



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO DE VÍAS ALTERNAS DE INMUNIZACIÓN PARA OBTENER  
RESPUESTA INMUNE EN MUCOSAS, EN CERDOS DESTETADOS,  
EVALUADA POR LA TÉCNICA DE ELISA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:  
GABRIELA ALVARADO CÉSAR**

**ASESORES:** Ph. D. Marco Antonio Vega López  
MVZ. MC. Alejandro Vargas Sánchez

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.**

**2011**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES-CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
 Jefa del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Estudios de vías alternas de inmunización para obtener respuesta inmune  
 en mucosas, en cerdos destetados, evaluada por la técnica de ELISA.

Que presenta la pasante Gabriela Alvarado César  
 Con número de cuenta: 30166488-0 para obtener el título de:  
 Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlan Izcalli, Mex. a 17 de Mayo de 2011.

PRESIDENTE Dr. Tonatiah Alejandro Cruz Sánchez  
 VOCAL Dr. Marco Antonio Vega López  
 SECRETARIO MVZ. Alejandro Paredes Fernández  
 1er SUPLENTE Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán  
 2º SUPLENTE MVZ. Jesús Arturo Sandoval Romero

*Este proyecto fue parcialmente financiado por el  
CONACYT (proyecto 60941) y el Instituto de Ciencia y  
Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con el proyecto  
de Evaluación de nuevos métodos de vacunación mucosal.*

*Responsable del proyecto Ph. Dr. Marco Antonio Vega  
López.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Ph.Dr. Marco Antonio Vega López, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto de investigación, por el tiempo brindado para transmitir su experiencia, que gracias a eso se logró terminar este trabajo.

Al M.C. Alejandro Vargas Sánchez por el apoyo en la parte experimental dentro del Centro de enseñanza, investigación y extensión en producción porcina (CEIEPP)

A la Bióloga María del Carmen Ramírez Estudillo, por todo el apoyo dentro del laboratorio y por haberme enseñado la técnica de Elisa.

A la Técnica Gloria Lazo Vázquez por su apoyo en la toma de muestras y en el laboratorio.

Al E.P.A M.V.Z. Alector Bautista Lozano, por compartir conmigo toda su experiencia profesional.

Al M.V.Z. Roberto Martínez Rodríguez por darme la oportunidad de realizar la tesis en el CEIEPP.

A todos mis profesores por la horas dedicadas a la formación profesional de todos los alumnos y que son una parte importante en la formación de cada Médico Veterinario.

A mis padres por todo el apoyo que me han brindado en mi vida.

A Guillermo García Mollinedo por todo el apoyo brindado durante mi carrera y mi vida.

A mis hermanos Vero y Paco, porque aun cerca o muy lejos tenía todo su apoyo

## DEDICATORIAS

A mis padres por ser una gran ejemplo en mi vida, su gran apoyo y sobre todo por su incondicional amor. Estoy en deuda con ustedes **LOS AMO**.

A mis hermanos por que han sido un gran apoyo en mi vida y sé que siempre puedo contar con ustedes. **LOS QUIERO**

A Guillo por ser un gran ser humano, por todo el apoyo y amor que me ha brindado, eres una inspiración para mí. **TE AMO**

✝ A Papá Leandro y Mamá Lucrecia por haberme dado a la mejor mamá del mundo, por sus cuidados, amor y por haberme inculcado el gran amor hacia los animales, porque fueron la principal inspiración para que estudiara esta maravillosa carrera. **LOS AMO** y sé que siempre están conmigo.

A mi tía Margarita que es como mi segunda madre, gracias por tu amor y tus cuidados. **TE QUIERO MUCHO.**

A mi Papá Fili y Tía Meche, por haberme dado al papá más maravilloso y cariñoso y sé que gracias a su gran labor como padres y seres humanos se logro formar. **LOS QUIERO.**

A mis grandes amigas Brenda, Sandy y Rosita que fuero mi mejor compañía durante tantos años y gracias por todos los bellos momentos que compartimos, aunque sé que los mejor están por venir, **LAS QUIERO MUCHISISISISIMO.**

A mis adorables y traviesos amigos de la UNIVERSIDAD, Gene, Sac, Ale, Juan Tovar, Cirani y Rosa, gracias por todas las experiencias que vivimos juntos y por haberme permitido compartir toda la carrera a su lado y por ser grandes amigos. **LOS ADORO.**

A todos con los que compartir grandes experiencia y aventuras en el CEIEPP, Levi, Rosa, Lulú, Alector, Marisol, Eunice, David, Alfredo, Yazmin, Carmen, Felix, Ernesto y Juan Carlos, **nunca los olvidare.**

A Toda mi familia (Alvarado Lagunas y César Mauleón) porque siempre serán parte de mi vida, los quiero mucho.

A la Familia Mollinedo Reynoso y García González, por haberme abierto las puertas de su casa y compartir conmigo bellos momentos. **GRACIAS.**

A Genaro Mollinedo y Hortensia Reynoso, por darme un cariño especial y estar siempre pendiente de mí. **LOS QUIERO.**

A mi †Raffy, †Trypo, Sid, Roto y Nico, que son o han sido una hermosa compañía y una muestra de nobleza y amor.

Y una dedicatoria especial a todos los hermosos animalitos que han sido o serán parte de mi formación, por que sin ellos no existiría esta esplendida carrera.

## CONTENIDO

INDICE	PÁGINA
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Destete.....	4
1.2 Enfermedades de los cerdos destetados.....	6
1.2.1 Enfermedades respiratorias en los cerdos destetados.....	6
1.2.2 Enfermedades digestivas en los cerdos destetados.....	8
1.3 Inmunidad innata.....	10
1.3.1 Mecanismos protectores no inmunitarios.....	11
1.3.2 Mecanismos protectores inmunitarios.....	11
1.3.2.1 Inmunidad Adquirida.....	12
1.3.2.2 Memoria Inmunológica.....	13
1.3.3 Inmunoglobulinas de las mucosas.....	14
1.3.4 Inmunidad del lechón destetado.....	15
1.4 Vacunas.....	17
1.5 Importancia de la vacunación.....	18
1.6 Vías de administración de vacunas.....	19
1.6.1 Vías de inmunización parenteral (intramuscular y subcutánea).....	19
1.6.1.1 Respuesta a la vacunación parenteral.....	20
1.6.2 Vía transcutánea.....	21
1.6.3 Vías de inmunización mucosal más comunes (oral e intranasal).....	22
1.6.3.1 Respuesta a la vacunación mucosal.....	23
1.6.4 Vía oral.....	24
1.6.4.1 Respuesta a la vacunación oral.....	24
1.6.5 Vía intranasal.....	26
1.6.5.1 Respuesta a las vacunación intranasal.....	27
1.6.6 Protocolos de inmunización combinados.....	29
1.7 Determinación de la respuesta inmune.....	30

1.8	Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).....	32
1.9	Colección y procesamiento de secreciones de las mucosas.....	33
2	Justificación.....	35
3	Hipótesis.....	36
4	Objetivo general y particular.....	37
5	Metodología.....	38
6	Resultados.....	44
7	Discusión.....	64
8	Conclusión.....	70
9	Bibliografía.....	71

## RESUMEN

ALVARADO CÉSAR GABRIELA. Estudio de vías alternas de inmunización para obtener respuesta inmune en mucosas, en cerdos destetados, evaluada por la técnica de ELISA. Ph. D. Marco Antonio Vega López, MVZ. MC. Alejandro Vargas Sánchez.

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes vías de inmunización para obtener respuesta inmune sistémica y local en cerdos destetados, contra ovoalbúmina utilizada como antígeno soluble. Se realizaron dos experimentos con la finalidad de comparar los resultados entre ellos. En el primer experimento se consideraron 4 grupos y se inmunizaron los días 0 y 14, el primer grupo fue inmunizado por la vía transcutánea en dos ocasiones, el segundo por la vía subcutánea, el tercero por la vía subcutánea y transcutánea y el cuarto fue el grupo control. La respuesta a nivel sérico de IgG e IgA fue mayor en el segundo grupo siendo su pico al día 21 y 49 post inoculación respectivamente ( $604.22 \pm 55.18$   $\mu\text{g/ml}$  de IgG, y  $372.17 \pm 110.37$  ng/ml de IgA). En secreción nasal la respuesta de IgG fue muy baja en todos los grupos y la de IgA fue significativamente más alta en el segundo y tercer grupo ( $166.18 \pm 14.81$  y  $161.69 \pm 29.72$  ng/ml respectivamente) después de la segunda inmunización. A nivel de saliva el grupo que tuvo mejor respuesta de IgA fue el segundo grupo teniendo su pico el día 28 post inoculación ( $22.9 \pm 5.5$  ng/ml). Después de realizar este experimento se observó que el grupo que mejor respuesta obtuvo fue el subcutáneo – subcutáneo (SC-SC) y se decidió hacer un segundo experimento utilizando tres inmunizaciones al día 0, 10 y 20 para cada grupo, el primer grupo fue subcutáneo - transcutáneo - transcutáneo, el segundo grupo subcutáneo - subcutáneo – intranasal, el tercero subcutáneo - transcutáneo - intranasal y el cuarto grupo fue el control. En suero la respuesta de IgG e IgA fue estadísticamente igual para los 3 grupos inmunizados teniendo su pico el día 27 para las dos inmunoglobulinas, los valores para IgG fueron de  $268.5 \pm 98.5$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $117.9 \pm 61.4$   $\mu\text{g/ml}$  y  $230.1 \pm 114.2$   $\mu\text{g/ml}$ , además, el tercer grupo mantuvo niveles significativamente ( $p < 0.05$ ) elevados de IgG hasta el día 57 post-inoculación comparado con el grupo control ( $167.4 \pm 112.8$   $\mu\text{g/ml}$ ). En cuanto a la IgA sus valores fueron de  $170.7 \pm 31.1$  ng/ml,  $230.5 \pm 91.8$  ng/ml y  $252.9 \pm 100.9$  ng/ml y también este último grupo se mantuvo diferente contra el control el día 57 ( $71.3 \pm 3.8$  ng/ml). En secreción nasal la respuesta de IgA tuvo su pico al día 27 con valores mayores a 20 ng/ml entre los grupos y

