:317 –22.
- Izar, M., Nuchamowitz, Y. y Mirelman, D. 1982. Adherence of Shigella *flexneri* to ginea pig intestinal cells is mediated by a mucosal adhesin. Infect. Immun. 35: 110-118.
- Jaffe, W.G. 1980. Hemmagglutinins (lectins) en: Toxic constituents of plant foodstuffs. Liener, I.E. ed. Academic Press, London, UK. Pp 73-98.
- Janeway, C; Travers, P; Walport, M. y Capra, J.1999.The introduction, measurement and manipulation of the immune response. En: Immunobiology. Elsevier Science. Fourth edition. Pp 44-45.
- Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y., Arata, Y. y Takahashi, N. 1990. A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins. Biochem J. 268: 529-537.
- Jefferis, R., Cranmer, S., Arata, Y. y Takahashi, N. 1999. Glycosylation heterogeneity in human IgG subclass proteins. Biochem Soc Trans. 16: 340-341.
- Jennissen, H.P.1978. Multivalent interaction chromatography as exemplified by the adsorption and desorption of skeletal muscle enzymes on hydrophobic alkyl-ligands. J. Chromatog. 159: 71–83.
- Jennissen, H.P. 2000. Hydrophobic interaction chromatography: the critical hydrophobicity approach. International Journal of Biochromatography. 5:131-163.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N. y Jalaludin, S. 1996. Effect of adherent *Lactobacillus* spp. on *in vitro* adherence of salmonellae to the intestinal epithelial cells of chicken. J. Appl. Bacteriol. 81: 201-206.
- Jin, L.Z., Baidoo, S.K., Marquardt, R.R. y Frohlich, A.A. 1998. *In vitro* inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 21: 313-322.
- Jin, L.Z., Marquardt, R.R. y Zhao, X. 2000. A Strain of *Enterococcus faecium* (18C23) Inhibits Adhesion of Enterotoxigenic Escherichia *coli* K88 to Porcine Small Intestine Mucus. Appl. Environ. Microbiology 66(10): 4200-4204.
- Kats, L.J., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Goodband, R.D., Hansen, J.A. y Laurin, J.L. 1994. The effect of spray-dried porcine plasma on growth performance in the early-weaned pig. Journal of Animal Science 72: 2075-2081.
- Kilara, A. y Sharkasi, T.Y. 1986. Effect of temperature on food proteins and its implications on functional propierties. CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 23: 323-395.
- Kinsella, J.E. 1992. Relationships between structure and functional propierties of food proteins. In Food Proteins, Fox, P.F. and London, J.J. (Eds) Elsevier Applied Science, London. Pp 51-103.
- Kliegman, M.D. y Clapp, D.W. 1991. Rational principles for immunoglobulin prophylaxis and therapy of neonatal infections. Clinics in Perinatology. 18: 303-321.

