

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA Y MUCOSAL EN
LECHONES INMUNIZADOS PERINATALMENTE CON OVOALBÚMINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

VÍCTOR ALFONSO GARCÍA OSNAYA

Asesores:

QFB PhD Marco Antonio Vega López
MVZ MC Alejandro Vargas Sánchez

México, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Antonio Vega López por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y a su apoyo para lograr esta tesis.

A la Biol. María del Carmen Ramírez Estudillo, del laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular perteneciente al CINVESTAV, por su ayuda y apoyo técnico en la realización de las pruebas de laboratorio que se llevaron a cabo para obtener los resultados y análisis de los datos presentados en este trabajo.

Al M.V.Z. M.C. Alejandro Vargas Sánchez por su apoyo y ayuda en el trabajo experimental en las instalaciones del CEIEPP de la FMVZ además de sus recomendaciones y consejos.

A la M.V.Z. Mónica Sánchez Hernández por su apoyo y ayuda durante mi estancia en el CEIEPP.

A mi familia por su apoyo a lo largo de esta etapa en el viaje al que llamamos vida.

A todos las personas que conocí a largo de este trayecto que sean han vuelto compañeros y amigos a los cuales estimo en demasía.

A todos los profesores de la FMVZ y personas que me brindaron sus conocimientos para fortalecer mi formación académica.

A toda aquella persona que de alguna forma ayudo a que este trabajo fuera posible.

**ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE LLEVÓ ACABO GRACIAS AL
APOYO ECONÓMICO Y LA BECA APORTADA POR EL INSTITUTO DE
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL DISTRITO FEDERAL (ICyTDF) A TRAVES DEL
PROYECTO 323/09**

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. ANTECEDENTES.....	4
1.2. LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNITARIO.....	6
1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA INMUNIDAD PASIVA NATURAL.....	7
1.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA INMUNIDAD ACTIVA O ADAPTATIVA.....	8
1.3. EL SISTEMA INMUNITARIO MUCOSAL.....	10
1.4. INMUNIDAD NEONATAL.....	14
1.5. INMUNIDAD PERINATAL EN LAS MUCOSAS DE ANIMALES.....	15
1.6. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN MUCOSAS POR VACUNACIÓN.....	17
1.7. VACUNACIÓN A TEMPRANA EDAD.....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVO.....	23
4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	23
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
7. RESULTADOS.....	32
8. DISCUSIÓN.....	40
9. CONCLUSIONES.....	44
10. APÉNDICE.....	45
11. REFERENCIAS.....	46

RESUMEN

GARCÍA OSNAYA VÍCTOR ALFONSO. Análisis de la respuesta inmune sistémica y mucosal en lechones inmunizados perinatalmente con ovoalbúmina. QFB PhD Marco Antonio Vega López y MVZ MC Alejandro Vargas Sánchez.

El objetivo del experimento fue comparar las respuestas de IgG e IgA a nivel sistémico y en mucosas en lechones inmunizados con ovoalbumina (OVA) en la primera semana de vida. Se utilizaron dos grupos de cerdos sanos convencionales (Landrace x Yorkshire) provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el primero de 2 días de edad (2d) y el segundo de 7 días (7d). Cada grupo estuvo conformado por diez animales, siete de ellos experimentales y tres controles. El diseño consistió de tres inmunizaciones, con un intervalo de diez días entre cada una. Las primeras dos se aplicaron de manera subcutánea (SC), en la base de la oreja y la tercera fue por vía intranasal (IN). Se tomaron muestras de suero, fluido nasal, saliva y secreción vaginal (a las que eran hembras) a los 0, 10, 20, 27, 41 y 55 días post-inmunización (dpi). Las muestras se mantuvieron en congelación hasta el momento de ser utilizadas. Se empleó la técnica de ELISA cuantitativa para detectar anticuerpos específicos de cada muestra y se realizó un análisis estadístico (t Student). Los resultados fueron: la respuesta de IgG e IgA anti-OVA en suero apareció hasta después de la segunda inmunización. El grupo de 7d tuvo una significativa mayor ($P < 0.001$) en contra del grupo de 2d para IgA a partir de los 20 dpi. En las mucosas los niveles mostraron una tendencia que indicó mayor

respuesta en el grupo de 7d, aunque sin alcanzar significancia estadística consistente. Se concluyó que los lechones son capaces de montar respuesta inmune sérica a la inmunización dependiendo de la edad, siendo mejor la respuesta en animales de 7d que en los de 2d.

1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas han resultado ser una herramienta muy efectiva para la prevención de enfermedades en cualquier especie animal. Su valor radica en la activación del sistema inmune en contra de un antígeno específico (1).

La respuesta que genera el sistema inmune luego de la aplicación de una vacuna puede ser sistémica, mucosal (local) o ambas. Una característica que se desea después de la vacunación es promover una respuesta eficiente a nivel sistémico y local, lo que depende inicialmente de la vía de inmunización, porque la inmunización directa en las mucosas, como la oral o nasal, generalmente induce tolerancia, mientras que la vía intramuscular, que es la más difundida en vacunas de uso veterinario, favorece solo a la respuesta sistémica, y otras vías, como la transcutánea (TC) y subcutánea (SC), generan ambas respuestas pero tienen una inclinación hacia la respuesta sistémica (1, 2, 3).

La respuesta inmune local es importante porque es donde suele ocurrir el primer contacto con los patógenos, por lo que sería deseable activar los mecanismos de defensa específicos en mucosas, por medio de la vacunación, para evitar la infección (2, 3, 4). Por tal motivo se han estudiado protocolos de vacunación para generar respuesta a nivel sistémico y local, principalmente en las vías aéreas. Ya que el protocolo de inmunización más efectivo en cerdos destetados, fue el mixto, esto es, SC/SC/intranasal (IN) (2).

La mayoría de los estudios acerca de la respuesta inmune en mucosas, después de una inmunización o vacunación, son en animales que tienen su

sistema inmune desarrollado, por lo que son poco los datos existentes sobre la respuesta a nivel mucosas con una inmunización perinatal, ya que tradicionalmente se dice que un animal de esa edad no responde efectivamente a la vacunación debido al poco desarrollo de sus sistema inmune y solo los mecanismos inespecíficos de defensa y los anticuerpos proporcionados por la lactancia, confieren la protección efectiva contra los patógenos ambientales (1), aunque solo protegen contra aquellos con los que tuvo contacto la madre gestante (1). Si se tiene en cuenta que el primer sitio de contacto de los patógenos con el animal son las mucosas, se necesita saber que ocurre con la inmunidad específica (anticuerpos) local en el periodo perinatal y si es posible activarla por medio de la inmunización, ya que esto ayudaría a generar esquemas de vacunación que se puedan utilizar antes de la etapa de destete, que en animales de producción, viene acompañado del inicio del calendario de vacunación lo que aumenta el estrés de la etapa.

1.1. ANTECEDENTES

México contaba en el 2009 con 979,348 unidades de producción de ganado porcino, con la existencia de 9, 021,129 cabezas (5) y una producción superior a 956 mil toneladas de carne de porcino reportada en 2010 (6), ubicando a la porcicultura dentro de las actividades pecuarias más importantes del país.

Dentro de los problemas con mayor impacto que afectan a esta actividad se encuentra la mortalidad durante la lactancia y el destete, ya que en esos periodos los lechones son altamente susceptibles a los patógenos, ya sea porque su

sistema inmune no está bien desarrollado o debido a una toma insuficiente de calostro o a la existencia de problemas en las prácticas de manejo dentro de la granja (7).

La mortalidad pre-destete puede variar entre 4% y 20%, y puede representar hasta 25% del retorno económico pero, en casos extremos, puede alcanzar 50 - 100% de mortalidad, como sucede en granjas afectadas por la enfermedad de Aujeszky (7, 8).

Los agentes que causan enfermedades respiratorias pueden llegar a matar al animal o, en caso de que sobreviva, provocar un retraso en el crecimiento debido al daño pulmonar que ocasionan, el cual genera una disminución en la ganancia diaria de peso (GDP) (Tabla 1), ocasionando que se alargue el periodo de engorda y con eso se incrementen los costos de producción (8, 9, 10).

Tabla 1. Relación daño pulmonar - disminución de GDP (10)

% de pulmón afectado	Disminución de la GDP (%)
1 – 10	3
11 – 20	8
21 – 30	15
>30	≥19

Por lo anterior, un esquema de vacunación que genere una respuesta inmune local específica en lechones lactantes sería deseable, debido a que las mucosas respiratoria y digestiva son los primeros sitios en ser invadidos y desafiados por los antígenos ambientales. Además, si el animal cuenta con esta protección, una

vez que ocurra el destete se aumenta la probabilidad de supervivencia al contrarrestarse factores como la disminución de anticuerpos maternos, el estrés del cambio ambiental y de alimentación, así como los cambios generados en la microbiota, que lo vuelven susceptible a enfermedades en esa etapa (5).

1.2. LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNITARIO

Los animales cuentan con diversas formas de protección en contra de los retos antigénicos medio ambientales, y cada una cuenta con diferentes características y finalidad. Así, un animal al nacimiento no se encuentra totalmente indefenso ante el paso de un ambiente estéril (útero) a otro lleno de retos antigénicos, ya que cuenta con mecanismos de protección innatos, como la fiebre, el sistema del complemento o las células “natural killer” (NK), que se activan a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), en especial los expresados por las células dendríticas (DC), principales inductoras de la respuesta inmune (1, 11).

Por otro lado, los animales tienen una protección inmunitaria específica, mediada por linfocitos, dirigida a antígenos específicos, los cuales la pueden encaminar hacia la respuesta humoral (anticuerpos) o celular, además de poder ser a nivel sistémico o local (mucosas) (1). Esa protección se puede presentar de dos formas, una es conocida como inmunidad pasiva, que se caracteriza por la transferencia, por diversas rutas, de componentes del sistema inmune de un animal, por ejemplo los anticuerpos, a otro animal que no presente estos componentes, el cual obtendrá una protección que no fue generada por su

organismo, con el inconveniente de que el nivel de protección va decreciendo a lo largo del tiempo. Esta protección se presenta en los animales recién nacidos y lactantes (1). La otra forma es como inmunidad activa o adaptativa que, al contrario de la pasiva, se monta por medio de los componentes del sistema inmunológico del animal, por lo que este tipo de respuesta inmune está presente a lo largo de la vida del animal y genera memoria (1).