manteniéndose diferentes contra el control, en los grupos subcutáneo-subcutáneo-intranasal y subcutáneo-transcutáneo-transcutáneo hasta el día 57 post-inoculación. En saliva los mejores grupos fueron el subcutáneo-subcutáneo-intranasal y subcutáneo-transcutáneo-intranasal con valores mayores de 50 ng/ml, manteniéndose diferentes contra el control hasta 57 días post inoculación. Los valores obtenidos del primer experimento en las secreciones de interés (saliva y secreción nasal) fueron más altos en algunos muestreos pero poco constantes, en el segundo experimento los valores fueron más consistentes, porque se pudo observar que la tercera inmunización mejoró notablemente la respuesta y el grupo que mejor respuesta tuvo en esas secreciones fue el grupo subcutáneo – subcutáneo- intranasal que se mantuvo diferente hasta 57 días post-inoculación contra el grupo control. Este protocolo de inmunización es mejor respecto al primero ya que la respuesta fue más constante y duradera que los anteriores, en saliva y secreción nasal, que son donde se buscaba tener respuesta.

## 1 INTRODUCCIÓN

La porcicultura en México es una de las principales actividades económicas del subsector pecuario (Germán *et al.*, 2005; Ortiz, 2008), ya que el consumo de carne de cerdo ocupa el tercer lugar a nivel nacional (Germán *et al.*, 2005) . Sin embargo, la porcicultura enfrenta problemas que aumentan sus costos de producción, entre ellos están: precio alto de los insumos y un bajo precio de la carne de cerdo (Trevizo, 2007). También hay factores que en otras épocas no eran considerados, pero que hoy tienen un papel importante en el sector, como son los recursos humanos y la bioseguridad. Esto, sumado a los pilares básicos de la producción como son: la alimentación, la sanidad, la genética y el manejo, son aspectos fundamentales para poder lograr rentabilidad en el negocio del cerdo (Porcaro, 2007). Además de los factores anteriores, existen problemas sanitarios en la mayoría de las granjas porcinas debidas a virus, bacterias y enfermedades asociadas, las cuales resultan en mortalidades por arriba del 15% de destete a venta, más animales de desecho y otros cerdos que se pierden en destete y engordas, bajan la productividad y rentabilidad de la producción porcina (Trevizo, 2007). Las enfermedades respiratorias son el principal problema patológico y causa de muerte en las unidades de producción porcina. Actualmente en muchas explotaciones existen problemas graves en los cerdos en la fase de transición como son infecciones por virus y bacterias que se arrastran hasta la engorda. Es posible que las causas de esta situación estén mas relacionadas con los cambios en los sistemas de producción que han experimentado muchas unidades de producción porcina en los últimos años, que con la aparición de nuevos patógenos, donde se han impuesto sistemas, como el todo dentro todo fuera y producción en multisitios. Actualmente las unidades de producción porcina son mas grandes, tienen alta tasa de reposición de diferentes lugares, destetes más precoces con rango de edad variables, transiciones multiorigen y, en general, un manejo de los cerdos muy diferente. Esto hace que haya una exposición a patógenos muy variable dentro de las naves de reproductoras, por lo que se ve afectado el estado inmunitario de los cerdos, a nivel de grupo o individual, la epidemiología y transmisión de las infecciones dentro de la población se vuelven más difíciles de predecir y controlar. Esto implica una gran variabilidad en los niveles de anticuerpos pasivos que suministra las cerdas a sus lechones a través del calostro. Como resultado, y al igual que

ocurre en las cerdas, aparecen subpoblaciones de lechones jóvenes susceptibles a enfermedades, que se manifiestan clínicamente en el crecimiento-engorda (Aldaz, 2002). Otro aspecto importante para la producción porcina es el destete, que generalmente es uno de los cuellos de botella en las unidades de producción porcina, y es aquí en donde se debe guardar sumo cuidado para no propiciar un contratiempo posterior que afecte el desarrollo de los animales (Unión Ganadera de Jalisco, 2008). Las vacunas son la herramienta más valiosa que la inmunología ha generado, gracias a ella se han erradicado, disminuido su frecuencia y gravedad de enfermedades (Rojas, 2006).

## 1.1 EL DESTETE

El destete, de las crías jóvenes de todos los mamíferos, es un proceso normal y paulatino, en el transcurso del cual los animales comienzan a ingerir alimentos sólidos de forma simultánea con la reducción de la producción láctea de la madre, de tal modo que, gradualmente, el animal joven suprime su dieta láctea (Buxadé, 1996; García, 2002; Pluske *et al.*, 2003). Esta etapa es una de las más críticas en la vida de un lechón, puesto que se suman una serie de factores estresantes y cambios fisiológicos (García, 2002). En condiciones naturales los lechones serían destetados de forma gradual a lo largo de unas 11 semanas. Por lo tanto, el destete brusco que experimentan entre las 3-4 semanas de vida en sistemas intensivos, contrasta con el desarrollo natural de este proceso. Probablemente, ésta es una de las causas que explican la tasa de mortalidad importante que se observa durante esta fase (3-4%) y el empeoramiento de los índices productivos (Forcada, 1997; García, 2002). En la producción porcina, los lechones tienen un cambio rápido de una dieta líquida a base de leche de la madre a una sólida consistente en gran parte de productos de origen vegetal (Buxadé, 1996). En las granjas comerciales la edad del destete se ha reducido de unas 8 semanas en 1950 y 1960 a un promedio de 14 a 28 días de edad, diferenciando a nivel comercial dos sistemas: el destete tradicional que va de 35 a 45 días y el destete temprano o precoz de 7, 14, 21 y 28 días, de acuerdo al grado de tecnificación de la granja (Pluske *et al.*, 2003). La reducción en la edad de destete sirve para incrementar la

productividad, tanto en el crecimiento y en la crianza de las pjaras. Sin embargo, el destete a edades más tempranas presenta muchos problemas referentes a nutrición, alojamiento, salud, comportamiento y requerimientos ambientales de los cerdos jóvenes (Pluske *et al.*, 2003).

En el momento del destete el lechón se enfrenta a un conjunto de factores estresantes nutricionales (de leche materna a concentrado), físicos (cambio de ambiente, temperatura) y psicológicos (separación de la madre y hermanos, y mezcla con otras camadas, manejo) (Forcada, 1997; García, 2002). Por otro lado, el intestino delgado del lechón experimenta cambios morfológicos y fisiológicos importantes durante las 24 h posteriores al destete, fundamentalmente atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas intestinales, reducción de la actividad específica de algunas enzimas como la lactasa y sucrasa, así como la disminución de la capacidad de absorción. Durante esta fase se producen brotes frecuentes de diarrea asociada a la proliferación de bacterias enterotoxigénicas en el intestino delgado y/o la fermentación de los nutrientes menos digestibles de la dieta en el intestino grueso, además de que en este momento se gestan la mayoría de los problemas respiratorios (García, 2002). El movimiento y algunos factores ambientales determinan el establecimiento y la proliferación de microorganismos, así como las alteraciones de la flora intestinal conduciendo al desarrollo de enteritis y diarreas (Buxadé, 1996; García, 2002). Las posibles causas de desequilibrio serían:

- a) Insuficiente acidez en el estómago.
- b) Niveles enzimáticos por debajo de lo necesario.
- c) Dietas alimenticias no adecuadas para el lechón.
- d) Alteraciones de la pared intestinal.

Se ha visto que en destetes tempranos, la producción enzimática está casi siempre por debajo de lo requerido para digerir, pero además, la acidez se hace insuficiente. Esto permite explicar la frecuencia de fenómenos digestivos negativos en los cerdos (Buxadé, 1996).

En la mayoría de los sistemas intensivos resulta inevitable mezclar distintas camadas después del destete. Como en todas las especies sociales, en el cerdo se establecen unas

relaciones jerárquicas que determinan la prioridad de acceso a los recursos. Cuando se incorporan nuevos individuos en el grupo, deben restablecerse estas relaciones, mediante interacciones agresivas que dan lugar a un cierto nivel de estrés social (Forcada, 1997; Medel *et al.*, 1999; García, 2002; Chapinal *et al.*, 2006; Cano y Pijoan, 2008). La capacidad de adaptación del lechón a estos cambios va a influir no sólo en su bienestar en estas fases, sino en otros parámetros productivos durante la engorda (Forcada, 1997; Medel *et al.*, 1999; Chapinal *et al.*, 2006; Cano y Pijoan, 2008). El objetivo principal de la vacunación es evitar las enfermedades infecciosas (Rojas, 2006).