- Kornhuber, B. 1984. Virale und bakteriell infektionen prophylaxe und terapie mit immunoglobulinen. En: Patient infecktion immunoglobulins. Springer Verlag. Berlin pp 1-2
- LaemmLi, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lamm, M.E. 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. Annu Rev. Microbiol. 51: 311-340.
- Lazo, P.L., Llorens, B.F., González, G.J., Valdés, M.R., Maroto, M.L., Ruiz, A.G. y Martínez, R.A. 1999. Caracterización sanitaria de la salmonelosis porcina en un territorio de la República de Cuba. http://www.iicasaninet.net/pub/sanani/pdf/salmonelosis.pdf
- Lecce, J.G., Morgan, D.O. 1962. Effect of dietary regimen on cessation of intestinal absorption of large molecules (closure) in the neonatal pig and lamb. J. Nutr. 78: 263-268.
- Lecce, J.G., 1966. Absorption of macromolecules by neonatal intestine. Biol. Neonat. 9: 50-61.
- Lee, C.C., Love, J.A. y Johnson, L.A. Sensory and Physical properties of cakes with bovine products substituted for eggs. Cereal Chem. 70(1): 18-21.
- Lee, C. K., Kim, E. J. Y Jun, J.H. 1999.Determination of relative reactivities of free hydroxyl groups in b-cyclodextrin, amylose and cellulose by reductive-cleavage method. Bull. Korean Chem. Soc. 20 (10): 1153-1158.
- Lefort, S. y Ferrara, P. 1986. Hydrophobic adsorbents for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures. J. Chromatogr. 361: 209-216.
- Lehto, E.M., y Salminen, S.J. 1997. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect?. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18: 125-132.
- Li-Chan, E y Kummer, A. 1997 Influence os standards ans antibodies in immunochemical assays for quantitation of IgG in bovine milk. J Dairy Sci. 80: 1038-1046.
- Lihme, A. y Hansen, M.B. 1997. Protein A mimetic for large scale monoclonal antibody purification. Am. Biotechnol. Lab.15:30 – 2.
- Longhi, C., Conte, M.P., Seganti, L., Polidoro, M., Alfsen, A. y Valenti, P. 1993. Influence of lactoferrin on the entry process of *Escherichia coli* HB101 in HeLa cells. Med. Microbiol. Immunol. 182: 25-35.
- López, E.C. y Rivera, C. 1981. Estudio del secado por aspersión de la mása celular y plasma de sangre bovino. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana de Orizaba, México.
- Lucas, B. y Sotelo, A. 1980. Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on thryptophan determination of pure proteins and foods. Anal Biochem. 109: 192-197. L.
- Lucas, B. y Sotelo, A. 1982. Amino acid determination in pure protein, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods. Anal. Biochem. 123: 349-356.
- Lund, J., Tanaka, T. y Takahashi, N. 1990. A protein structural change in aglycosylated IgG_3 correlates with loss of huFc gamma R1 and huFc gamma R111 binding and/or activation. Mol Immunol. 27: 1145-1153.

- Mahan, D. 2001. La nutrición de cerdos destetados y programás prácticos de alimentación para las diferentes edades de destete. Porcicultura. http://www.porcicultura.com
- Maisano, F., Belew, M. y Porath, J.1985. Synthesis of new hydrophobic adsorbents based on homologous series of uncharged alkyl sulphide agarose derivatives. J Chromatogr.321:305 – 17.
- Mathew, A.G., Jackson. F. y Saxton, A.M.2002. Effects of antibiotic regimens on resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* serovar *Typhimurium* in swine. J Swine Health Prod. 10(1):7-13.
- Matsuda, H., Nakamura, S., Ichikawa, Y., Kozai, K., Takano, R., Nose, M., Endo, S., Nishimura, Y. y Arata, Y. 1990. Proton nuclear magnetic resonance studies of the structure of the Fc fragment of human immunoglobulin G1: comparisons of native and recombinant proteins. Mol Immunol. 27: 571-579.
- Mattu, T. S., Pleass, R. J., Willis, A. C., Kilian, M., Wormald, M. R., Lellouch, A. C., Rudd, P. M., Woof, J. M. y Dwek, R. A. 1998.The Glycosylation and Structure of Human Serum IgA1, Fab, and Fc Regions and the Role of N-Glycosylation on Fcalpha Receptor Interactions.J. Biol. Chem. 273(4): 2260 - 2272.
- McCallum, I.M., Elliot, J.I., Owen, B.D. 1977. Survival of colostrums-deprived neonatal piglets fed gamma-globulins. Can. J Anim. Sci. 57: 151-158.
- Medel, P., Latorre, A.M. y Mateos, G.G. 1998. Nutrición y alimentación de lechones destetados precozmente. XIV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. UVESA Navarra.
- Melander, W.Y., Horváth, C. 1977. Salt effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series. Arch. Biochem. Byophys. 183: 200-215.
- Meng, Q., Kerley, M.S., Russel, T.J. y Allee, G.L. 1998. Lectin-like activity of Escherichia *coli* K88, *Salmonella choleraesuis* and *Bifidobacteria pseudolongum* of porcine gastrointestinal origin.
- Metcalfe, J.K., Krogfeit, H., Krivan, P. y Laux, D. 1991. Characterization and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the K88 fimbrial adhesin. Infect. Immun. 51: 91-96.
- Miller, R.S., y Hoskins, L.C. 1981. Mucin degradation in human colon ecosystems. Fecal population densities of mucin-degrading bacteria estimated by a "most probable number" method. Gastroenterology. 81: 759-765.
- Mitra, A.K., Mahalanabis, D., Ashraf, H., Unicomb, L., Eeckels, R. y Tzipori, S. 1995. Hyperimmune cow colostrum reduces diarrhoea due to rotavirus: a double-blind, controlled clinical trial. Acta Paediatr. 84:996-1001.
- Moir, C.J. y Eyles, M.J. 1992 Inhibition, injury, and inactivation of four psychrotrophic foodborne bacteria by the preservatives methyl p-hydroxybenzoate and potassium sorbate. J Food Protect. 55:360-366.
- Moon, H.W. y Bunn, T.O. 1993. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* in farm animal. Vaccine. 11: 213-220.
- Morgan, K.L, Bourne, F.J., Newby, R. J. y Bradley. 1981. Humoral factors in the secretory immune systems of rumiants. En: The rumiant immune system. J.E. Buttler, ed. Plenum Press, New York, N,Y. pp391-392