1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA INMUNIDAD PASIVA

NATURAL

Dependiendo de la especie, puede haber transferencia de anticuerpos maternos a nivel de placenta, calostro y leche. En el caso de los lechones no hay transferencia por placenta, debido a que esta es de tipo epiteliochorial, lo que impide el paso de los anticuerpos (Abs) maternos circulantes al producto, por lo que la adquisición de inmunidad pasiva solo se lleva a cabo con la ingesta de Abs contenidos en el calostro y leche que posteriormente son absorbidos por los enterocitos. Esas secreciones tienen diferentes concentraciones de inmunoglobulinas, siendo la IgG la de mayor concentración en calostro la cual protegerá principalmente a nivel sistémico. En la leche, la de mayor concentración es la IgA, que servirá principalmente para proteger el intestino (13). Esto se debe a que solo el 70% de la IgG es sintetizada en la glándula mamaria y el resto se obtiene de su transporte de la sangre a la secreción mamaria por vía transepitelial, que tiene mayor actividad tres semanas antes del parto, lo que coincide con la

síntesis de calostro. En contraste, la IgA presenta más del 90% de producción a nivel local y muy poca es transportada desde la circulación (1, 16).

Por lo descrito anteriormente, este tipo de protección inmune tiene diversas desventajas y limitantes, como el que los anticuerpos maternos solo serán específicos contra los antígenos que hayan estado en contacto con la madre durante la gestación (1, 16), que el nivel de protección va a ir disminuyendo a lo largo del tiempo y por lo tanto no se prolonga a lo largo de la vida del animal, debido a la vida media de los Abs maternos, que puede ser de dos a tres días para las IgA y de seis hasta 22 días para la IgG (1, 16, 17). Otra limitante para la protección del animal, es su carácter predominantemente sistémico, ya que la protección depende del hecho de la absorción de las Ig y su transporte a la circulación, dejando casi indefensas las mucosas, que como se sabe, son el primer lugar de contacto antígeno-animal y la principal vía de entrada de patógenos (1).

1.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA INMUNIDAD ACTIVA O ADAPTATIVA

Con esta inmunidad el organismo genera los anticuerpos específicos que necesite por medio de los linfocitos T, que maduran en el timo y que luego serán capaces de secretar citocinas, y los linfocitos B que se originan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas y que producen los anticuerpos al convertirse en células plasmáticas (18).

La inmunidad activa genera protección, tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosa, debido a que los macrófagos y DC capturan el estímulo antigénico de la periferia y viajan a los sitios donde residen las células T y B, para presentarles los antígenos ya procesados y así iniciar una respuesta inmunitaria. Esos sitios son conocidos como órganos linfoides secundarios, como el bazo, que participan principalmente en la inmunidad a nivel sistémico, así como los órganos linfáticos terciarios, que están más conectados a la respuesta inmune local, por ejemplo los linfonodos y la lámina propia de las mucosas (18).

La principal limitante de una respuesta inmune activa es el tiempo que tarda en manifestarse, ya que sus componentes van madurando a través de las primeras semanas de vida, mientras tanto el animal tiene protección contra los antígenos por medio de los anticuerpos maternos adquiridos pasivamente y, al momento en que estos van decreciendo, se presenta la inmunidad activa. Se considera que existe un punto, denominado “ventana crítica”, durante la transición de un tipo de respuesta a otro, en el cual aumenta la susceptibilidad del animal a las enfermedades debido a que la cantidad de anticuerpos maternos ya no es suficiente para seguir confiriendo protección y, a su vez, la maduración y activación de los linfocitos del neonato aún no es completa como para generar una protección contra los patógenos. Aun así, la característica de poder montar una respuesta específica y generar memoria, que acompañará al animal a lo largo de su vida, le da mayor ventaja sobre la inmunidad pasiva (1, 14, 19).

El desarrollo y generación de los componentes inmunológicos se ve alterado por diversas causas. De las más cotidianas son las situaciones que producen

estrés, ya que puede disminuirse la capacidad de respuesta del sistema inmunitario (inmunodepresión) (1, 14, 19). Un ejemplo de una situación estresante, en los mamíferos domésticos, es la etapa del destete, que provoca estrés por los cambios drásticos en la alimentación, la separación de la madre y/o hermanos, un nuevo ambiente debido al cambio de jaula, área y/o presencia de individuos desconocidos, cambios en la microbiota mucosal y demás situaciones propias de este ciclo productivo, dando como resultado un animal susceptible a los patógenos y volviendo críticos estos días ya que puede aumentar la tasa de morbilidad y/o mortalidad (1, 14, 19).

1.3. EL SISTEMA INMUNITARIO MUCOSAL

Debido a la importancia de las mucosas como sitios primarios de contacto y entrada de agentes patógenos, se debe entender cómo se da una respuesta inmune activa a este nivel. El sistema inmunitario en las mucosas está conformado por compartimientos difusos, como los ubicados en el epitelio y la lámina propia, y otros bien definidos, como los linfonodos. Ese tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), dependiendo de su ubicación anatómica, recibe un nombre específico, como para los casos del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el asociado a la nasofaringe (NALT) y el asociado a los bronquios (BALT), que tienen características propias, dependiendo de su localización y de la especie animal. Un ejemplo es el BALT en el cerdo, cuya presencia al nacimiento es variable, es decir, que se va a desarrollar principalmente ante la estimulación antigénica postnatal, característica que comparte con los humanos y que lo diferencia del de los

roedores donde es constitutivo. Ya sea un compartimiento difuso o bien definido, ambos participan en la generación de una respuesta inmune activa ante la presencia de un antígeno (20, 21, 22).

La participación de los distintos tipos de MALT en la generación de la respuesta inmune adaptativa es a través de sitios inductores, en los cuales se dará la presentación de antígenos y la inducción de una respuesta inicial (4); y sitios efectores, donde esa respuesta inducida se llevará a cabo.

Los sitios inductores poseen una región enriquecida con linfocitos, macrófagos y algunas células plasmáticas, están cubiertos por un epitelio con células especializadas en el muestreo de antígeno conocido como epitelio asociado a folículos (FAE), con células M (4, 23). Debajo de esas regiones se encuentran folículos de células B, que contienen centros germinales (GC), donde ocurre una selección y división bastante significativa de esta clase de células, ya que las células B de alta afinidad son las que se acumularán principalmente aquí y se cree que las células dendríticas foliculares (FDC) y las células T cooperadoras CD4+ (Th CD4+) juegan un papel importante en la selección de estas células B (24). Estos GC son considerados como los sitios donde las células B hacen el cambio para producir IgA, además de poseer la mayor parte de células B IgA+ (3, 4, 23, 25).

Después de ser presentado el antígeno a las células linfoides en los sitios inductores, éstas lo abandonan por la vía linfática para pasar a la circulación sistémica y, por ecotaxia (*homing*), poder llegar a los sitios efectores, como la lámina propia de las mucosas respiratoria, gastrointestinal y reproductiva, en

donde son retenidas, e inicia un proceso de clonación las células B gracias a la influencia del antígeno, células T y citocinas, con la finalidad de transformarse, mayoritariamente, en células plasmáticas maduras productoras de IgA, enfocadas a la protección inmune local (3, 4, 25).

Las células linfoides, una vez que han alcanzado la circulación sistémica, puedan llegar a lugares efectores de mucosas distintos a la original, donde pueden ser retenidas y se podrán clonar y madurar en células plasmáticas productoras de anticuerpos. A esta distribución de las células, de un sitio inductor a otro sitio efector en otra región, se le denomina “sistema inmune mucosal común”, y la suposición de la existencia de este sistema ha sido por evidencia indirecta, por ejemplo, la ingestión de bacterias y virus inducen anticuerpos en saliva, leche y lágrimas de forma paralela. (4, 22, 26, 27).

Además de los sitios inductores y efectores, lo que caracteriza una respuesta activa en una mucosa es la presencia de la IgA como el anticuerpo principal para la protección, que es transportada por medio de receptores específicos (pIgR) del epitelio a la superficie de la mucosa (20, 28). Y es la IgA secretoria (SIgA) dimérica o polimérica, y no la IgA sérica, que es monomérica, la que ocupa más del 80% de los anticuerpos producidos en el MALT (4). Esto se explica por las propiedades de la SIgA que son: el poder neutralizar los virus y aglutinar bacterias mejor que su contraparte monomérica, además de ser capaz de funcionar en ambientes ricos de enzimas proteolíticas (4). La forma en que la SIgA actúa para brindar una protección inmune es por medio de la exclusión inmune, que es un mecanismo de acción que evita o limita la adherencia y/o absorción de material antigénico, junto

con la formación de complejos inmunes no dañinos, en contraste con los formados por IgG e IgM, que neutralizan las enterotoxinas bacteriales y a los virus con tropismo entérico y aglutina una gran variedad de microorganismos enteropatógenicos (3, 4, 9, 16, 20, 28, 29), pero, a su vez, inician procesos más agresivos de inflamación por su capacidad de fijar complemento y activar células.

Para que la IgA pueda estar presente en la respuesta, necesita ser regulada y esto se logra con ayuda de las citocinas, induciendo a las células B a diferenciarse en células plasmáticas IgA y favorecer el cambio de isotipo a IgA (4). Dentro de las citocinas que ayudan a estos procesos se encuentran la interleucina 10 (IL-10) y al factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) que son secretadas por las Th CD4+ ubicadas en el MALT y participan en la diferenciación de las células B comprometidas para IgA localizadas en mucosa (3).

Otras interleucinas participantes en el proceso de regulación de la respuesta de IgA son la IL-5 y la IL-6, que son las citocinas más efectivas para inducir a las células B a diferenciarse en células secretoras de IgA. Sin embargo, la IL-6 resulta ser más efectiva que la IL-5 en el proceso terminal de diferenciación, debido a que la IL-5, aparentemente, solo tiene efecto sobre células B comprometidas a la producción de IgA (4, 28). Ahora bien, para que las IgA producidas por las células plasmáticas lleguen a las secreciones de las mucosas con ayuda de los pIgR, estas se deben encontrar polimerizadas, ya sea en forma de dímeros o polímeros, lo que logran a través de una cadena de unión o cadena J, la cual lleva a cabo la polimerización antes de que la célula libere a las inmunoglobulinas, generando principalmente dímeros, esto da como resultado la generación de SIgA (28).