## **1.2 ENFERMEDADES EN LOS CERDOS DESTETADOS**

Los factores asociados al destete; representan cambios muy agresivos que le causan inmunosupresión, cuya principal consecuencia clínica es la presentación de problemas infecciosos tales como diarreas y neumonías (García, 2002). Estos problemas ocasionan pérdidas en la producción por un aumento de la conversión alimenticia y disminución en la ganancia diaria de peso, provocando con ello mayor número de días a mercado, así como la presencia de animales retrasados y/o enfermos crónicos; además de un aumento en los costos de producción debido a la medicación, así como el incremento del porcentaje de mortalidad en las diferentes etapas de producción (González, 2000).

### **1.2.1 ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN LOS CERDOS DESTETADOS**

Las enfermedades respiratorias tienen muchos agentes etiológicos que pueden actuar de forma individual o colectiva. Estas patologías tienen orígenes fundamentales que son, bacteriano y/o víricos (Caballero de la Calle, 1996; González, 2000; Aldaz, 2002; García, 2007). En las afecciones respiratorias del cerdo se consideran dos áreas en donde los microorganismos producen daño. En la parte anterior encontramos a la cavidad nasal y los

cornetes nasales, en este lugar se han encontrado diferentes microorganismos patógenos tanto virales como bacterianos; y en la parte posterior encontramos los pulmones donde se presentan las neumonías, en ella participan muchos agentes infecciosos (Ciprian y Mendoza, 2007). Estas enfermedades son responsables de un elevado número de pérdidas económicas en las explotaciones porcinas de todo el mundo por una disminución de los rendimientos de los animales, un mayor consumo de alimento, un aumento de los ciclos productivos y una pérdida de calidad en las canales, que pueden incluso ser causa de decomiso en rastro (Caballero de la Calle, 1996; Aldaz, 2002; Garcia, 2007).

Tabla 1. PRINCIPALES ENFERMEDADES RESPIRATORIAS QUE AFECTAN AL CERDO DESTETADO (Aiello, 2000)

ENFERMEDAD	ETIOLOGÍA	EDAD	VÍA DE TRANSMISIÓN	VACUNACIÓN
Neumonía enzoótica	<u><i>Mycoplasma hyopneumoniae</i></u>	Todas las edades. 6 semanas	Contacto directo	Primera semana y refuerzo a las 4 semanas de vida. Si son de cerdas vacunadas a las 6 semanas de vida
Rinitis atrófica	<u><i>Pasteurella multocida</i></u> , <u><i>Bordetella bronchiseptica</i></u>	3-8 semanas	Contacto directo con portadores, equipo contaminado	7 días de edad primera aplicación y a los 28 días de edad el refuerzo
Pleuroneumonía	<u><i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i></u>	Cualquier edad, más frecuente en cerdos de 8 semanas	Contacto directo, vectores	6-8 semanas de edad
Estreptococosis	<u><i>Streptococcus suis</i></u>	3-12 semana de edad, con	Vía cutánea, oral o nasal	Múltiples aplicaciones

		mayor incidencia a las 6 semanas		
SRRP	<u>Arterivirus</u> grupo <u>nidovirus</u>	Todas las edades: principalme nte en cerdas lactantes y lechones	Oronasal, vaginal	3-16 semanas
Aujeszky	<u>Herpesvirus</u> porcino tipo 1	Todas las edades: mayor mortalidad lactantes	Oral, nasal	10-14 semanas

### 1.2.2 ENFERMEDADES DIGESTIVAS EN LOS CERDOS DESTETADOS

Las enfermedades digestivas de los lechones recién destetados no son independientes de otras patologías ni de las condiciones medioambientales de la explotación, acabando casi siempre en diarrea (incremento diario de heces con aumento de contenido en agua) que es el signo más común de casi todas estas enfermedades. La transmisión de enteropatías infecciosas se produce por la ruta fecal-oral (Aiello, 2000).

Tabla 2. PRINCIPALES ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES QUE AFECTAN AL CERDO DESTETADO (Aiello, 2000).

ENFERMEDAD	ETIOLOGÍA	EDAD	VÍA DE TRANSMISIÓN	VACUNACIÓN
Colibacilosis entérica	Enterotoxemia por <i>Escherichia coli</i>	Lactantes y de 5 días a 2 semanas después del destete.	Ingestión natural después del nacimiento	IM a los lechones de 5 y 10 días y una segunda aplicación 3 semanas después.
Salmonelosis	<i>Salmonella cholerasuis</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. typhisuis</i>	Todas las edades, más común en los cerdos destetados y fase de crecimiento-finalización	Vía oral Vía intranasal	En cerdos que no han recibido ninguna dosis se recomiendan dos aplicaciones con un intervalo de 2 - 3 semanas. Hembras gestantes 3 semanas antes del parto y lechones después del destete, con una segunda dosis a las 2 - 3 semanas.  Para la vía intranasal 2 mL la 1ª semana de vida
Enteritis rotavírica	<i>Rotavirus</i>	Lactantes y destetados	Vía oral	No hay vacuna

Gastroenteritis transmisible	<u>Coronavirus</u>	Todas las edades.	Vía oral	Lechones vía oral entre el 1er. y 3er. día de edad, una segunda dosis de 3 a 7 días después. Vía parenteral a cerdas gestantes 1 semana antes del parto
Disentería porcina	<u>Brachyspira hyodysenteriae</u>	Todas las edades	Vía Oral	No hay vacunas

### 1.3 INMUNIDAD INATA

Los animales poseen una amplia variedad de mecanismos de defensa en todo el organismo, aunque es por las superficies corporales por donde los microorganismos tratan de invadirlos y es también ahí donde éstos tienen su primer encuentro con las defensas y donde son, en su mayor parte, repelidos o destruidos. Aunque la piel es la más notoria de estas superficies, en realidad representa una pequeña fracción de área corporal expuesta al exterior. Las mucosas de las vías respiratorias, digestiva y urogenital tienen un área por lo menos 200 veces mayor. Estas superficies se defienden por medio de mecanismos protectores inmunitarios y no inmunitarios (Tizard, 2006). El epitelio y sus glándulas asociadas (tal como la glándula salival) protegen con defensas no específicas o innatas incluyendo el moco y proteínas antimicrobianas. No obstante, los antígenos del exterior y los microorganismos frecuentemente atraviesan la barrera epitelial y el tejido mucosal que son sitios con una alta actividad inmunológica (Neutra y Kozłowski 2006).

### **1.3.1 MECANISMOS PROTECTORES NO INMUNITARIOS**

Las vías respiratorias están en íntimo contacto con el interior del organismo, y como parte de su funcionamiento es necesario un libre acceso del aire a los alveolos a través de filtros. El aire que entra en las vías respiratorias se depura de la mayor parte de las partículas suspendidas mediante fenómenos de turbulencia que las orientan hacia las paredes, del tracto que se encuentran cubiertas de moco, al cual las partículas se adhieren. La turbulencia se debe a la conformación de cornetes, tráquea y bronquios. Este filtro de turbulencias permite capturar partículas de tamaño tan pequeño como 5 micrómetros antes de que lleguen a los alvéolos (Tizard, 2006).

Las paredes de las vías respiratorias anteriores están revestidas de una capa de moco producido por células caliciformes, el cual tiene propiedades microbicidas, principalmente porque contiene lisozima e IgA. Este tapiz mucoso mantiene un flujo continuo y transporta secreciones desde los bronquiolos hasta los bronquios y hasta la tráquea por la acción ciliar o, en sentido retrogrado, a lo largo de la cavidad nasal, hasta la faringe. En esta última, el moco sucio es tragado y digerido en el tubo digestivo. Las partículas menores de 5 micrómetros pueden saltar este obstáculo mucociliar y llegar al alveolo, donde son fagocitadas por los macrófagos que ahí se encuentran. Una vez que estas células han ingerido con éxito las partículas, migran hacia el aparato mucociliar y también son transportadas hasta la faringe y eliminadas (Tizard, 2006).

### **1.3.2 MECANISMOS PROTECTORES INMUNITARIOS**

Los principales anticuerpos que se producen en las superficies mucosales son IgA, IgM, IgE e IgG. Algunos de estos, en especial la IgA, actúan por exclusión inmunitaria (Tizard, 2006).