- Morr, C.V. y Ha, E.Y.W. 1993. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional propierties. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 33: 431- 476.
- Mota, R.D. 1998. Diarreas en lechones, su fisiología y terapéutica. Porcicultores. 1(2): 4-8.
- Neto, R.M., Packer, I.U., Menten, J.F. y Lavorenti, A.2001. Effect of breed, diet, period and lactation numbers on immunoglobulin G concentration in swine colostrum. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 36 (10): 1295-1299.
- Niv, Y. 2000. Mucin and Colorectal Cancer. IMAJ. 2: 775-777.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-002-ECOL-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemás de alcantarillado urbano y municipal. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación 24 de diciembre de 1996.
- Norman, L. M y Hohenboken, W.D. 1981. Genetic differences in concentration of milk immunoglobulins G1 and M in serum and colostrum of cows and in serum of neonatal calves. J Dairy Sci 53(6): 1465-1472.
- Ockerman, H.W. y Hansen, C.L. 2000. "Blood utilization" in Animal by- product processing and utilization Technomic Publishing Co. USA. pp 325-354.
- Ohbayashi, H., Endo, T., Mihaesco, E., Gonzales, M. G., Kochibe, N., and Kobata, A. (1989) Structural studies of the asparagine-linked sugar chains of two immunoglobulin M's purified from a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 463-475.
- Oscarsson S, Porath J.1989.Covalent chromatography and salt-promoted thiophilic adsorption. Anal Biochem. 176:330 –337.
- Oshodi, A.A. y Ekpering M.M. 1989. Functional propierties of pigeon pea (Cajanus cajan) fluor. Food Chem. 74: 187-191.
- Owen, B.D., Bell, J.M., Williams y Oakes, R.G. 1961. Effects of porcine immunoglobulin administration on the survival and serum protein composition of colostrums-deprived piglets reared in a non-isolated environment. Can. J. Anim. Sci. 41: 236-252.
- Owen, B.D., Bell, J.M. 1964. Further studies of survival and serum protein composition in colostrums deprived pigs reared in a non-isolated environment. Can. J. Anim. Sci. 441-7.
- Owen, K.Q., Nelssen, J.L., Goodband, R.D., Tokach, R., Friesen, B.T., Richert, B.T., Smith, J.W. II y Russell, L.E. 1995. Effects of various fractions of spray-dried porcine plasma on performance of early weaned pigs. J. Anim. Sci. 73 (Suppl.1): 81.
- Pastoret, P.P., Griebel, P., Bazin, H. y Govaerts, A. 1998. Immunology of the pig en Hanbook of vertebrate immunology. Academic Press USA. 373-419.
- Paulson, J.C. and Colley, K.J. (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. J. Biol. Chem. 264: 17615-17618.
- Payne, D., O'Reilly, M. y Williamson, D. 1993. The K88 fimbrial adhesin of enterotoxigenic E. *coli* binds to (1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids. Infect. Immun. 61: 3673-3677.
- Pearce, K.N. y Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying propierties of proteins. Evaluation of a turbidimetric technique. J. Agri. Food Chem. 26: 716-723.
- Pérez, D. y Calvo, M. 1995. Interaction of α-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein. A review. J.

Dairy Sci. 78: 978-988.