Como se mencionó con anterioridad, en la leche de las cerdas la Ig en mayor concentración es la SIgA, debido a que la leche es una secreción que está en contacto con la mucosa de la glándula mamaria. También, se debe recordar que al ser generada por una respuesta inmune activa, estos polímeros de IgA solo serán específicos a los antígenos a que se haya expuesto la madre, principalmente en la mucosa del tracto digestivo (28).

1.4. INMUNIDAD NEONATAL

Los animales jóvenes poseen mecanismos inmunológicos que los protegen; los lechones solo adquieren anticuerpos maternos por la ingesta de calostro y leche, por absorción en intestino de las Ig contenidas en estas secreciones, las cuales son principalmente IgG en calostro, que están enfocadas a la protección sistémica y la SIgA en leche, que protegerá localmente al intestino (13). También, los neonatos son capaces de montar una respuesta inmune activa, a pesar de que se considera que los animales muy jóvenes son inmunodeficientes (30), debido a que las células T del neonato tienen un umbral alterado de respuesta (31) y que sus células presentadoras de antígeno (APC), principalmente las DC, no regulan ni expresan eficientemente las moléculas adecuadas para realizar sus funciones (32, 33). También los anticuerpos maternos, que se ubican a nivel sistémico, afectan la generación de una respuesta inmune activa, inhibiendo la respuesta de los linfocitos B del recién nacido, ocasionando que no se pueda obtener una protección eficiente en contra de un reto antigénico por medio de la inmunidad activa de carácter humoral (1, 12, 13, 29). Sin embargo, se ha observado que un

animal lactante si puede montar una respuesta inmune humoral a un antígeno del cual no posea anticuerpos específicos de la madre (1, 31) y se hipotetiza que para la existencia de una respuesta inmune activa por parte del neonato, se necesita de la colonización de su organismo y la exposición a los PAMPs (34, 35, 36).

1.5. INMUNIDAD PERINATAL EN LAS MUCOSAS DE ANIMALES

El lechón neonato tiene desarrollado su sistema inmune sistémico, sin embargo, el sistema inmune en mucosas es prácticamente ausente debido a la poca cantidad de linfocitos presentes en los sitios inductores y efectores, los cuales se van poblando conforme pasan los días. La mucosa intestinal sirve de ejemplo (tabla 2) ya que cuenta con placas de Peyer (PP), que consisten en folículos sumamente pequeños e inmaduros, rodeados por pocas células T y en la lámina propia de las vellosidades intestinales solo cuenta con unas cuantas APC y son casi inexistentes las células T en los primeros días, y es hasta la séptima semana de edad cuando el sistema inmune de la mucosa intestinal es equiparable al de un animal adulto (36, 37, 38). Por medio de diversos estudios se ha observado que el desarrollo del sistema inmune local en la mucosa intestinal se promueve por medio de la exposición a la microbiota (34, 35, 40, 41, 42, 43).

Tabla 2. Desarrollo del sistema inmunitario en la mucosa intestinal de lechones
(41)

Nacimiento	Cúmulo de linfocitos sin estructura inmunológica definida en zonas de futuras placas de Peyer.
2 primeras semanas	Colonización intestinal de linfocitos que expresan CD2. Placas de Peyer se organizan.
2 – 4 semana	Colonización con linfocitos T CD4+ en lámina propia. Aparición de células B que expresan IgM.
5 semana	Linfocitos CD8+ empiezan a aparecer. Aparecen células B IgA+ en criptas intestinales.
7 semana	La estructura del sistema inmune ya es comparable con la de un animal adulto.

Se tiene conocimiento de que un animal de tres semanas de edad puede tener una respuesta inmune circulante hacia virus vivos y a componentes de la dieta, sin embargo esta respuesta no es ni cualitativa ni cuantitativamente igual a la de un animal de mayor edad (41), pero se desconoce lo que ocurre en las mucosas a esas edades.

Por lo anterior, queda clara la importancia de comprender mejor el desarrollo del sistema inmune y los mecanismos que emplea, en las distintas etapas del desarrollo, para generar una protección a nivel de mucosas que ayude al animal a enfrentar los retos antigénicos que se presentan, principalmente en las primeras semanas de vida.

Esa información puede mejorar la generación y desarrollo de nuevos esquemas y sistemas de inmunización junto con mejores tecnologías para el desarrollo de vacunas.

1.6. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN MUCOSAS POR VACUNACIÓN

Una inmunización por vía intramuscular (IM) genera una respuesta inmune sistémica predominantemente de IgG, pero la respuesta en las mucosas es nula o muy pobre, por lo que se requiere de otras rutas capaces de generar una respuesta efectiva en mucosa. Se ha comprobado que la vía SC es capaz de generar una respuesta principalmente a nivel sistémico, aunque también se detectan IgG, IgA e SIgA en mucosas (49).

La forma más obvia de generar una respuesta inmune en las mucosas es aplicar la vacuna directo en la mucosa donde se requiere la inmunidad. Así, existen vías de vacunación como la IN y oral (PO) que inducen una respuesta a nivel de mucosa y otra a nivel sistémico (3, 27, 45). Sin embargo, la vacunación directa en mucosas tiene limitantes, una es la certeza reducida de que el animal reciba la dosis adecuada de antígeno capaz de generar una respuesta efectiva, ya

sea porque se degrade, como puede suceder en la vía oral, o por la expulsión del antígeno por mecanismos como el estornudo si se aplica en forma IN. Por ello se tienen que usar esquemas de dos o más inmunizaciones, corriendo el riesgo de generar tolerancia al antígeno en vez de respuesta. Para evitar esto se emplean adyuvantes oleosos, tóxicos o grandes cantidades de antígeno, que hacen impracticable las vías mucosales de administración de inmunógenos en sistemas de producción o en los humanos (22, 46, 47), por lo que deben desarrollarse nuevos protocolos de inmunización, efectivos para las mucosas.

En medicina veterinaria se cuenta con pocas vacunas de uso comercial que se apliquen por la ruta IN o PO. En las aves de producción se tienen más vacunas que se aplican por estas rutas que en otras especies, los ejemplos de vacunas contra enfermedades en aves aplicadas por vía mucosal son: contra Newcastle, bursitis infecciosa aviar y bronquitis infecciosa, que pueden ser aplicadas oral, IN, u ocularmente dando buenos resultados mientras el manejo para su aplicación sea el adecuado, teniendo por característica: ser de virus atenuados que generan una fuerte y efectiva respuesta local al tener los mecanismos de invasión de los patógenos (50, 51). Los ejemplos en otras especies es la vacuna contra la enfermedad de las perreras por la ruta IN y por la misma vía a los cerdos contra *Bordetella bronchiseptica*, que, al igual que las vacunas en aves, están constituidas por el antígeno atenuado, lo que da una respuesta inmune local eficiente (50, 51).

1.7. VACUNACIÓN A TEMPRANA EDAD

Los principales problemas que enfrenta una vacunación para inducir una respuesta inmune a temprana edad son: a) la inmunosupresión causada por los anticuerpos maternos (1) y b) la inmadurez del sistema inmune del neonato (30, 31, 32, 33). Estos problemas se pueden superar utilizando el antígeno, adyuvante, dosis, ruta y esquema de vacunación más conveniente, ya que en diversos estudios se ha observado respuesta en animales jóvenes después de una vacunación en etapa temprana (30, 31, 32, 33). Sin embargo, no se han generalizado estos métodos de vacunación en los animales de producción debido a la falta de un esquema de inmunización preciso en la especie de interés, el poco conocimiento de los mecanismos que activan la inmunidad en animales jóvenes, el desconocimiento de los efectos a largo plazo de una vacunación temprana o sencillamente la poca certeza y confiabilidad de la generación de una respuesta inmune por parte del lactante (45, 52, 53, 54).

En las explotaciones porcinas, existen muy pocas situaciones y enfermedades en las que se recomienda la vacunación de los animales lactantes. Un ejemplo, es la vacunación contra la micoplasmosis, en caso de que la madre no haya sido vacunada, sugiriéndose la vacunación de los lechones entre los siete y 10 días de edad, con un refuerzo a la segunda o tercera semana post-vacunación (55). Otro escenario conveniente para vacunar a los neonatos es cuando una granja tiene una alta incidencia de rinitis atrófica, en cuyo caso se recomienda vacunar a los lechones 2 veces, la primera a la semana de edad y la segunda tres a cuatro

semanas después (55). También se puede vacunar a la tercera semana de edad contra la salmonelosis y de los 10 a 12 días de edad contra *Streptococcus suis* utilizando vacunas autógenas o comerciales (55). Estas vacunaciones se realizan por ruta IM, por la mayor facilidad para su aplicación, pero esto implica que los lechones generarán principalmente respuesta sistémica, por lo que los animales no presentarán enfermedad pero podrían volverse portadores sanos ya que no se evita la colonización de los patógenos, viéndose solo disminuida la mortalidad pero no la morbilidad.

Se ha descrito que una vacunación temprana, que consta de dos o más inmunizaciones separadas por un periodo de tiempo relativamente largo (dos semanas), esta no va a generar una respuesta favorable con la primera inmunización, pero produce una sensibilización o *priming* y la generación de memoria en contra del antígeno, que se verá reflejada con una respuesta óptima después de la segunda inmunización, inclusive si el animal tiene anticuerpos maternos, un ejemplo es la vacunación contra hepatitis en infantes (33, 49, 54, 56, 57, 58). Sin embargo, estos esquemas han utilizado vacunas IM, las cuales no generan una respuesta inmune a nivel mucosas, por lo que no evitan la infección, solo impiden que se presente el cuadro clínico de la enfermedad (33, 49, 54, 56, 57, 58).

Se ha sugerido, por evidencias indirectas, que una interacción óptima de las APC y las células T son la clave para que la respuesta inmune en un animal lactante sea equiparable a la de un adulto (54).

2. JUSTIFICACIÓN

Ya que el lechón es susceptible a las infecciones, tanto en la lactancia como al destete, donde llega con niveles de anticuerpos maternos reducidos y sufre el estrés que le provoca el cambio de alimentación y ambiente, sería útil inmunizarlo en la lactancia para que esté protegido inmunológicamente durante esta etapa y también cuente con protección a nivel mucosal contra los desafíos del destete. La inmunización IM provee de una respuesta inmunológica sérica sólida, pero las mucosas permanecen vulnerables ya que la IgG producida no atraviesa el epitelio mucosal. De ahí la importancia de conocer la edad en la cual el lechón lactante es capaz de responder adecuadamente en sus mucosas a un esquema de inmunización temprana que induzca inmunidad sistémica y local.