### 1.3.2.1 INMUNIDAD ADQUIRIDA

La inmunidad adaptativa, que se desarrolla cuando los agentes infecciosos logran evadir los mecanismos innatos de defensa y es generada por la penetración de una dosis inicial de antígenos, se hace efectiva sólo después de varios días; tiempo requerido para que los linfocitos T y B reconozcan a dichos antígenos, se diferencien y se conviertan en células efectoras. Sus características, a diferencia de la inmunidad innata son:

**Especificidad:** Debido a que este tipo de respuesta va dirigida específicamente a determinada molécula antigénica, la porción del antígeno que es reconocida por los linfocitos se denomina determinante antigénica o epítipo. Esta fina especificidad existe porque los linfocitos contienen receptores de membrana capaces de identificar y distinguir sutiles diferencias entre diversos antígenos. Se plantea que todos los individuos tienen numerosos clones (conjunto de células derivadas de un precursor simple), cuya progenie cuenta con los receptores de superficie de la célula que les dio origen y pueden responder a determinantes antigénicos específicos para ellas. Así, el desarrollo de clones antígeno-específicos ocurre previo o independiente a la exposición del antígeno, el cual selecciona un clon específico preexistente y lo activa hasta provocar su proliferación y diferenciación (Castellanos *et al.*, 2000).

**Memoria:** Se refiere al incremento en la intensidad de respuesta ante los subsiguientes contactos con el mismo Ag (Castellano *et al.*, 2000).

**Heterogeneidad o diversidad:** El número total de linfocitos con diferentes especificidades en un individuo ha recibido el nombre de repertorio linfocítico, cuya extraordinaria diversidad es el resultado de la variabilidad en la estructura de los sitios donde se unen los antígenos en los receptores linfocíticos (Castellano *et al.*, 2000).

**Multifactorialidad:** La respuesta inmune depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del hospedero que responde. Así, por ejemplo, el tipo, la

virulencia, la cantidad o la dosis del agente agresor y su vía de penetración pueden generar varios tipos de respuestas; pero también la edad y conformación genética del hospedero pueden ser elementos determinantes (Castellano *et al.*, 2000). La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B juegan un papel preponderante; y respuesta inmune celular, donde los linfocitos T son las células fundamentales. Ambas respuestas comienzan con la activación de los linfocitos en los órganos periféricos, causada por la célula presentadora de antígeno (CPA), que alcanza a estos órganos a través de la circulación linfática.

#### **1.3.2.1.2 MEMORIA INMUNOLÓGICA**

Una de las consecuencias más importantes de la respuesta inmune adaptativa es el establecimiento del estado de memoria inmunológica, que estriba en la habilidad del sistema inmune para responder más rápida y eficazmente a microorganismos que han infectado previamente al hospedero y refleja la preexistencia de una población clonalmente expandida de linfocitos antígeno-específicos (Castellano *et al.*, 2000). La respuesta de memoria, conocida también como respuesta secundaria, terciaria, etc., en dependencia del número de exposiciones al mismo antígeno, difiere cualitativamente de la respuesta primaria (Castellano *et al.*, 2000).

Si los microorganismos agresores estimulan la vía humoral de defensa, la subclase TCD4 que predomina es la TH2, cuya función será activar a los linfocitos B, que entonces proliferarán y se diferenciarán en células plasmáticas de anticuerpos (Castellano *et al.*, 2000). La producción de inmunoglobulinas durante la respuesta primaria será pobre, de baja afinidad con los antígenos correspondientes, con predominio de IgM, siendo su duración corta en el tiempo (Castellano *et al.*, 2000).

Durante el primer contacto con el agente patógeno aparecerá una población de células B, que no llegarán a convertirse en células plasmáticas porque se diferenciarán parcialmente:

son las llamadas células de memoria. Ahora bien, para que éstas logren su total diferenciación, se impone un segundo contacto con el mismo agente, que de no ocurrir, ellas quedan circulando, listas para completar su maduración.

Si los antígenos extraños desencadenan la respuesta celular, la subclase TCD4 predominante será la célula TH1 (Castellanos *et al.*, 2000).

### **1.3.3 INMUNOGLOBULINAS DE LAS MUCOSAS**

La inmunoglobulina A (IgA) predomina en las secreciones superficiales. Se encuentra en cantidades importantes en saliva, líquido intestinal, secreción nasal y traqueal, lágrimas, leche, calostro, orina y secreciones de las vías urogenitales (Tizard, 2006). Una característica de la respuesta inmune adaptativa es la producción y secreción local de la IgA dimérica o multimérica. Estos anticuerpos, a diferencia de otros isotipos, son resistentes a la degradación en el ambiente rico en proteasas de la superficie de las mucosas (Neutra y Kozlowski, 2006). La SIgA tiene múltiples funciones en la defensa de las mucosas (Neutra y Kozlowski, 2006), evitando el contacto directo de los agentes patógenos con la superficie de la mucosa, un mecanismo que se conoce como “exclusión inmune” (Tizard, 2006; Neutra y Kozlowski, 2006). Aunque están presentes todos los tipos de inmunoglobulinas en varias secreciones externas, sus niveles absolutos y relativos se caracterizan por ser diferentes a los de plasma (tabla 3). La IgA es la predominante de todos los isotipos de inmunoglobulinas en muchas de las secreciones externas y se considera la característica distintiva. Los niveles de IgA e IgG en secreciones externas son muy inferiores a los niveles séricos (con excepción del calostro) y la IgA es dominante en muchas secreciones (Metzger, 2007). La respuesta inmune mucosal es caracterizada por la producción de la inmunoglobulina A secretora (Berinstein, *et al.*, 2005).

Tabla 3. Concentraciones (mg/ml) aproximadas de IgA en el suero y en diversas secreciones de animales domésticos (Tizard, 2006).

Animal	Suero	Calostro	Leche	Secreción nasal	Saliva	Lágrimas
<b>Caballo</b>	1.7	10	1.3	1.6	1.4	1.5
<b>Bovino</b>	0.3	4	0.1	2	0.56	2.6
<b>Ovino</b>	0.3	4	0.1	0.5	0.90	1.6
<b>Cerdo</b>	2	10	5	---	---	---
<b>Perro</b>	1	2.5	4	---	---	---
<b>Gato</b>	2	1	0.24	---	0.54	---
<b>Pollo</b>	0.5	---	---	----	0.2	0.15

#### 1.3.4 INMUNIDAD DEL LECHÓN DESTETADO

Al nacimiento, el lechón se encuentra desprovisto de anticuerpos y depende de la inmunidad pasiva suministrada por el calostro de la madre, cuya producción dura unas pocas horas. Posteriormente el animal recibe leche materna, que baña las paredes intestinales y proporciona inmunidad local a través de la IgA, así que los anticuerpos ingeridos serán la única protección frente a los microorganismos patógenos (Medel et al., 1999; Cano y Pijoan, 2008). Las inmunoglobulinas calostrales se degradan y diluyen en el torrente sanguíneo de manera progresiva durante las dos primeras semanas de vida. Entre los 14 y 21 días de edad, que es la edad del destete, el lechón se encuentra con los niveles mínimos de anticuerpos (Buxadé, 1996; Medel *et al.*, 1999; Cano y Pijoan, 2008). Esta caída de inmunidad materna complicada por el estrés generado por el cambio brusco de

ambiente, alimento y orden social hacen del destete (3 a 8-10 semanas de vida) un momento crítico desde un punto de vista inmunológico (Medel *et al.*, 1999; Cano y Pijoan, 2008). El lechón no es capaz de producir su propia actividad inmunológica, en cantidades adecuadas, hasta al menos 28-30 días de edad (Cano y Pijoan, 2008), pero no será sino hasta la 6a - 8a semana de vida cuando haya completado su maduración inmunológica (Buxadé, 1996).

Una vez destetados, algunos lechones, que se infectaron de sus madres, comenzarán a excretar microorganismos, otros estarán inmunes por contar aún con inmunidad calostrada que les permitirá defenderse de la infección, pero otro grupo de individuos estará susceptible, bien sea porque no recibió inmunidad materna o porque los anticuerpos ya disminuyeron. En este momento es cuando una infección determinada puede generar una epidemia o simplemente pasar inadvertida, dependiendo de la proporción de individuos infecciosos, susceptibles e inmunes en el grupo.

Intervenciones en masa sobre el núcleo de cerdas incluye estrategias como la vacunación o inoculación simultánea de todos los individuos de la población con el objetivo de exponer a los animales al microorganismo para bajar la proporción de individuos susceptibles e incrementar la inmunidad de rebaño.

Es posible disminuir la proporción de individuos infecciosos mediante la medicación o vacunación en masa y así reducir la prevalencia de las enfermedades en los lechones destetados (Cano y Pijoan, 2008).

La vacunación o inoculación simultánea de todos los individuos de la población con el objetivo de exponer a los animales al microorganismo para reducir la proporción de individuos susceptibles e incrementar la inmunidad de rebaño. También es posible reducir la proporción de individuos infecciosos mediante la medicación o vacunación en masa y así reducir la prevalencia de las enfermedades en los lechones destetados (Cano y Pijoan, 2008).