- Pérez-Espejo, R. 2000. Porcicultura intensiva y medio ambiente en México, Instituto de Investigaciones Económicas, Universidad Nacional Autónoma de México. FAO http://www.fao.org/docrep/x1700t/x1700t03.htm
- Pérez-Villar, J. Y Hill, R.J. 1999.The strucutre and assambly of secreted mucins. The J. of Biol. Chem. 274(5): 31-751-31754.
- Pharmacia.2000.Antibody Purification Handbook. Amersham Pharmacia Biotech. Uppsala, Sweden. Pp 93.
- Pierce J.L., Cromwell, G.L., and Lindemann, M.D. y Coffey, R.D. 1995. Assessment of three fractions spray-dried porcine plasma on performance of early-weaned pigs. Journal of Animal Science 73(Suppl. 1): 81.
- Porath, J., Sundberg, L., Fornstedt, N., Olson, I. 1973. Salting Out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. Nature 245: 465-466.
- Porath, J., Maisano, F. y Belew, M.1985. Thiophilic adsorption-a new method for protein fractionation. FEBS Lett.185:306 – 10.
- Porath, J., 1986. Salt promoted adsorption: recent developments J. Chromatog 376: 331-341.
- Porter, P. 1969. Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet. Biochem Biophys Acta 181: 381-392.
- Pour-El, A. 1981. Protein functionality: clasification, definition and methodology. In: Protein functionality in Foods. Cherry, J.P. (Ed.). American Chemical Society Symposium Series 147. Washington D.C. pp 1-20.
- Pritcheir, L.C., Gay, O.C., Besser, T. E. y Hancock, D.D. 1991. Management and production factors influencing Immunoglobulin G1 concentrations in colostrum from Holstein Cows. J. Dairy Sci. 74: 2336-2341.
- Pusztai, A. and Bardocz, S. 1996. Biological Effects of Plant Lectins on the Gastrointestinal Tract: Metabolic Consequences and Applications. Trends Glycosci. Glycotechnol. 8: 149-165.
- Queiroz, J.A., Garcia, F.A.P. y Cabral, J.M.S. 1999. Purification of Chromobacterium viscosum lipase by hydrophobic interaction chromatography. Isolat. Purif. 3: 1-7.
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T. y Cabral J.M.S. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. J. of Biotech. 87: 143-159.
- Quinn, F.D., Newman, G.W. y King, C.H. 1997. In search of virulence factors of human bacterial disease, Trends Microbiol. 5(1): 20-26.
- Quiroz-Rocha, G., Bouda, J., Medina-Cruz, M., Núñez-Ochoa, L. Y Yabuta, A. 1998. Impacto de la administración y la calidad del calostro en los niveles de inmunoglobulinas séricas de becerro. Vet. Mex. 29(2): 161-165.
- Rama Dao, MV. Krishnan, CK. 1975. Colorimetric estimation of tryptophan content pulses. J. Food Sci. Tech 11: 213-216.
- Radaev, S y Sun, P.D. 2001.Recognition of IgG by Fc (Receptor: The role of Fc glycosylation and the binding of peptide Inhibitors. J. Biol. Chem. 276 (19): 16478-16483.
- Rantanen, M., Smith, J., Richert, B., Friesen, K., Nelssen, J., Goodband, R., Tokach, M. y Russell, L. 1994. Influence of spray-dried plasma source on growth

performance of weanling pigs. J. Anim. Sci. 72 (Suppl.1): 166.