3. HIPÓTESIS

La maduración del sistema inmunológico de las mucosas en el lechón depende de la edad y su respuesta puede inducirse tempranamente con un protocolo de inmunización mixto parenteral (SC) y mucosal (IN).

4. OBJETIVO

Evaluar la respuesta inmunológica de anticuerpos en secreciones de mucosas y suero en una etapa perinatal utilizando un protocolo de inmunización mixta (SC/SC/IN).

4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Cuantificar la respuesta de IgG e IgA específicas contra ovoalbúmina (OVA) en muestras de suero, saliva, secreción nasal y vaginal por el método de ELISA, en lechones inmunizados a los 2 y 7 días de edad.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El esquema del experimento se muestra en la figura 1 y consistió en:

1. Inmunizar lechones de 2 o 7 días de edad (n=7/grupo), utilizando como antígeno OVA, por la vía mixta SC/SC/ IN. A los controles (n=3/grupo) no se les administra ninguna sustancia.
2. Tomar muestras de suero, saliva, secreciones de la mucosa nasal y vaginal a los días experimentales cero, 10, 20, 27, 41 y 55.

Edad (días) de los grupos	
Grupo de 2d	2 12 22 29 43 57
Grupo de 7d	7 17 27 34 48 62
Inmunizaciones y muestreos	<hr/> ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ SC SC IN
Duración del experimento (días)	0 10 20 27 41 55

Figura 1. Diseño experimental. Se muestra la edad en días de los animales. La edad y día del experimento cuando se realizaron la inmunización y muestreos. 2d= dos días de edad 7d= siete días de edad SC= inmunización subcutánea IN= inmunización intranasal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Los animales utilizados fueron del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en donde se maneja una línea Landrace x Yorkshire. Derivados de la producción se tomaron dos camadas de diez animales cada una. Una camada fue de lechones de dos días de edad (2d) y otra de siete días de edad (7d) al inicio del muestreo. Se utilizaron siete animales experimentales y tres controles en cada camada, elegidos aleatoriamente. Las camadas provinieron de madres clínicamente sanas y los lechones también se encontraban clínicamente sanos al inicio del experimento. Tanto las cerdas como los lechones recibieron los procedimientos regulares de manejo propio de la granja en cuanto a castración, medicación, dieta, destete, aplicación de hierro, vacunación. El destete se realizó al día 24 de edad y fue por camada, es decir los animales fueron acomodados en distintos corrales, sin mezclarlos con cerdos destinados a la línea de producción.

Toma de muestras

Para la obtención del suero, la muestra sanguínea fue tomada de la vena cava en tubos al vacío sin anticoagulante. Después de la retracción del coágulo se centrifugó el tubo para obtener el suero requerido.

Con hisopos de algodón se tomaron muestras de saliva, secreción nasal y vaginal. Los hisopos se pusieron en tubos Eppendorf y se conservaron a 4°C en todo momento, para su posterior centrifugación^(I). El líquido obtenido de la centrifugación fue vaciado a nuevos tubos Eppendorf, si la muestra total de cada secreción era menor a 100 micro litros (μL) o si se observaba el hisopo muy seco, se realizaba un lavado con PBS, poniendo 50 μL en cada cabeza de algodón, esta muestra se colocó en un tubo Eppendorf distinto al de la muestra sin PBS. A 100 μL de muestra se les añadió 5 μL de una mezcla de inhibidores de proteasas (tosil-fenilalanil-clorometil-cetona (TPCK) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cetona de tosil-lisina-clorometilo (TLCK) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMFS) 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una relación de 1:1:1). Los muestreos fueron a los días cero, 10, 20, 27, 41 y 55 post-inmunización (DPI).

Preparación de antígeno e inmunización

La OVA se preparó con *buffer* de fosfato salino (PBS) estéril, luego se esterilizó utilizando membranas de 0.22 μm y se le añadió adyuvante oleoso (VETLO7 0:1 Gibco, USA) a una proporción de 20:1, para emulsificar.

Las inmunizaciones se realizaron después de la toma de muestras en los días cero, 10 y 20. Los días cero y 10 la inmunización fue por vía SC a una dosis de 1mg OVA/kg, y el sitio de aplicación fue a un centímetro por detrás de la base de la oreja. El día 20 la inmunización fue IN a una dosis de 2mg OVA/kg.

I Centrifuga: Gravity convection incubator economy model 2EG

II Espectrofotómetro: Thermo electronica corporation Multiskan EX

Técnica de ELISA

Se utilizó una modificación de la técnica de ELISA para anticuerpos totales de los equipos comerciales para IgG e IgA de la marca Bethyl (IgG No. de catálogo E100-104, IgA No. de catálogo E100-102, USA). El diseño de la placa para la prueba se muestra en la Figura 2.

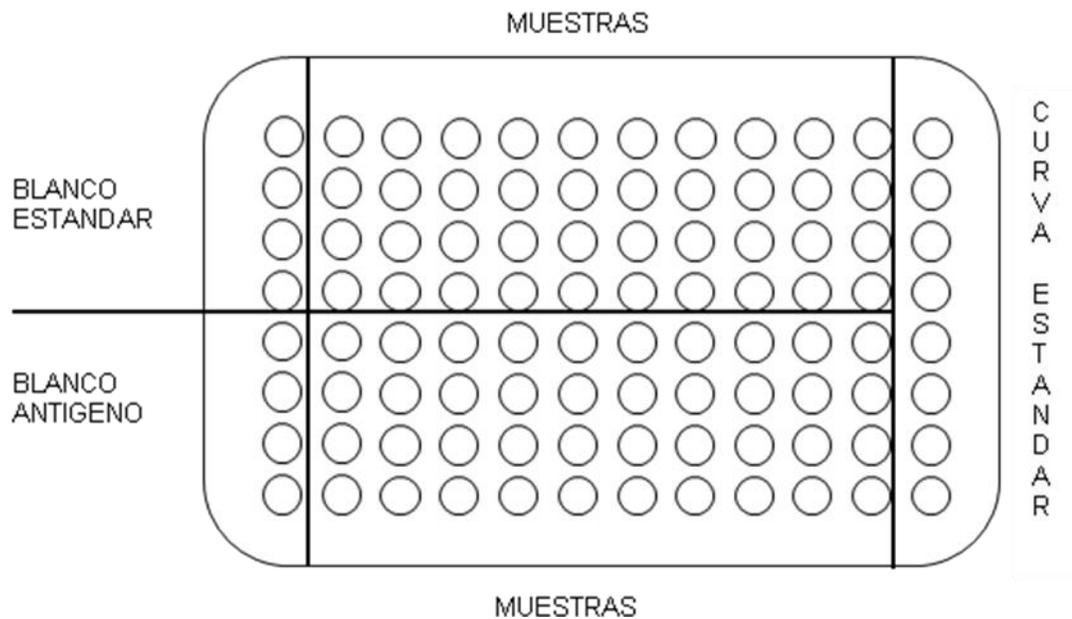


Figura 2. Diseño de la placa para ELISA. La columna lateral izquierda se utilizó para colocar los blancos en los cuatro pozos superiores se colocó el blanco estándar y en los cuatro inferiores el blanco del antígeno, en la columna lateral derecha se colocó la curva estándar iniciando de la concentración más alta, en el primer pozo, a la más baja en el último pozo. Las columnas centrales fueron utilizadas para las muestras y se dividió en dos secciones de cuatro pozos por columna, en los pozos superiores se colocaban las muestras y los otros tres pozos eran para las diluciones seriadas.

Técnica de ELISA para IgG

1. Se sensibilizó la placa con el antígeno [2µg de antígeno/mL en *buffer* de carbonatos pH 9.6]. 100 µL/pozo, excepto en blancos del estándar y curva.
Se dejó toda la noche a 4°C.

2. Se colocó el anticuerpo (*goat-antipig* IgG-F marca Bethyl) de captura, para la curva y blancos del estándar como lo indica el fabricante.
3. Se lavó tres veces la placa con solución de lavado.
4. Se bloqueó la placa con solución de bloqueo e incubó 1 hora (h) a temperatura ambiente.
5. Se lavó tres veces la placa con solución de lavado.
6. Se colocó una curva con el estándar del isotipo como lo indicó el fabricante, empezando a una [1 µg/mL] para suero y [0.1 µg/mL] para mucosas, de ahí se hicieron diluciones dobles seriadas. Se colocaron 100 µL en cada pozo de la dilución correspondiente.
7. Se pusieron las muestras a una dilución 1:50 para los sueros ó 1:5 para las mucosas en *buffer* de dilución y se hicieron diluciones triple seriadas en suero y doble seriadas en mucosas. Se incubó 1h a temperatura ambiente.
8. Se lavó cinco veces la placa con solución de lavado.
9. Se agregó el anticuerpo secundario (*goat antipig* IgG marca Bethyl) con HRP según las instrucciones del fabricante.
10. Se lavó cinco veces la placa con solución de lavado.
11. Se reveló la placa con sustrato [1mgTMB/1 mL DMSO] según las instrucciones del fabricante.
12. Se hizo la lectura en espectrofotómetro ^(II) a 650 nanómetros y se paró la

I Centrífuga: Gravity convection incubator economy model 2EG

II Espectrofotómetro: Thermo electronica corporation Multiskan EX

reacción con 100 μ L de ácido sulfúrico 2M/pozo. Se leyó la placa a 450 nanómetros.

Técnica de ELISA para IgA en suero y secreciones de mucosas.