## 1.4. VACUNAS

Las vacunas son sin duda, la herramienta más valiosa que la inmunología ha generado. Las primeras vacunas se prepararon con los microorganismos completos (inactivados o atenuados) o con sus productos de secreción (toxinas). Estas vacunas, que aún se siguen empleando, se describen como “vacunas de primera generación” (Tabla 4). Con el conocimiento de que los agentes patógenos son entidades constituidas por una gran diversidad de antígenos, la mayoría de los cuales son irrelevantes como inductores de inmunidad, los antígenos identificados como protectores se aíslan, se purifican, se secuencian y se reproducen por síntesis química para usarse como antígenos sintéticos, o sus genes se identifican y se clonan para obtenerlos como antígenos recombinantes, estas son las “vacunas de segunda generación”. Desafortunadamente los antígenos sintéticos son poco inmunogénicos y esto hace necesario el uso de adyuvantes, lo que dificulta un poco su empleo. Los inconvenientes de baja inmunogenicidad, baja estabilidad y alto costo, han impulsado el desarrollo de nuevas vacunas; así se ha llegado a las vacunas de DNA, que se preparan con los genes relevantes insertados en plásmidos o vectores vacunales; estas son las “vacunas de tercera generación” (Rojas-Espinosa, 2006).

Tabla 4. Ventajas relativas de las vacunas con microorganismos vivos y muertos (Tizard, 2006).

<b>Ventajas de las vacunas vivas</b>	<b>Ventajas de las vacunas inactivadas</b>
Se requiere inocular poca dosis	Estabilidad durante el almacenamiento
No se requiere adyuvante	Escasa posibilidad de causar la enfermedad por virulencia residual
Menor probabilidad de causar hipersensibilidad	Escasa probabilidad de contener microorganismos contaminantes
Induce la producción de interferón	
Costo relativamente bajo	

## 1.5. IMPORTANCIA DE LA VACUNACION

Las infecciones representan un enorme desafío para el desarrollo de vacunas mucosales con el objetivo de inducir inmunidad que pueda impedir que el agente infeccioso se adhiera y colonice el epitelio de la mucosa, o pueda penetrar y replicarse en la mucosa, y/o que se pueda bloquear a las toxinas microbianas que afectan al epitelio y a otras células (Holmgren y Czerkinsky, 2005). La vacunación es reconocida como una de las herramientas médicas y veterinarias más efectivas para el control de las enfermedades. De igual manera constituye un arma en Salud Pública para prevenir la diseminación de zoonosis.

Las vacunas funcionan estimulando la respuesta inmunitaria del individuo sin que éste sufra la enfermedad o ponga en riesgo su vida. Una vacuna ideal sería aquella capaz de conferir un grado de inmunidad comparable al provocado por la infección natural. Como esto no ocurre, las vacunas deben aplicarse más de una vez. La mayoría de las vacunas estimulan tanto la respuesta inmune celular como la humoral (Rojas-Espinosa, 2006).

En medicina porcina, el objetivo de la aplicación de un programa de vacunación es el de prevenir y controlar enfermedades infecciosas, mejorar el bienestar animal, y disminuir el costo de producción de los cerdos. Debido a la tendencia mundial hacia una reducción en el consumo de antibióticos, la vacunación masiva representa una herramienta fundamental, no solo para el control de enfermedades, sino para reducir el riesgo de la presencia de residuos químicos en la carne, ofreciendo un beneficio innegable en el ámbito de salud pública. Los programas de vacunación masiva en cerdos, permiten la protección de una proporción importante de individuos al reducir la circulación de los patógenos en la población inmunizada. Esto ha sido útil para la erradicación de enfermedades (Utreta, 2007).

Puesto que un amplio número de microorganismos y micropartículas entran a las vías aéreas con cada respiración, este tracto representa uno de los principales portales para la entrada de virus y patógenos bacterianos (Slayton, 2007). Por ello es importante inducir inmunidad local, y en estos casos sería más apropiado administrar las vacunas en el sitio de invasión microbiana.

## **1.6 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS**

El principal objetivo de la aplicación de vacunas es estimular el sistema inmune del hospedador con el fin de contrarrestar el efecto de la infección (Utreta, 2007).

Dentro de los planes sanitarios en la mayoría de las explotaciones porcinas, el uso de biológicos está muy arraigado y son pocas las entidades infecciosas del cerdo hacia las cuales no se han desarrollado vacunas.

La mayoría de las vacunas disponibles para combatir las enfermedades respiratorias en la pira se aplican por vía parenteral, que es el método más sencillo y común y resulta óptimo para enfermedades en las que sea importante desarrollar inmunidad sistémica, pero ésta no proporciona inmunidad mucosal y por lo tanto la protección contra las enfermedades es incompleta (Aiello, 2000).

### **1.6.1 VÍAS DE INMUNIZACIÓN PARENTERAL (INTRAMUSCULAR Y SUBCUTÁNEA)**

El método más simple y usual para la administración de vacunas es la vía intramuscular (IM) o subcutánea (SC). Por supuesto, estas vías resultan excelentes para grupos relativamente pequeños de animales y en afecciones en las cuales es importante la inmunidad sistémica (Tizard, 2006). La inmunización sistémica asegura de que las cantidades adecuadas de antígeno llegan al tejido linfoide periférico para la inducción de protección contra infecciones, pero es en gran medida ineficaz para proporcionar inmunidad a nivel de las mucosas (Sedgmen *et al.*, 2004). Las vacunas aplicadas parenteralmente generalmente inducen una pobre inmunidad en la mucosa (Bravé *et al.*, 2008).

### 1.6.1.1 RESPUESTA A LA VACUNACIÓN PARENTERAL

La vacunación parenteral induce respuesta de anticuerpos séricos y raramente provoca respuesta de IgA (Berinstein, 2005). Los antígenos inyectados por vía subcutánea generalmente inducen las respuestas más fuertes, lo que probablemente se debe a que el antígeno es capturado por las células de Langerhans y presentado de forma eficaz a los ganglios linfáticos locales; este es el método más utilizado cuando el objeto del experimento es producir anticuerpos o células T específicas contra un antígeno determinado. Los antígenos inyectados o difundidos directamente al torrente sanguíneo tienden a inducir tolerancia, a no ser que se unan a las células del huésped o se inyecten en forma de agregados, que son rápidamente capturados por las células presentadoras de antígeno (Janeway, 2003).

La generación de altos niveles de IgG en suero, a través de la inmunización parenteral, puede ofrecer una fuente de anticuerpos funcionales, siempre que los anticuerpos IgG puedan llegar a la superficie de la mucosa. En este sentido, las secreciones de las vías respiratorias inferiores y el tracto reproductor femenino pueden contener tanto IgG como IgA (Berinstein, 2005).

La inmunización parenteral, proporciona solamente respuesta inmune sistémica, caracterizada por altos niveles de IgG en suero (Giri *et al.*, 2005). Los bajos niveles de IgA en secreciones después de la inmunización subcutánea son consistentes con la idea de que es esencial centrarse en el tejido linfoide asociado a mucosas para inducir respuesta inmune local (Giri *et al.*, 2005).

## 1.6.2 VÍA TRANSCUTÁNEA

La inmunización transcutánea (TC) es la aplicación de un antígeno y adyuvante en la piel para inducir una respuesta específica contra ese antígeno. La inmunización en piel utiliza potentes células dendríticas derivadas de la médula ósea en el exterior de las capas epidérmicas de la piel. Las células dendríticas proporcionan funciones de inmunovigilancia, y cuando son activadas por microorganismos, migran de la piel a los ganglios linfáticos regionales e inducen una respuesta contra el antígeno específico por los linfocitos B y T. La inmunización TC, en adición con agentes inmunoestimulantes (toxinas microbianas o de la señal inflamatoria), en el sitio de la administración del antígeno, proporciona la señal de activación necesaria para que las células dendríticas maduras expresen altos niveles de moléculas coestimuladoras, secreten citocinas y se conviertan en potentes células presentadoras de antígeno capaces de producir una respuesta inmune a la coadministración del antígeno. Esta es una nueva estrategia de inmunización para inducir una respuesta mucosal de IgG e IgA secretora en ratones y humanos, y protección inmunitaria contra desafíos mucosales contra virus y toxinas (Belyakov, 2004). La vía TC también induce inmunidad sistémica mediada por células a péptidos y proteínas enteras, los adyuvantes son necesarios para inducir una buena respuesta inmune contra los antígenos administrados por esta vía (Belyakov, 2004).

La respuesta inmune mucosal es considerada conveniente para detener a los patógenos en el punto de entrada. La inmunización en la piel genera respuesta mucosal en intestino, pulmón, saliva y tracto reproductor de la hembra (Belyakov, 2004). Muchos estudios sobre la inmunización TC han demostrado la potencia de esta ruta de administración contra agentes de enfermedades infecciosas tales como toxinas bacterianas, bacterias vivas y virus (Belyakov, 2004).

### **1.6.3 VÍAS DE INMUNIZACIÓN MUCOSAL MÁS COMUNES (ORAL E INTRANASAL)**

La mayoría de los agentes infecciosos inician la infección tras la interacción con las superficies mucosas que recubren el tracto digestivo, respiratorio o genital (Sedgmen *et al.*, 2004; Holmgren y Czerkinsky, 2005; Berinstein, 2005; Alcón, 2005). La principal defensa de estas superficies es el sistema inmune de la mucosa (Berinstein, 2005). La primera razón para usar la ruta de vacunación mucosal es porque la aplicación local de la vacuna es a menudo necesaria para inducir una respuesta inmune protectora (Sedgmen *et al.*, 2004; Holmgren y Czerkinsky, 2005). Para muchos agentes patógenos, se requiere una protección óptima, probablemente con efectores inmunes mucosales y sistémicos y una estrategia más efectiva para las vacunas mucosales podría ser la combinación del estímulo primario, que implica la distribución sistémica y mucosal (Neutra y Kozlowski, 2006). Gleeson y sus colegas describen que la IgA en saliva ha demostrado ser eficaz para medir la respuesta inmune en la mucosa del tracto respiratorio superior (Gleeson *et al.*, 2000).