- Rapacz, J. y Hasler-Rapacz, J. 1986. Poymorphism and inheritance of swine small intestinal receptors mediating adhesion of three serological variants of *E. coli* producing K88 pillus antigen. Anim. Genet. 17: 305-321.
- Reid, G., Howard, J. y Siang Gan, B. 2001. Can bacterial interference prevent infection? Trends in Microbiology 7: 424-428.
- Resler, M.A.1973. Diverting slaughter animal blood into human food supplay channels. Máster Thesis. Utah State University.
- Rice, D. y Rogers, D. 1990. Colostrums quality and absorption in baby calves. Institute of Agriculture and Natural Resources Nebraska University Report G90-987-A. pp 1-5.
- Robach, M.C. y Sofos, J.N. 1982. Use of sorbates in meat products, fresh poultry and poultry products: A review. J Food Protection 45: 374-378.
- Roberts, J.A., Marklund, B.I., Ilver, D., Haslam, D., Kaack, M. B., Baskin, G., Louis, M.M., Mollby, R., Winberg, J. y Normark, S. 1994. The gal (αl-4) galspecific tip adhesin of *E. coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11889-11893.
- Roppa, L. 2002. Nutrición de los lechones en la fase de destete. Porcicultura. http://www.porcicultura.com
- Roos, N., Mahé, S., Benamouzing, R., Sick, H. y Rautereau, J. 1995. 15N-labeled immunoglobulins from bovine colostrums are partially resistant to digestion in human intestine. J. Nutr. 125: 1238-1244.
- Roos, S. 1989. Purification based on hydrophobicity. En: Protein purification methods. A practical approach. Harris, E.L.V. y Angal, S.E. eds. IRL Press, Oxford. Pp 221-232.
- Rostand, K. y Esko, J.D. 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. Infection and Immunity. P 1-8.
- Royle, L., Roos, A., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Van Gijlswijk-Janssen, D. M., Redwan, E.-R., Wilson, I. A., Daha, M. R., Dwek, R. A. y Rudd, P. M.2003.Secretory IgA N- and O-Glycans Provide a Link between the Innate and Adaptive Immune Systems. J. Biol. Chem., 278(22): 20140 - 20153.
- Ruhl, S., Sandberg, A.L., Cole, M.F. y Cisar, J.O. 1996. Recognition of Immunoglobulin A by oral Actinomyces and Streptococcal lectins. Infect. Immun. 64: 5421-5424.
- SAGAR. 2000. Departamento de certificación de cerdo seguro. SAGAR. Hermosillo, Sonora.
- Salazar, G.G., Cuarón, I.J. 1994. Memorias del Taller Regional de Subproductos Animales. Capítulo 8: Uso de los Desechos de Origen Animal en México. FAO, Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP) Cuba. La Habana, Cuba. http://www.fao.org/livestock/agap/frg/aph134/
- Sánchez, C., Bigeriego, P. y Domínguez, J. 1997. Los anticuerpos del cerdo. Porcicultura. 40: 73-90.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2000. Curso de introducción a la inmunología porcina. http:/www.3tres3.com/cuatro3.htm
- Scoot, A., Owen, B.D., Agar, and J.L. 1972. Influence of orally administered porcine

immunoglobulins on survival and performance of newborn colostrums-deprived pigs. J. Ani Sci. 35: 1201-1205.

- Schorten, H., Stapper, C., Plogmann, R., Köhler, H., Hacker, J. y Hanisch, F.G. 1998. Fab-independent antiadhesion effects of secretory immunoglobulin A on S-fimbriated *Escherichia coli* are mediated by siakyloligosacharides. Infect. Immun 66: 3971-3973.
- Selk, G.1999. Disease protection of baby calves. Extension facts # F-3358.Oklahoma Cooperative Extension Service.Division of Agricultural Sciences and Natural Resources.pp 1-6.
- Shaltiel, S. y Er-el, Z. 1973. Hydrophobic chromatography. Use for purification of glycogen synthetasa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 778-781.
- Shimizu, A., Watanabe, S., Yakamura, Y. y Putnam, F.1974.Tryptic digestión of IgM in Urea. Immunochemistry 2: 719-727.
- Skea, D.L., Christopoulus, F., Plaut, A.g., Underdown, B.J. 1988. Studies on the specificity of the IgA-binding lectin, Jacalin. Mol Immunol. 25(1): 1-6.
- Smith, H. 1998. What happens to bacterial pathogens in vivo?. Trends Microbiol. 6(6): 239-243.
- Smith, J.W., Richter, J.L., Nelseen, R.D., Goodband, R.D. y Tokack, M.D. 1994. The effect of spray-dried plasma source on starter pig performance. Kansas State University Swine Day. P 96-98.
- Sofer, G.K. y Hagel, L. 1997. Handbook of process chromatography: A guide to optimization, scale-up and validation. Academic Press. London.pp 290-316.
- Srinivasan, R., Ruckenstein, E.1980. Role of physical forces in hydrophobic interaction chromatography. Separation & Purification Methods 9: 267-370.
- Stephan, W., Dichelmuller, H. y Lissner, R.1990. Antibodies from colostrum in oral immunoteraphy. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 28: 19-23.
- Stoscheck, M.C.1990. Quantitation of protein en: Guide to protein purification. Methods in enzymology. Volumen 182. Abelson, J y Simon, M eds.Academic Press. U.S.p 55.
- Sumar, N., Bodman, K.B., Rademacher, T.W., Dwek, R.A., Williams, P., Parekh, R.B., Edge, J., Rook, G.A.W., Isenberg, D.A., Hay, F.C. y Roitt, I.M. 1990. Analysis of glycososylation changes in IgG using lectins. J of Immunological Methods. 127-136.
- Sun, R., Anderson, T. J., Erickson, A. K., Nelson, E. A., Francis, D. H. (2000). Inhibition of Adhesion of Escherichia coli K88ac Fimbria to Its Receptor, Intestinal Mucin-Type Glycoproteins, by a Monoclonal Antibody Directed against a Variable Domain of the Fimbria. *Infect. Immun.* 68: 3509-3515.
- Tacket, C.O., Losonsky, G., Link, H., Hoang, Y., Guersey, P., Hilpert, H. y Levine, M.M. 1988. Protection by milk immunoglobulins concentrate against oral challenge with enterotoxigenic E. coli. New Engl. J. 318: 1240-1243.
- Tejeda, A., Montesinos, R.M y Guzmán, R.1995. Bioseparaciones.Editorial UNISON. México. Pp 419-490.