1. Se sensibilizó la placa con el antígeno como ya se describió para IgG
2. Se puso el anticuerpo (IgA *affinity purified* marca Bethyl) de captura para la curva y blancos del estándar como lo indica el fabricante.
3. Se lavó tres veces la placa con solución de lavado.
4. Se bloqueó la placa con solución de bloqueo.
5. Se lavó tres veces la placa con solución de lavado.
6. Se añadió la curva con el estándar de IgA siguiendo las instrucciones del *kit*.
7. Se pusieron las muestras a una dilución 1:5 en *buffer* de dilución e hicieron diluciones doble seriadas. Se incubó 1h a temperatura ambiente.
8. Se lavó cinco veces la placa con solución de lavado.
9. Se agregó un anticuerpo monoclonal anti-IgA de cerdo (*mouse antiporcine* IgA marca Serotec), 100 μ L por pozo a una dilución 1:250. Se incubó 1h a temperatura ambiente.
10. Se lavó cinco veces la placa con solución de lavado.
11. Se agregó anticuerpo anti-ratón biotinilado (goat antimouse IgG marca Zymed), 100 μ L por pozo a una dilución 1:5,000. Se incubó 1h a temperatura ambiente.
12. Se lavó cinco veces la placa con solución de lavado.

13. Se agregó estreptavidina conjugada a HRP en una dilución 1:5,000, 100 μ L por pozo. Se incubó 1h a temperatura ambiente.
14. Se lavó cinco veces la placa con solución de lavado.
15. Se reveló la placa con sustrato [1mg PNPP/1 ml DMSO] en 10 ml de dietanolamina [1 mM], se agregó 100 μ L por pozo. Se dejó en oscuridad a temperatura ambiente.
16. Se realizó la lectura a los 15 minutos de revelarse, en espectrofotómetro^(II) a 492 nanómetros y enseguida una lectura a 405 nanómetros que se restó a la primera lectura y este resultado es el que se utilizó.

Interpretación

Se elaboró la curva estándar, como el ejemplo de la Figura 3, para cada placa promediando las densidades ópticas (DO) de los blancos del estándar y obteniendo su desviación estándar, la cual se multiplicó por tres para sumarla al promedio, este resultado se restó de cada DO de la curva del estándar para obtener la densidad óptica neta la cual se graficó en contra de la concentración correspondiente.

I Centrífuga: Gravity convection incubator economy model 2EG

II Espectrofotómetro: Thermo electronica corporation Multiskan EX

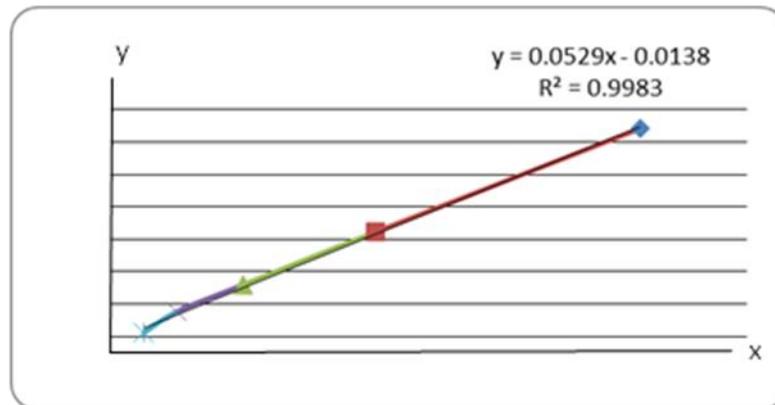


Figura 3. Ejemplo de una curva estándar para IgA a una concentración inicial de 100 ng/mL. Promediando las densidades ópticas (DO) del blanco se calculó su desviación estándar, la cual se multiplicó por tres, para sumarse al promedio y restarse a cada DO de la curva del estándar, se obtuvo la DO neta que son los puntos que se graficaron en contra de la concentración correspondiente. X = concentración del estándar en ng/mL Y = estándar neto

Los valores de densidad óptica de las muestras se interpolaron en la curva estándar. Para obtener los valores netos de cada muestra por cerdo, los valores obtenidos de los animales control fueron restados a los animales experimentales obteniendo así los valores netos, expresado en concentración ($\mu\text{g/mL}$ para IgG sérico y ng/mL para las demás muestras), que fueron promediados para cada grupo y se realizó análisis de t de Student o Mann whitney dependiendo de la dispersión de los datos.

7. RESULTADOS

Respuesta de IgG e IgA contra OVA en suero

Para IgG anti-OVA los dos grupos dieron respuesta sérica después de la segunda inmunización, los picos de respuesta para el grupo 7d fue al 27 DPI y para el grupo 2d fue al 41 DPI y no hubo diferencia significativa entre los dos grupos (Fig. 4A). Se observó un promedio de concentración en estos picos de 86.34 $\mu\text{g/mL}$ para el grupo 7d y de 78.03 $\mu\text{g/mL}$ para el grupo 2d (Tabla 3A).

En cuanto a IgA anti-OVA, el grupo de 7d respondió después de la segunda inmunización, mientras que el 2d lo hizo hasta después del 41 DPI, lo que significó diferencias significativas entre los grupos a los 20, 27, 41 y 55 DPI ($p < 0.001$) (Fig. 4B). La concentración promedio más alta de anticuerpos para el grupo 7d fue de 408.81 ng/mL al 20 DPI y para el grupo 2d fue de 64.53 ng/mL en el 55 DPI (Tabla 3A).

Respuesta de IgG e IgA contra OVA en secreción nasal

En la respuesta para IgG anti-OVA en la secreción nasal, el grupo de 7d mostró franca respuesta después de la segunda inmunización y su pico de respuesta fue al 27 DPI, mientras que el grupo de 2d respondió hasta después de la tercera inmunización y su pico fue al 41 DPI. No se dio diferencia estadística entre los grupos (Fig. 5A). El grupo 2d mostro una mayor concentración promedio al 41DPI con 85.83 ng/mL y el grupo 7d al 20 DPI con 193.38 ng/mL (Tabla 3A).

Para IgA anti-OVA, el grupo de 7d inició su respuesta después de la tercera inmunización, y presentó su pico al 27 DPI ($p < 0.05$) a diferencia del grupo 2d el

cual presentó su pico al 41 DPI (Fig. 5B) con unas concentraciones promedio de 255.86 ng/mL y de 225.65 ng/mL respectivamente (Tabla 3A).

Respuesta de IgG e IgA contra OVA en saliva

Para la IgG anti-OVA en saliva, ambos grupos respondieron después de la segunda inmunización y presentaron su pico al 27 DPI, con una concentración promedio de 34.48 ng/mL para el grupo 2d y de 89.15 ng/mL (Tabla 3B) y solo se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) al 55 DPI (Fig. 6A) con una concentración promedio de 44.35 ng/mL del grupo 7d y 0.07 ng/mL del grupo 2d (Tabla 3B).

En el caso de IgA anti-OVA en saliva, el grupo de 7d presentó respuesta después de la segunda inmunización con un pico al 27 DPI con una concentración promedio de 27.20 ng/mL, mientras que el grupo de 2d respondió hasta después de la tercera inmunización y su pico fue al 41 DPI con una concentración promedio de 31.08 ng/mL. Hubo diferencia significativa ($p < 0.01$) al 20 DPI donde el grupo 2d tiene 0.21 ng/mL y el grupo 7d 11.22 ng/mL (Fig. 6B, Tabla 3B).

Respuesta de IgG e IgA contra OVA en secreción vaginal

El grupo de 2d fue de 6 hembras y el de 7d de cuatro, ambos grupos dieron respuesta para IgG anti-OVA en secreción vaginal después de la tercera inmunización, pero el grupo de 2d lo hizo en menor medida aunque sin diferencia significativa entre grupos (Fig. 7A). Alcanzando una concentración promedio de 31.86 ng/mL al 41 DPI el grupo 2d y de 152.53 ng/mL al 27 DPI el grupo 7d (Tabla 3B).

En cuanto a IgA anti-OVA en vagina, el grupo de 7d generó su respuesta después del 10 DPI (segunda inmunización), con diferencias significativas ($p < 0.05$) contra el grupo de 2d a los 20 y 27 DPI los cuales tenían una concentración promedio de 11.93 ng/mL y 33.05 ng/mL de parte del grupo 7d y el grupo 2d presento 1.52 ng/mL y 2.54 ng/mL. Los picos de respuesta de 7d y 2d fueron a los 27 y 41 DPI respectivamente con una concentración promedio de 33.05 ng/mL para el grupo 7d y de 12.77 ng/mL para el grupo 2d (Fig. 7B, Tabla 3B).

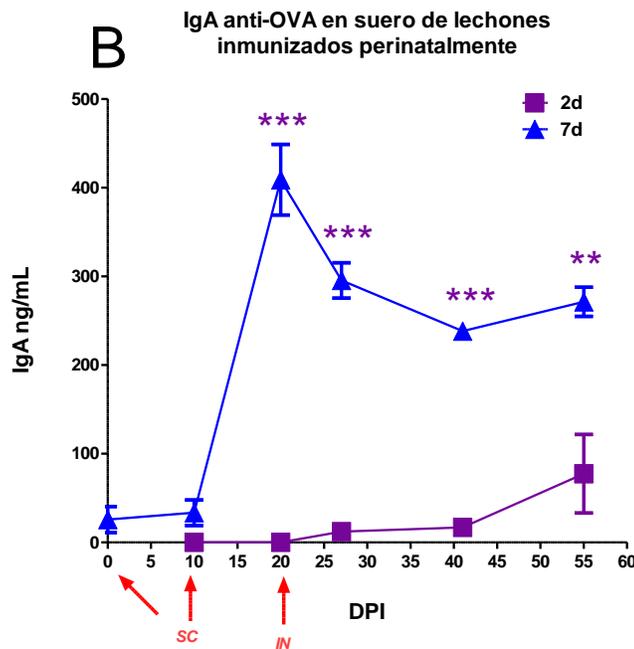
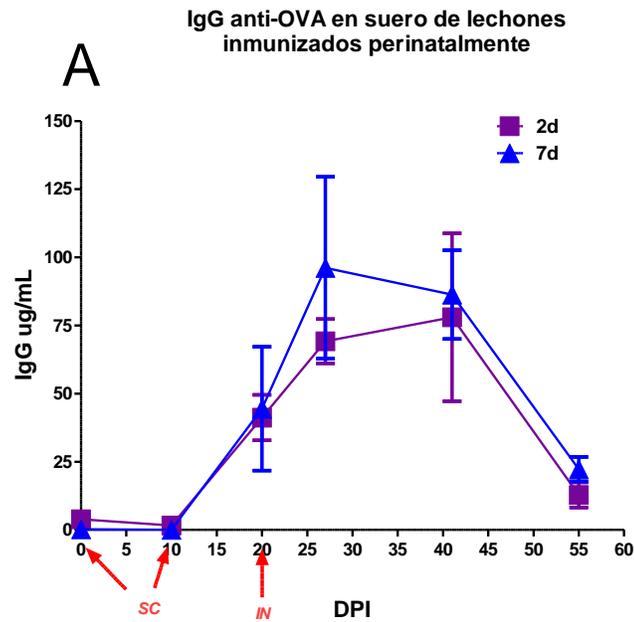
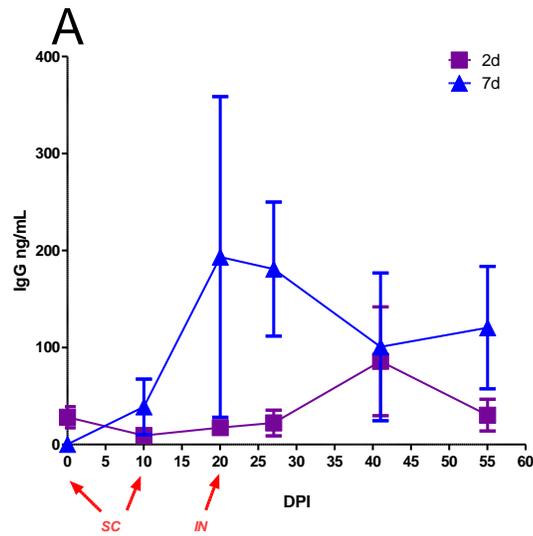