En el estudio de Giri y sus colegas se evaluaron dos rutas de inmunización para inducir respuesta inmune sistémica y mucosal. Ellos observaron que la inmunización intranasal confiere mejor protección, particularmente a nivel de pulmón, que la vacunación subcutánea contra tuberculosis en ratones. La inducción de la respuesta inmune del agente proteico requiere el uso de adyuvantes (Giri *et al.*, 2005).

Villena y sus colaboradores, realizaron un estudio para evaluar la inmunización oral y sus resultados mostraron que cuando se usa la vacuna vía oral, es necesario un refuerzo para conferir protección (Villena, 2008).

### 1.6.3.1 RESPUESTA A LA VACUNACIÓN MUCOSAL

La investigación clínica de las vacunas se ha basado en gran medida en la inyección de antígenos, y la mayoría de las vacunas en uso se administra por vía subcutánea o intramuscular (Neutra y Kozlowski, 2006). Esto es comprensible porque la inyección proporciona una cantidad conocida de antígeno en el cuerpo y los resultados en la producción de anticuerpos específicos son fáciles de medir en muestras de sangre (Neutra y Kozlowski, 2006). En contraste, el entendimiento de la inmunidad y desarrollo de vacunas mucosales se ha quedado atrás, en parte porque la administración de las vacunas mucosales y la medición de la respuesta inmune son más complicadas. Las dosis de las vacunas mucosales, que en realidad entran al cuerpo, no pueden ser medidas con precisión y los anticuerpos en la secreción mucosal son difíciles de obtener y cuantificar (Neutra y Kozlowski, 2006). La dieta de todos los animales consiste en un complejo mixto de productos vegetales y animales, la mayoría de los cuales son potencialmente antigénicos (Mowat, *et al.*, 2005). Experimentos realizados en animales indican que la exposición oral o nasal a ciertos antígenos (ej. Proteína básica de mielina, ovoalbúmina) induce un estado de tolerancia sistémica sobre la inmunización sistémica. Este fenómeno se ha documentado en humanos inmunizados intranasal u oralmente. La inmunización sistémica subsecuente con el mismo antígeno demuestra claramente una supresión de la proliferación de células T y reacciones de hipersensibilidad retardada (tolerancia) (Boyaka, *et al.*, 2005). Tolerancia es la ausencia de respuesta del sistema inmunitario contra un antígeno que ha sido reconocido previamente (García, 2007). La supresión de la respuesta Th1 y quizás la Th2 sería contraproducente en las estrategias de inmunización, cuyo objetivo es inducir protección. Sin embargo, cabe destacar que la supresión de la respuesta inmune mediada por células T se produce solo cuando el mismo antígeno es administrado por vía mucosal al animal previamente sensibilizado (Boyaka, *et al.*, 2005).

## **1.6.4 VÍA ORAL**

La vía oral es un medio ideal para el suministro de vacunas profilácticas y terapéuticas, ya que el suministro oral se asocia con administración simple y mejor seguridad. Además, a diferencia de la inmunización sistémica, la administrada oralmente induce respuesta inmune mucosal. Para obtener una inmunización efectiva de vacunas de péptidos y proteínas administradas por vía oral, los antígenos deben ser protegidos para evitar su degradación y la respuesta inmune innata sea activada (Villena, 2008). Además, la administración de vacunas por esta vía tiene la ventaja de que potencialmente pueden llegar al tejido linfoide asociado a mucosas y pueden inducir respuesta inmune tanto en suero como secretora. Sin embargo, la inmunización oral ha sido limitada debido a la captación ineficiente de antígeno, inducción de tolerancia, la degradación proteolítica del antígeno antes de que llegue a las células inmunes (Villena, 2008), a que el antígeno se diluye en la secreción mucosal, es capturado en el moco, atacado por proteasas y nucleasas, y excluido por la barrera epitelial. Es por eso que se requieren grandes dosis de vacuna y es imposible determinar con exactitud cuál es la dosis que atraviesa la mucosa. Los antígenos que no se eliminados son tomados en niveles bajos, es por ello que muchos antígenos pueden inducir tolerancia (Mayer y Shao, 2004; Neutra y Kozlowski, 2006).

### **1.6.4.1 RESPUESTA A LA VACUNACIÓN ORAL**

Las células B de la mucosa se diferencian para convertirse en células plasmáticas de la mucosa, la mayoría de las cuales producen IgA dimérica que se exporta en secreciones como IgA secretora (SIgA) para interceptar los antígenos y patógenos, y para evitar la invasión de la mucosa. Las IgG neutralizantes también están presentes en las mucosas; la IgG en la mucosa pudiera derivarse de las células plasmáticas locales o de sangre, por difusión desde los capilares fenestrados. Las células infectadas podrían ser eliminadas por

los linfocitos T citotóxicos (CTL), por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o por una colaboración entre células asesinas naturales (NK) y los anticuerpos (Neutra y Kozlowski, 2006).

Las estrategias de detección de los antígenos se adaptan a las diversas barreras epiteliales que cubren las superficies mucosas de todo el cuerpo, pero todas implican a las células dendríticas (DC). Las DC podrían reunirse inmediatamente debajo de los epitelios, migran a la capa epitelial, e incluso lanzan las dendritas hacia la luz de la mucosa para capturar antígenos. Las DC de cualquier superficie de la mucosa pueden viajar por la linfa a los ganglios linfáticos más cercanos para presentar el antígeno a las células T. En el tejido linfoide organizado de la mucosa, las células M especializadas en el epitelio asociado al folículo entregan a los antígenos a través de la barrera epitelial directamente a las DC subepiteliales que luego presentan antígenos a nivel local en las áreas adyacentes de células T de la mucosa (Figura 1) (Neutra y Kozlowski, 2006).

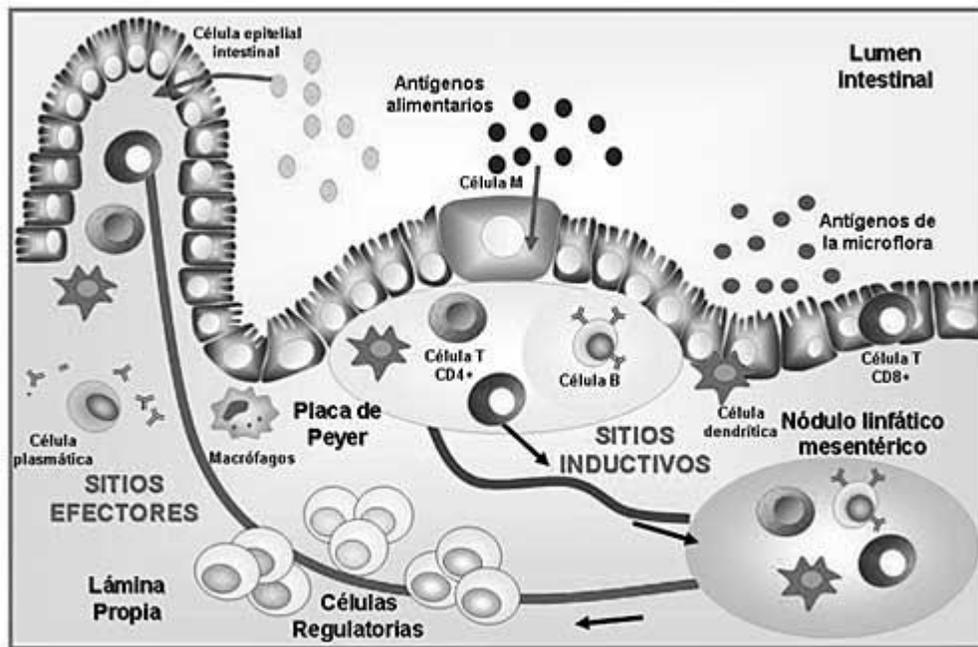


Figura 1.- Muestreo de los antígenos en la superficie mucosa: colaboración de las células epiteliales y células dendríticas en la mucosas (Porparatto, *et al.*, 2007).

La inmunización oral es una ruta comúnmente empleada para inducir respuesta de IgA mucosal después de la captación del antígeno en las placas de Peyer del intestino delgado. Sin embargo, este aprovechamiento se ve limitado por enzimas y la degradación proteolítica del Ag en el estómago lo que potencialmente puede comprometer su inmunogenicidad (Sedgmen *et al.*, 2004). En un estudio, se midió la respuesta inmune específica en cerdos después una inmunización oral con un sistema liberador de antígeno en microcápsulas de *E.coli* y fimbria, los resultados mostraron que la inmunización oral con este sistema no fue efectiva para inducir anticuerpos IgA en la mucosa y protección contra *E. coli* en la mucosa intestinal (Felder *et al.*, 2000).