- Teraguchi, S., Shin, K., Fukuwatari, Y. y Shemamura, S. 1996. Glycans of bovine lactoferrin function as receptors for the type I fimbial lectin *E. coli*. Infect. Immun. 64: 1075-1077.
- Tettamanti, G., and Pigman, W. 1968 Purification and Characterization of Bovine and Ovine Submaxillary Mucins. Arch Biochem Biophys.*124*: 41-56.
- Thomssin, A.K., Karlsson, N.G. y Hansson, G. 1999. Liquid chromatography electrospray mass spectrometry as a tool for the analysis of oligosacgharides from mucin glycoproteins.j. Chromatography A. 854: 131-139.
- Thulin, A.J. 1989. Manejo y nutrición de cerdos recién destetados para un comportamiento óptimo. Síntesis Porcina. 6: 8-9.
- Tiselius, A. 1948. Adsorption separation by salting out. Arkiv for Kemi, Mineralogi Geologi 26B: 1-5.
- Tizard, I.R.1996. Inmunidad en el feto y en el neonato en: Inmunología Veterinaria. McGraw Hill-Interamericana. México pp 259-269.
- To, E.C. y Robach, M.C. 1980. Potassium sorbate dip as a method of extending shelf life and inhibiting the growth of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* on fresh, whole broilers. Poultry Sci 59: 726-730.
- Todar, K. 1998. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. Bacteriology at UW-Madison. 1-16.
- Touchette, K.J., Alle, G.L., Newcomb, M.D., Pace, L.W. y Ellersieck, M.R. 1997. Impact of feed intake and spray died plasma on nursery performance and intestinal morphology of weaned pigs. J. Anim. Sci. 75 (Suppl. 1): 198 (Abstr.).
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
- Turner, R.B.y Kelsey, D.K. 1993. Passive immunization for prevention of rotavirus illness in healthy infants. Pediatr Infect Dis J. 12:718-22.
- USDA. 1991. National swine survey: morbidity/mortality and health management of swine in the United States. USDA: APHIS: VS: National Animal Health Monitoring System. Fort Collins, Colorado, USA.
- Utrera, T.U. 2003. Papel de la estabilización de la inmunidad del plantel de cría en el control de las enfermedades del cerdo. Porcicultura. http://www.porcicultura.com
- Van Der Peet-Schwering, C.M.C. y Binnendijk, G.P. 1995. The effect of spray-dried porcine plasma in diets with different protein sources on the performance of weanling piglets. Applied Research in Pig Husbandry, Rosmalen. Research Report P 1. 137.
- Van Der Peet-Schwering, C.M.C. y Binnendijk, G.P. 1997. Spray-dried blood plasma and spray dried blood cells in diets of weaned piglets. Applied Research in Pig Husbandry, Rosmalen. Research report P 5.2. 1997.
- Van Oss, C.J., Good, R.J. y Chaudhury, M.K. 1986. Nature of the antigen-antibody interactions. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. J. Chromatogr. 376: 111-119.
- Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F.y Monecke, M. 1999. Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. Proc Natl Acad Sci U S A.96:11128–33.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.