Figura 4. Valores netos de IgG (A) e IgA (B) anti-OVA en suero de lechones inmunizados a distintas edades. Animales de 2 (cuadros morados) y 7 (triángulos azules) días de edad fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 10, e intranasal (IN,) al día 20 con ovoalbúmina (OVA). Cada punto representa el promedio y error estándar de 7 animales. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y el color señala al grupo diferente. ** P<0.01 ***P<0.001. DPI = día post-inmunización. Se utilizó t-Student.

IgG anti-OVA en secreción nasal de lechones inmunizados perinatalmente



IgA anti-OVA en secreción nasal de lechones inmunizados perinatalmente

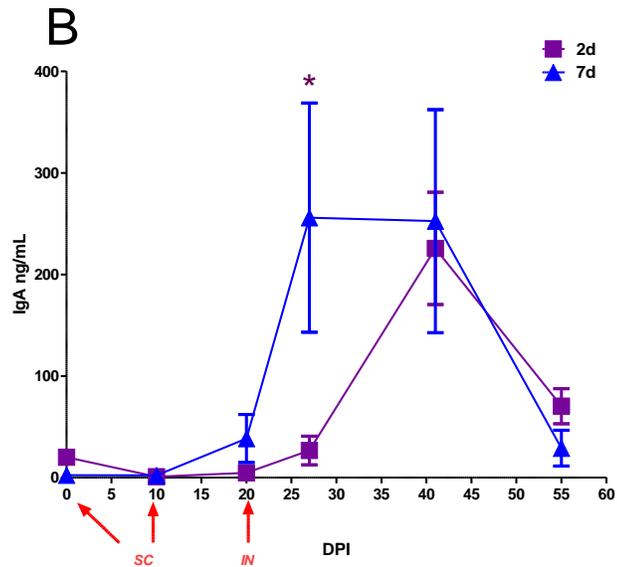


Figura 5. Valores netos de IgG (A) e IgA (B) anti-OVA en secreción nasal de lechones inmunizados a distintas edades. Animales de 2 (cuadros) y 7 (triángulos) días de edad fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 10, e intranasal (IN) al día 20, con ovoalbúmina (OVA). Cada punto representa el promedio y error estándar de 7 animales. *= P<0.05. DPI = día post-inmunización. Se utilizó Mann-Whitney

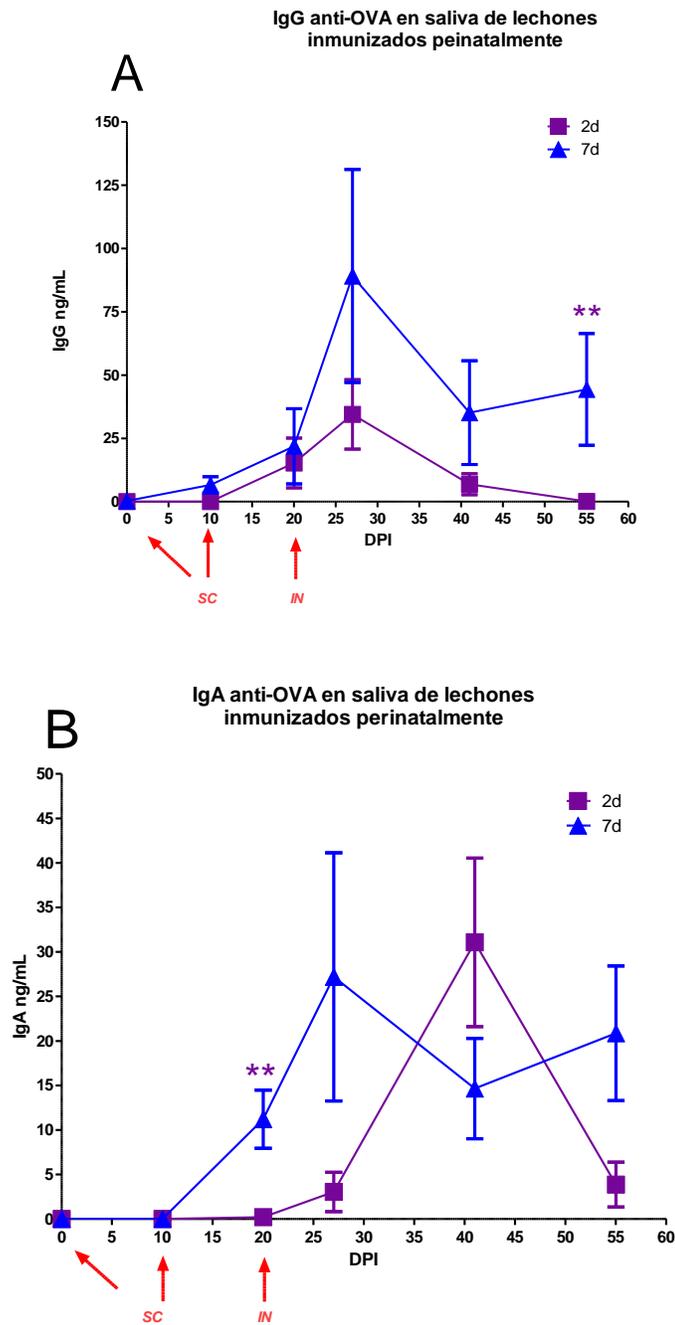


Figura 6. Valores netos de IgG (A) e IgA (B) anti-OVA en saliva de lechones inmunizados a distintas edades. Animales de 2 (cuadros) y 7 (triángulos) días de edad fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) día post-inmunización (DPI) 0 y DPI 10 e intranasal (IN, DPI21) con ovoalbúmina (OVA). Cada punto representa el promedio y error estándar de 7 animales. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos. **= $P < 0.01$. DPI = día post-inmunización. Prueba estadística de Mann-Withney.

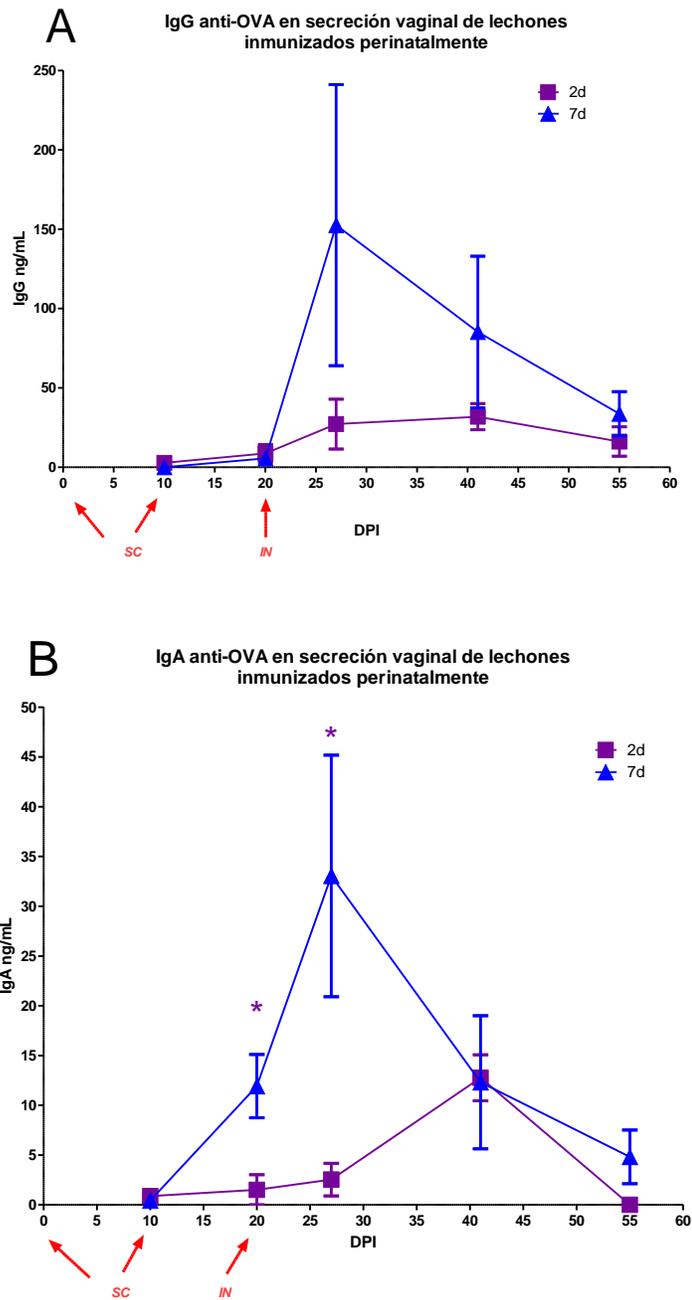


Figura 7. Valores netos de IgG (A) e IgA (B) anti-OVA en secreción vaginal de lechones inmunizados a distintas edades. Animales de 2 (cuadros) y 7 (triángulos) días de edad fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) día post-inmunización (DPI) 0 y DPI 10 e intranasal (IN, DPI21) con ovoalbúmina (OVA). Cada punto representa el promedio y error estándar de 6 animales para el 2d y de 4 animales para 7d. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y el color señala al grupo diferente. *= $P < 0.05$. DPI = día post-inmunización. Prueba estadística de Mann-Whitney.