### **1.6.5 VÍA INTRANASAL**

Aunque, la inmunización nasal podría ser particularmente efectiva para la protección contra patógenos respiratorios, la óptima protección en el tracto gastrointestinal, de recto y tracto genital femenino aún podría requerir una vacuna oral, rectal o vaginal (Neutra y Kozlowski, 2006).

La vía intranasal es eficaz para inducir inmunidad en la mucosa del tracto respiratorio superior y para conferir protección contra enfermedades infecciosas severas (Kurono *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2001 Giri *et al.*, 2005). En este sentido, la vacunación intranasal ofrece ventajas deseables, como la facilidad, flexibilidad y la habilidad para desencadenar la activación tanto de inmunidad mucosal como sistémica (Giri *et al.*, 2005).

Varios estudios han indicado que la inmunización intranasal proporciona protección parcial contra *Mycobacterium virulenta* en desafíos con aerosoles (Falero-Diaz *et al.*, 2000; Giri *et al.*, 2005) . Se ha mostrado que la inmunización intranasal, pero no la oral, en el ganado usando como antígeno microesferas de alginata que contenían albumina sérica porcina, induce respuesta inmune específica contra el antígeno, en suero y en secreción nasal. Sin embargo, niveles bajos de células secretoras de anticuerpos en sangre periférica y de

proliferación de linfocitos *in vitro* fueron observados después de una inmunización intranasal (Rebelatto *et al.*, 2001).

#### **1.6.5.1 RESPUESTA A LA VACUNACIÓN INTRANASAL**

La vacunación ideal es aquella que proporcione tanto protección mediada por células y humoral, no solo en la superficie de las mucosas pertinentes, sino también en todo el cuerpo. En este sentido, la vacunación mucosal ha mostrado potencial (Neutra y Kozlowski,, 2006). La inmunización nasal en humanos y ratones produce mejor respuesta de anticuerpos sistémica que otras rutas de inmunización mucosal (Neutra y Kozlowski,, 2006). En ratones, monos y humanos, las vacunas administradas por esta vía han inducido respuesta específica mucosal de anticuerpos IgA en glándulas salivales, tracto respiratorio alto y bajo, tracto genital masculino y femenino, y en intestino delgado y grueso (Neutra y Kozlowski,, 2006). Además, se ha demostrado que la inmunización intranasal con antígenos, en combinación con adyuvantes, puede ser eficaz en la inducción de la IgA secretora, que desempeña un papel importante en la protección del hospedero contra patógenos bacterianos y virales (Kurono *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2001; Giri *et al.*, 2005). Giri *et al.*, demuestran que con la vacunación intranasal aumentaron los niveles de IgA en pulmón y lavado nasal en ratones. Por otra parte, la vacunación intranasal no sólo aumentó la secreción de IgA, IgG e IgG2a en la mucosa, sino que también estimuló la producción de IgG1 e IgG2a a nivel sistémico (Giri *et al.*, 2005).

El tipo de respuesta inmune generada por la entrada de un antígeno por vía intranasal depende, entre otras cosas, de la naturaleza del mismo. Los antígenos particulados, como virus y bacterias, son eliminados gracias a los mecanismos inespecíficos, como las secreciones mucosas, la acción de los cilios y la flora microbiana local, entre otros. Sin embargo, cuando estos mecanismos son afectados debido a infecciones o a contaminantes ambientales, o cuando existe una exposición repetida a antígenos, éstos se adhieren entonces a las células M, las cuales se encuentran recubriendo una buena parte del tejido

linfoide y que están especializadas en la transportación selectiva de partículas antigénicas desde la luz hacia adentro, donde se encuentran las células del sistema inmune. Estos materiales endocitados se mantienen prácticamente inalterados y luego son liberados en la zona basal de estas células, donde existen invaginaciones en forma de bolsillos que permiten una estrecha interacción con las células inmunológicas que están inmediatamente por debajo. Los antígenos no particulados o solubles penetran la mucosa nasofaríngea a través de la barrera epitelial por fuera de las células M (Figura 2) (Batista, 2003).

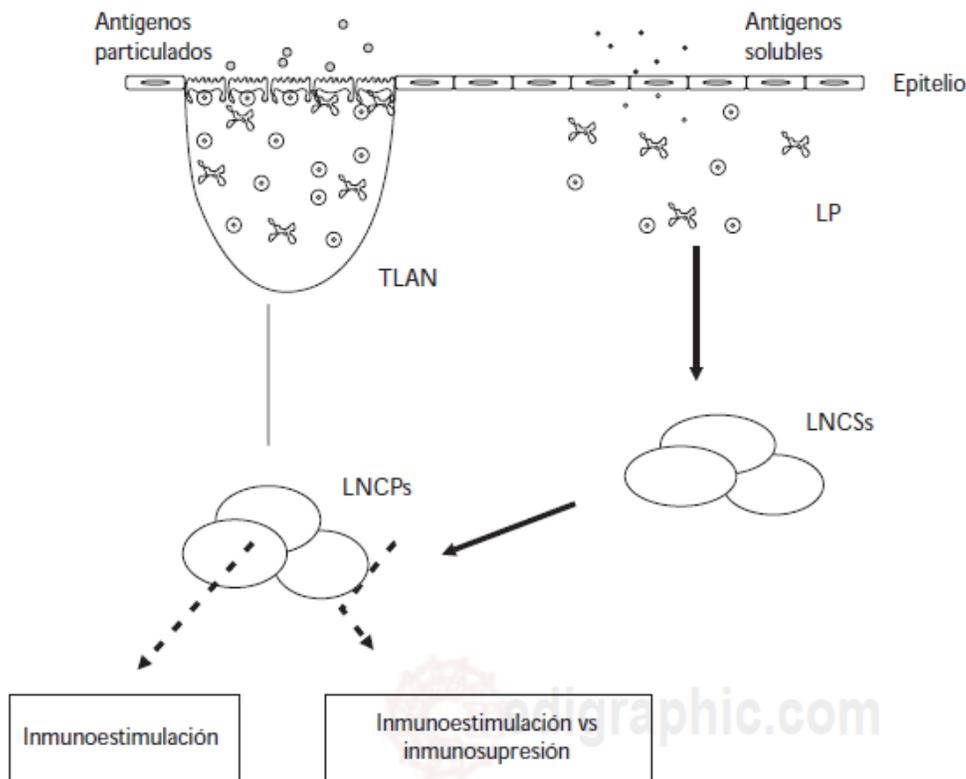


Figura 2.-Los antígenos particulados penetran a través de las células M presentes en el tejido linfoide asociado a nariz (TLAN) y luego son transportados hacia los linfonodos cervicales profundos (LNCPs) donde se generan respuestas inmunoestimulantes. Por su parte, los antígenos solubles penetran mayoritariamente atravesando la barrera epitelial, siendo captados por las células presentadoras de antígenos en la lámina propia que las transportan hacia los linfonodos cervicales superficiales (LNCSs), donde se generan respuestas inmunoestimulantes o supresoras (Batista, 2003).

### 1.6.6 PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN COMBINADOS

Debido a que la administración directa de inmunógenos en las mucosas no permite asegurar la dosis realmente tomada por el sistema inmune y debido a que es frecuente la inducción de tolerancia al Ag, la combinación de inmunización parenteral/mucosal podría ser una alternativa para lograr inmunidad integral (mucosal/sistémica). En un modelo bovino, la vía SC resultó en un incremento de IgG1 e IgG2 así como de IgA después de un refuerzo oral, (Bowersock, *et al*, 1997). Los resultados de Bowersock, sugieren que la vía SC puede mejorar la respuesta inmune a los antígenos administrados por vía oral, como lo muestra el aumento de IgA en FLBA (fluido de lavado bronquioalveolar) en novillos inmunizados SC/oral comparado con los inmunizados oral/oral. El mecanismo por el cual la vía SC en primera instancia mejora la inmunidad mucosal no está totalmente entendido (Bowersock *et al* , 1997). La inmunización parenteral ha mostrado que induce baja respuesta de IgA polimérica sistémica y mucosal en ratones y humanos. El reforzamiento mucosal puede mejorar la respuesta de los linfocitos. La protección del ganado con la inmunización oral/oral ante un desafío por un agente infeccioso es incierta por los niveles bajos que esta proporciona (Bowersock, *et al.*, 1997). Sin embargo, la inoculación SC antes que la intrabronquial (IB) u oral induce a las ASC (células secretoras de anticuerpos), a producir IgA, IgG1 e IgG2 y se diferencia de la oral/oral por la respuesta tan alta de IgA (Bowersock *et al.*, 1997). En un estudio realizado por Alcón y colaboradores, probando vías de inmunización combinada SC/SC y SC/IN los resultados mostraron una producción alta de IgG específica comparado con el grupo control. En contraste, solamente el protocolo SC/IN indujo significativamente altos niveles de IgA en suero. En análisis adicionales mostraron que solo la inmunización combinada (SC/IN) induce IgA en secreción nasal y pulmonar (Alcón *et al.*, 2005). En un estudio adicional, evaluaron la eficacia de de la inmunización intranasal. Después de la primera inmunización IN y SC, los animales presentaron una respuesta mayor IgA e IgG en suero en comparación con el grupo control. Para evaluar si era posible inducir inmunidad en las mucosas los animales recibieron una segunda inmunización IN y las respuestas de anticuerpos fueron evaluados 1 semana después

encontrando un incremento en los niveles de IgG e IgA en suero. La administración IN demostró ser un método no intrusivo efectivo para la administración de Ags en cerdos, induciendo tanto respuesta inmune sistémica como local, cuando se combina con un refuerzo SC (Alcón *et al.*, 2005).