Glycobiology. 3: 97-130.

- Vázquez Moreno, L., Porath, J., Schluter, S.F. y Marcalonis, J.J. 1992. Purification of a novel heterodimer from shark (Carcharhinus plumbeus) serum by gel-immobilized metal chromatography. Com. Biochem. Physiol 103B (3): 563-568.
- Vázquez-Moreno, L y Candia-Plata, M.C.1996.Scale up of immunoglobulins from pig serum by immobilized metal affinity chromatography. J Food Bioche. 19: 367-380.
- Vázquez-Moreno, L., Ortega Nieblas, M., Robles-Burgueño, M.R y Ramos-Clamont, M.G. 2000. Purification of complez carbohydrates specific lectins from Olneya tesota sedes using tandem affinity chromatography. IJBC. 5(2): 83-90.
- Vega-Martínez, R. 2002. Purificación de inmunoglobulinas séricas porcinas por cromatografía de interacción hidrofóbica: comparación de dos matrices. Tesis licenciatura. Universidad de Sonora.
- Vijayalakshmi, M.A. 1998. Antibody purification methods. Appl Biochem Biotechnol 75:93– 102.
- Weaver, E.M., Russell, L.E., Drew, M.D. 1995. The effect of spray-dried animal plasma fractions on performance of newly weaned pigs. J. Anim. Sci. 73(Suppl. 1): 81.
- Westerman, R.B., Mills, K.W., Phillips, R.M., Forter, G.W. y Greenwood, J.M. 1988. Predominance of the ac variant in K88-positive *Escherichia coli* isolates from swine. J. Clin. Microbiol. 26: 149-150.
- Wilcock, B.P. y K.J. Schwartz. Salmonellosis. (1999). In: *Disease of Swine*, 8th edition. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire and D.J. Taylor, eds. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 570-583.
- Willemsen, P. y De Graaf, F.K. 1992. Age and serotype dependent binding of K88 fimbriae to porcine intestinal receptors. Microb. Pathog. 12: 367-375.
- Wilson, R.A. y Francis, D.H. 1986. Fimbriae and enterotoxins associated with E. *coli* serotypes isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. Am. J. Vet. Res. 47: 213-217.
- Winkelman, N.L. 1995. *E. coli* septicemia. Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota. 22: 59-60.
- Witte. W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. Science. 279: 996-997.
- Wizemann, T.H., Adamaou, J.E. y Lagermann, S. Adhesins as Targets for Vaccine Development. 1999. Emerg. Infec. Dis. 5(3): 395-403.
- Wold, A.E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T. y Svanborg-Eden, C. 1990. Secretory immunoglobulin A carries olisacharide receptors for *Escherichia coli* Type 1 fimbrial lectin. Infect. Immun. 58: 3073-3077.
- Wood, G. y Warnke, R. 1981. Suppression of endogenous avidin-binding in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. J. Histoche and Cytochem. 29: 1196-1204.
- Wray, C. y Woodward, M.T. 1997. *E. coli* infection in animals. En: *E. coli* mechanisms of virulence. Sussmann, M.J. ed. University of Cambridge, UK. Pp 48-84.
- Wu, S-L., Figueroa, A. y Karger, B.L. 1986. Protein conformational effects in hydrophobic interaction chromatography. J Cromatograph 371: 3-27.

- Wu, S.L. y Karger, B.L. 1996. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. En: High resolution separation and analysis of biological macromolecules, fundamentals. Karger, B.L., Hancock, W.S. Eds. Methods of Enzymology. Vol. 270. Academic Press Inc. London. Pp 27-47.
- Xu, Y. 2003. The effects of reaction conditions on acetylation of starch. IFT 2003.
- Young, C.R., Lewis, R.W., Landmann, W.A. and Dill C.W. 1973. Nutritive value of globin plasma protein fraction from bovine blood. Nut. Rep. Intl. 8: 211.
- Yazid, Z.2001. Dairy chemistry and physics. Http/:www.fsb.upm.htm
- Zachariou, M. y Hearn, M.T.W. 2000. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate absorbents. J Chromatogr A.890:95 – 116.
- Zimmerman, D.R. Porcine plasma proteins in diets of weaning pigs. Iowa State Research Reports. Pp 12-16. 1987.1989.