Tabla 3. Concentraciones promedio de anticuerpos IgG e IgA en muestras de suero, secreción nasal, vaginal y saliva de lechones lactantes inmunizados con OVA.

A	IgG anti-OVA sérico [µg/mL]		IgA anti-OVA sérico [ng/mL]		IgG anti-OVA nasal [ng/mL]		IgA anti-OVA nasal [ng/mL]		
	DPI/INMUNIZACIÓN	2d	7d	2d	7d	2d	7d	2d	7d
	0/SC	3.93	0.27	0.00	25.83	28.16	0.30	20.16	2.34
	10/SC	1.62	0.00	0.00	33.49	9.21	38.81	0.91	2.18
	20/IN	41.19	44.48	0.00	408.81	17.47	193.38	4.81	38.55
	27	69.21	96.17	10.20	295.34	22.17	180.92	26.73	255.86
	41	78.03	86.34	14.13	238.16	85.83	100.65	225.65	252.44
	55	12.80	22.27	64.53	271.20	30.29	120.50	70.30	29.00

B	IgG anti-OVA salival [ng/mL]		IgA anti-OVA salival [ng/mL]		IgG anti-OVA vaginal [ng/mL]		IgA anti-OVA vaginal [ng/mL]		
	DPI/INMUNIZACIÓN	2d	7d	2d	7d	2d	7d	2d	7d
	0/SC	0.00	0.32	0.00	0.00				
	10/SC	0.00	6.66	0.00	0.00	2.78	0.00	0.88	0.42
	20/IN	15.27	21.88	0.21	11.22	8.77	5.63	1.52	11.93
	27	34.48	89.15	3.04	27.20	27.21	152.53	2.54	33.05
	41	6.89	35.17	31.08	14.66	31.86	85.24	12.77	12.31
	55	0.07	44.35	3.86	20.87	16.21	33.71	0.00	4.82

Se muestran los promedios de las concentraciones de IgG e IgA en suero, secreción nasal, saliva y secreción vaginal producidos por dos grupos de lechones lactantes, uno de dos días de edad (2d) y otro de siete días de edad (7d) inmunizados con OVA utilizando un protocolo mixto subcutáneo (SC)/SC/intranasal (IN) y tomándose muestras al día cero, 10, 20, 27, 41 y 55 post-inmunización (DPI).

8. DISCUSIÓN

La porcicultura es una industria pecuaria importante para el país y como cualquier otra, tiene diversos problemas que le causan pérdidas económicas, uno de ellos es la presencia de enfermedades que pueden generar mortalidad o un retraso en crecimiento en las etapas de lactancia y destete de los animales (1, 7, 8, 9, 10). Por tal motivo se deben tener medidas efectivas para minimizar la presencia de enfermedades dentro de una granja, una de ellas es la vacunación; sin embargo, los calendarios de vacunación se inician durante la etapa del destete y están enfocados a generar respuesta sistémica y no local (1, 55). Debido a ello en este trabajo se analizó la respuesta inmune sistémica y local en cerdos lactantes de 2 y 7 días de edad que fueron inmunizados con OVA en un esquema SC/SC/IN, el cual previamente demostró ser efectivo para generar tanto respuesta sistémica como local en cerdos destetados (2).

Entre los resultados que mostro el experimento fue la respuesta a nivel sistémico de la IgG en ambos grupos después de la segunda inmunización lo que esta descrito en otros trabajos y lo denominan como *priming* (33, 49, 54, 56, 57, 58). También se ha reportado que una inmunización IN es favorable para la respuesta sérica de IgG (59, 60) y esto se refleja en el experimento con los picos de repuesta en ambos grupos después de la inmunización IN y siendo que no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales se asume que para la respuesta a este nivel la edad no es un factor determinante como sugieren otras publicaciones (30, 31, 32, 33, 61).

A nivel mucosa, en ambos grupos, hubo presencia de la IgG sin mostrar diferencia significativa en ninguna de las muestras, lo que indica que durante este intervalo de tiempo los cambios en el sistema inmune no afectan en forma sustancial la presencia o generación de este isotipo a nivel local, sin embargo en el estudio anterior (2) los animales destetados que fueron inmunizados con el mismo protocolo que se aplicó no muestran respuesta a este nivel para este isotipo, este tipo de resultados ya se han observado y los explican con que el sistema inmune en mucosas presenta alteraciones para mejorar la inmunidad en los animales jóvenes en contra de los diversos agente infecciosos (61).

También se observó que a nivel mucosas las concentraciones de IgG son menores que a nivel sérico, y al no ser una Ig secretora, su presencia en mucosas está dada mayormente por su trasudación o la transcitosis por medios de receptores Fc (Ig transporte) y ambos son mecanismos que aún no funcionan eficientemente a estas edades lo que provoca bajos niveles del anticuerpo en las mucosas.

En cuanto al isotipo IgA en suero se observó diferencias significativas a lo largo del experimento a favor del grupo 7d lo que parece indicar que los componentes necesarios para generar la IgA circulante aún están inmaduros o ausentes en los animales del grupo 2d (31, 32, 33, 54). Mientras que en las mucosas se puede considerar un mismo nivel de respuesta en ambos grupos porque solo se dieron diferencias en el día 27 en la muestra nasal, al día 20 en saliva y a los días 20 y 27 en secreción vaginal todas a favor del grupo 7d, lo que plantea interesantes posibilidades sobre la inmunidad perinatal en las mucosas,

pues sugiere que, aunque la respuesta sistémica podría afectarse, argumento presente en la literatura de la inmadurez inmunológica en animales jóvenes (1, 30, 31, 32, 33), la respuesta mucosal podría actuar eficientemente aún en etapas muy tempranas de la vida (42, 45, 52, 60, 61).

La forma en que se dio la respuesta de la IgA en suero y mucosas fue diferente, ya que para suero el pico de respuesta se dio después de la segunda inmunización, mientras que en las mucosas ocurrió después de la aplicación de la IN, este efecto se aclara con que las inmunizaciones SC están más enfocadas a generar una respuesta sistémica mientras que la IN está enfocada a generarla a nivel local (1, 2, 3, 4). Que se haya observado respuesta en saliva como en secreción vaginal es debido al sistema inmune mucosal común y una inmunización IN en animales adultos genera una buena respuesta de anticuerpos en ambos nichos (4, 59).

Ahora haciendo la comparación en cuanto a la concentración con el trabajo descrito anteriormente (2) tanto en suero como en las muestras nasales el grupo 7d presenta una concentración promedio más alta que en el grupo de cerdos destetados con el mismo protocolo de inmunización, cosa similar con la presencia de IgG en mucosas en los grupos 2d y 7d y la ausencia de esta en el grupo de dicho experimento (2) y que se ha observado ese efecto en ratones (61) mencionando que la edad altera la respuesta y el comportamiento del sistema inmune y a nivel mucosas sufre variaciones más temprano que a nivel sistémico con el objetivo de proveer una mejora en la inmunidad de los animales jóvenes en contra de los diversos agentes infecciosos (61).

En cuanto a la diferencia de concentración entre los isotipos analizados la mayor diferencia se encuentra a nivel sérico, siendo casi 30 veces mayor la de IgG. Por lo que el sistema inmune de esos lechones tuvo una mejor capacidad para producir este anticuerpo y es debido a que las primeras dos inmunizaciones, que fueron SC, promueven en mayor nivel una respuesta sistémica.

Estos resultados son importantes porque muestran que los lechones lactantes pueden generar una respuesta inmune tanto a nivel sistémico como en mucosas con un protocolo mixto de inmunización y que los rangos entre las edades manejadas no presentan alteraciones constantes o muy diferenciadas en la capacidad de la respuesta inmunológica.

9. CONCLUSIONES

Aplicando un protocolo de inmunización mixto SC/SC/IN, en animales lactantes, utilizando como antígeno OVO-albúmina se logra inducir una respuesta inmunológica de anticuerpos tanto a nivel sistémico como a nivel local. Planteándose la posibilidad de generar protocolos de inmunización, contra patógenos que impactan a las producciones, que promuevan un respuesta inmune local y sistémica en animales lactantes utilizando vías de administración mixtas para no solo auxiliarse de adyuvantes para lograr tal objetivo. Teniendo en consideración la edad en que serán inmunizados ya que influirá en la generación de anticuerpos, como se observó con la IgA a nivel sérico con los animales que iniciaron el protocolo a los 7 días de edad, más sin embargo fue estadísticamente similar la respuesta a nivel de mucosas en ambos grupos estudiados.

10. APÉNDICE

Soluciones para la técnica de ELISA

-Solución General

En agua destilada se mezcla:

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) a 50 mM

Cloruro de Sodio (NaCl) a 0.14 M

Y se ajusta a pH 8

-Solución de lavado

A la solución general se le agrega 0.05% de Tween-20

-Solución de dilución

A la solución de lavado se le agrega un 1% de albúmina sérica bovina

11. REFERENCIAS

- 1) TIZARD IR. Introducción a la inmunología veterinaria. 8a. ed. España: Elseiver, 2009 pp. 234-235, 245-248, 252-254.
- 2) ALVARADO GC. Estudio de las vías alternas de inmunización para obtener respuesta inmune en mucosas, en cerdos destetados, evaluada por la técnica de ELISA (tesis de licenciatura). Cuatitlan Izcalli (Edo. de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuatitlan-UNAM, 2011.
- 3) BRANDTZAEG P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces (revisión). *Vaccine* 2007;25:5467 – 5484.
- 4) MCGHEE JR, MESTECKY J, DERTZBAUGH MT, ELDRIDGE JH, HIRASAWA M, KIYONO H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development (revisión). *Vaccine* 1992; 2: 75 – 88
- 5) INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA. Censo agropecuario 2007. México: INEGI 2009.
- 6) FIDEICOMISOS INSTITUIDOS EN RELACIÓN CON LA AGRICULTURA. Panorama agroalimentario: Carne de porcino, 2010 – 2011. México: FIRA 2010 URL:
http://www.cmp.org/noticias/Panorama_Agroalimentario_Carne_Porcino_2010.pdf pp 16
- 7) RODRÍGUEZ-BUENFIL J, ALLAWAY CE, ALVAREZ-FLEITES MJ, SEGURA-CORREA JC, ALZINA- LÓPEZ A. Identificación de los factores

asociados a la mortalidad de lechones lactantes en una granja porcina en el estado de Yucatán, México. Rev Biomed 1996; 7: 147-152

- 8) GARCÍA D, FLORES R. Enfermedades respiratorias de los cerdos. (actualización 6 feb 2006 citado 2011). Disponible en: http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=120&cve_empresa=69.
- 9) WILLIAMS JJ, TORRES-LEÓN MA, SANSOR-NAH R. Prevalencia, caracterización y extensión de las lesiones en pulmones de cerdos sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán, México. Rev Biomed 2000; 11: 25-32.
- 10) MORILLA GONZALEZ A. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. México: INIFAP-SAGAR y PAIPEME, A.C., 1997.
- 11) BAL SM, DING Z, VAN RIET E, JISKOOT W, BOUWSTRA JA. Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome? (revision). J Control Release 2010; 148: 266 – 282.
- 12) STRAW BE, D'ALLAINE S, MENGELINE W, editores. Diseases of swine. 8th ed.: Iowa State press, Estados Unidos 1999 pp. 804-809, 814-813.
- 13) MORILLA GONZÁLEZ A. Inmunología veterinaria. México: Editorial Diana, 1989: Pp. 159-160, 163-164, 169-172.
- 14) MOREIN B, BLOMQUIST G, HU K. Immune responsiveness in the neonatal period. J Comp Path 2007; 137: S27-S31.
- 15) LEVAST B, DE MONTE M, CHEVALEYRE C, MELOS, BERRI M, MANGIN F, ZANELLO G, LANTIER I, SALMON H, MEURENS F.

- Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL 17 mRNA expression. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 137: 261-268.
- 16) SALMON H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 1-2: 143-155.
 - 17) CURTIS J, BOURNE FJ. Half-lives of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in the serum of new-born pigs. *Immunology* 1973; 24: 147 – 155.
 - 18) BONILLA FA, OETTEGEN H. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: S33-S38.
 - 19) BUTLER JE, SINKORA M. The isolator piglet: a model for studying the development of adaptive immunity. *Immunol Res* 2007; 39: 33-55.
 - 20) BAILEY M, HAVERSON K, INMAN C, HARRIS C, JONES P, CORFIELD G, MILLER B, STOKES C. The influence of environment on development of the mucosal immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108: 189-198.
 - 21) PABST R, BINNS RM. The immune system of the respiratory tract in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 43: 151-156.
 - 22) PABST R. The respiratory immune system of pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 54: 191 -195.
 - 23) BRANDTZAEG P, PABST R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* 2004; 11: 570 – 577.

- 24) TAKAHASHI Y. Memory B cells in systemic and mucosal immune response: implications for successful vaccination (revisión). *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71 (10): 2358 – 2366.
- 25) SHIKINA T, HIROI T, IWATANI K, JANG MH, FUKUYAMA S, TAMURA M, KUBO T, ISHIKAWA H, KIYONO H. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut- associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J Immunol* 2004; 172: 6259 – 6264.
- 26) KIYONO H, FUKUYAMA S. NALT- versus peyer´s-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004, 4(9):699-710.
- 27) LINGHUA Z, XINGSHAN T, FENGZHEN Z. In vivo oral administration effects of various oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in the immune response to pseudorabies attenuated virus vaccine in newborn piglets. *Vaccine* 2008; 26: 224-223.
- 28) SNOEK V, PETERS I, COX E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species (revisión). *Vet Res* 2006; 37: 455 – 467.
- 29) MESTECKY J, LAMM ME, McGHEE JR, BIENENSTOCK J, MAYER LI, STROBBER W editorers. *Mucosal immunology*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic, 2005 pp. 154-155, 267-276, 307-309.
- 30) MARSHALL-CLARKE S, REEN D, TASKER L, HASSAN J. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol today* 2000; 21: 35 – 41.
- 31) KOVARIK J, SIEGRIST CA. Immunity in early life. *Immunol Today* 1998; 19(4):150-152.

- 32) MOREIN B, ABUSUGRA I, BLOMQVIST G. Immunity in neonates. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 207 – 213.
- 33) SIEGRIST CA. The challenge of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Path* 2007; 137: S4 – S9.
- 34) BUTLER JE, SINKORA M, WERTZ N, HOLTMEIER W, LEMKE CD. Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology (revisión). *Vet Res* 2006; 37: 417 – 441.
- 35) BUTLER JE, WEBER P, SINKORA M, BAKER D, SCHOENHERR A, MAYER B, FRANCIS D. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J Immunol* 2002; 169: 6822 – 6830.
- 36) SINKORA J, REHAKOVA Z, SINKORA M, CUKROWSKA B, TLASKALOVA-HOGENOVA H. Early development of immune system in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87: 301 – 306.
- 37) VEGA-LÓPEZ MA, TELEMO E, BAILEY M, STEVENS K, STOKES CR. Immune cell distribution in the small intestine of the pig: Immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 37: 49-60.
- 38) VEGA-LÓPEZ MA, BAILEY M, TELEMO E, STOKES CR. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 44: 319-327.

- 39) VEGA-LÓPEZ MA, ARENAS-CONTRERAS G, BAILEY M, GONZALEZ-POZOS S, STOKES CR, ORTEGA G, MONDRAGON-FLORES R. Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Developmental Immunology* 2001; 8(2): 147-158.
- 40) INMAN CF, JONES P, HARRIS C, HAVERSON K, MILLER B, STOKES C, BAILEY M. The mucosal immune system of the neonatal piglet. *The Pig Journal* 2005; 55: 211 – 222.
- 41) STOKES CR, BAILEY M, HAVERSON K, HARRIS C, JONES P, INMAN C, PIÉ S, OSWALD IP, WILLIAMS BA, AKKERMANS ADL, SOWA E, ROTHKÖTTER HJ, MILLER BG. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning (revisión). *Anim Res* 2004; 53: 325 – 334.
- 42) HARRIS NL, SPOERRI I, SCHOPFER JF, NEMBRINI C, MERKY P, MASSACAND J, URBAN JR. JF, LAMARRE A, BURKI K, ODERMATT B, ZINKERNAGEL RM, MACPHERSON AJ. Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *J Immunol* 2006; 177: 6256 – 6262.
- 43) BAILEY M. The mucosal immune system: Recent developments and future directions in the pig. *Dev Comp Immunol* 2009; 33: 375-383.
- 44) ENIOUTINA EY, VISIC D, MCGEE ZA, DAYNES RA. The induction of systemic and mucosal immune responses following the subcutaneous immunization of mature adult mice: characterization of the antibodies in mucosal secretions of animals immunized with antigen formulations containing a vitamin D3 adjuvant. *Vaccine* 1999; 17: 3050 – 3064.

- 45) SABIROV A, METZGER DW. Intranasal vaccination of neonatal mice with polysaccharide conjugate vaccine for protection against pneumococcal otitis media. *Vaccine* 2006; 24: 5584-5592.
- 46) INSKEEP TK, STAHL C, ODLE J, OAKES J, HUDSON L, BOST KL, PILLER K. Oral vaccines formulations stimulate mucosal and systemic antibody responses against staphylococcal enterotoxin B in a piglet model. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 7(8): 1163– 1169.
- 47) BAILEY M, HAVERSON K. The postnatal development of the mucosal immune system and mucosal tolerance in domestic animals (revisión). *Vet Res* 2006; 37: 443 – 453.
- 48) GIRI PK, SABLE SB, VERMA I, KHULLER GK. Comparative evaluation of intranasal and subcutaneous route of immunization for development of mucosal vaccine against experimental tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005, 45: 87-93.
- 49) ASANUMA H, AIZAWA C, KURATA T, TAMURA S. IgA antibody-forming cell responses in the nasal-associated lymphoid tissue of mice vaccinated by intranasal, intravenous and/or subcutaneous administration. *Vaccine* 1998; 16: 1257–1262.
- 50) SELBITZ HJ, MOSS M editores. *Vacunación de los animales domésticos*. España: Acribia, 2002.
- 51) GERDTS V, MUTWIRI GK, TIKOO SK. Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Vet. Res.* 2006 37: 487–510

- 52) PAL S, PETERSON EM, DE LA MAZA LM. Vaccination of newborn mice induces a strong protective immune response against respiratory and genital challenges with *Chlamydia trachomatis*. *Vaccine* 2005; 23: 5351 – 5358.
- 53) PERRIN J, COURSAGET P, NTAREME F, CHIRON JP. Hepatitis B immunization of newborns according to a two dose protocol. *Vaccine* 1986; 4: 241 – 244.
- 54) SIEGRIST CA. Neonatal and early life vaccinology (revisión). *Vaccine* 2001; 19: 3331-3346.
- 55) MORILLA A, DIOSDADO F, SOCCI GUADALUPE, AMARO R, AGUIRRE F. Vacunas y calendarios de vacunación en los cerdos. Desplegado informativo no. 29 SAGARPA-INIFAP, 2004.
- 56) VIDOR E. Vaccination of newborns against hepatitis A in the presence of maternally derived antibodies. *J Comp Path* 2007; 137: S42 – S45.
- 57) PASTORET PP. Challenges and issues of early life vaccination in animals and humans. *J Comp Path* 2007; 137: S2-S3.
- 58) LAWHORN B, MCCONNELL S, KIT M, KIT S. Vaccination of newborn pigs in the presence of low levels of pseudorabies colostral antibodies. *Vaccine* 1994; 12: 601-606.
- 59) WU HONG-YIN, ABDU S, STINSON D, RUSSELL MW. Generation of female genital tract antibody responses by local or central (common) mucosal immunization. *Infect. Immun.* 2000; 68(10): 5539-5545.

- 60) MEDINA M, VILLENA J, VINTIÑI E, HEBERT ME, RAYA R, ALVAREZ S. Nasal immunization with *Lactococcus lactis* expressing the *Pneumococcal* protective protein a induces protective immunity in mice. *Infect. Immun.* 2008; 76(6): 2696-2705.
- 61) KOGA T, MCGHEE JR, KATO H, KATO R, KIYONO H, FUJIHASHI K. Evidence for early aging in the mucosal immune system. *J. Immunol.* 2000; 165(9):5352- 5359.