## 1.7 DETERMINACION DE LA RESPUESTA INMUNE

Las respuestas inmunitarias de los animales pueden determinarse en dos formas generales en el laboratorio de diagnóstico. Pueden usarse anticuerpos específicos para detectar o identificar un antígeno (Dx directo), o la detección de anticuerpos específicos en el suero permite establecer si un animal estuvo expuesto a un antígeno en especial (Dx indirecto). Las técnicas de serología diagnóstica caen en tres categorías generales (tabla 6). Las pruebas de unión primaria miden directamente el enlace de antígenos y anticuerpos. Estas se realizan combinando antígenos y anticuerpos, y después midiendo las cantidades de inmunocomplejos que se hayan formado. Las pruebas de unión secundaria miden los resultados de la interacción antígeno-anticuerpo *in vitro*. Estas suelen ser menos sensibles que las de unión primaria, pero son más fáciles de realizar. La reacción entre antígeno y anticuerpo por lo general va seguida de una segunda reacción. Por lo tanto, si se combinan anticuerpos con antígenos solubles en solución, los complejos resultantes pueden precipitar. Si los antígenos son particulado (p. ej. bacterias o eritrocitos) los anticuerpos los agregan o aglutinan. Si el anticuerpo puede activar la vía clásica del sistema del complemento y el antígeno se encuentra en una superficie celular, entonces el resultado puede ser la lisis de la célula. Las pruebas más complejas, las de unión terciaria, miden el efecto protector real de los anticuerpos en un animal (Tizard, 2006).

Tabla 6. Cantidad mínima de proteínas de anticuerpos que puede detectarse mediante pruebas inmunitarias selectas (Tizard, 2006).

<b>PRUEBAS</b>	<b>PROTEÍNA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>Pruebas de unión primaria</b>	
ELISA	0.0005
Radioinmunoanálisis competitivo	0.00005
<b>Pruebas de unión secundaria</b>	
Precipitación en gel	30
Precipitación en anillo	18
Aglutinación bacteriana	0.05
Hemoaglutinación pasiva	0.01
Inhibición de la hemoaglutinación	0.005
Fijación de complemento	0.05
Neutralización viral	0.00005
Actividad bacteriana	0.00005
Neutralización de antitoxina	0.06
ELISA	0.0005
<b>Pruebas <i>in vivo</i></b>	
Anafilaxis cutánea pasiva	0.02

**Análisis cuantitativo** es la determinación de la abundancia absoluta o relativa (muchas veces expresada como concentración) de una, varias o todas las partículas presentes en una muestra. Una vez que se conoce la presencia de cierta sustancia(s) en una muestra, el estudio de su abundancia absoluta o relativa puede ayudar en la determinación de

propiedades específicas. Por ejemplo, el análisis cuantitativo realizado por la espectrometría de masas sobre muestras biológicas puede determinar, por la proporción de abundancia relativa de proteínas específicas, indicaciones de ciertas enfermedades, como el cáncer.

### **Cuantitativo vs cualitativo**

El término "análisis cuantitativo" muchas veces se usa para compararse con el "análisis cualitativo", el cual busca información sobre la identidad o forma de la sustancia presente. Por ejemplo, un químico se le podría dar una muestra sólida desconocida. Él usará técnicas "cualitativas" para identificar los componentes presentes, y luego técnicas cuantitativas para determinar la cantidad de cada uno de estos componentes.

Los aspectos cuantitativos son de suma importancia, solo a partir de datos cuantitativos ha sido posible deducir muchos de los conceptos básicos sobre la naturaleza de los antígenos, anticuerpos, y sus reacciones. Los análisis de éstas proporcionan datos sobre la cantidad aproximada de anticuerpo o antígeno existente en la muestra biológica (Cushing y Camphell 1960), lo que permite su análisis estadístico y la obtención de conclusiones más sólidas, cosa que con la determinación cualitativa no puede hacerse.

## **1.8 INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

El ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza una enzima como marcador para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30 000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario (Guzman-Vazquez, 2004). Existen múltiples variantes de esta técnica, siendo las principales:

**ELISA directo** (ensayo simple de dos capas). Las placas de ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las muestras en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados, que indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina,...) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado).

**ELISA indirecto.** Este sistema permite cuantificar una gran cantidad de antígenos. Es utilizada para la detección del virus PRRS, esta prueba detecta las IgG que aparecen de 7 a 11 días postinfección, con una producción máxima a los 30-50 días y declina hasta ser detectable alrededor de 4 a 6 meses postinfección (Chavéz 2009). Esta técnica consiste en poner la muestra del suero sospechoso en contacto con células infectadas por PRRSV, para posteriormente buscar evidencia de la reacción antígeno- anticuerpo mediante la utilización de un anticuerpo contra PRRS conjugado con fluoresceína. Es una prueba rápida, económica y específica (99.5% de especificidad) (Chavéz 2009).

**ELISA tipo “Sandwich”**, utiliza dos tipos distintos de anticuerpos que reaccionan con el antígeno cuya concentración se quiere medir. Se utiliza para la detección de *Tenia solium* mediante las muestras del suero sanguíneo para procesarlas mediante la prueba ELISA Sándwich para la detección de antígeno soluble (Sánchez, 2004).

## **1.9 COLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE SECRECIONES DE LAS MUCOSAS**

La apropiada colección y procesamiento de las muestras mucosales son de suprema importancia para la subsecuente evaluación de los niveles de anticuerpos específicos. En contraste con la colección única y uniforme de suero, las secreciones externas requieren precauciones especiales. Por lo cual no todos los métodos son adecuados para las secreciones externas (Mestecky, 2005).

## **Saliva**

La saliva es la muestra más fácil de recolectar y es uno de los fluidos mas representativos de todas las secreciones externas, porque contiene bajos niveles de IgG, especialmente en las secreciones parotídeas (Mestecky, 2005).

## **Secreción nasal**

Por el interés que existe en la inmunización intranasal, la colección de esta secreción es considerablemente importante aunque el procedimiento de lavado de la cavidad nasal para la recolección de la muestra causa una pequeña molestia en los donantes (Mestecky, 2005).

En bovinos la colección de la secreción nasal se hace mediante la colocación de unos tapones de tamaño regular dentro de cada fosa nasal por aproximadamente 10 minutos. Los tapones se meten inmediatamente a un tubo universal de 30 ml que contiene 3 ml de PBS frío más un cóctel de inhibidores de proteasas y son mezclados inmediatamente. Las muestras son almacenadas en hielo antes de su aclaración por centrifugación (McNeilly, 2007).

## **2 JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades infecciosas son causa de altas pérdidas económicas para la porcicultura en México. La principal vía de entrada de los agentes patógenos son las mucosas que podrían protegerse a través de la vacunación. Sin embargo, las vías más comunes de aplicación de vacunas son intramuscular o subcutánea, que producen respuesta sistémica de IgG principalmente, pero no producen respuesta a nivel de mucosas. Por lo anterior, es necesario probar nuevas vías de inmunización que proporcionen inmunidad mucosal para evitar la entrada de los patógenos al organismo neutralizándolos a ese nivel.

### **3 HIPÓTESIS**

- ⊙ La administración de antígenos por vías de inoculación combinadas, induce una mejor respuesta inmune sistémica y mucosal.

#### **4 OBJETIVO GENERAL**

- ⊙ Evaluar diferentes vías de inmunización para obtener respuesta inmune sistémica y local en cerdos destetados.

#### **OBJETIVO PARTICULAR**

- ⊙ Cuantificar la respuesta inmune de IgG e IgA en suero, saliva y secreción nasal, contra ovoalbúmina, como antígeno soluble, administrado por diferentes vías en cerdos destetados por la técnica de ELISA

## 5 METODOLOGÍA

### Diseño del experimento 1

Se emplearon 20 cerdos destetados del CEIEPP, Jilotepec, de 21 días de edad, divididos en 4 grupos con 5 cerdos cada uno, antes del procedimiento se les dio una semana de adaptación. Fueron inmunizados los días 0 y 14 con 8 mg de ovoalbúmina (OVA)/cerdo en PBS y con adyuvante oleoso (VET LO7 GIBCO) a 3 grupos, por diferentes vías (grupo 1 TC/TC, grupo 2 SC/TC y grupo 3 SC/SC), el control fue inoculado con PBS y adyuvante únicamente por vía subcutánea en las 2 ocasiones. En el día 43 se realizó una prueba intradérmica únicamente a los grupos inmunizados, se les aplicó del lado derecho entre la sexta y séptima teta 1mg de ovoalbúmina en 100µl de PBS y del lado izquierdo entre la sexta y séptima teta 100µl de PBS. Las lecturas se realizaron cada 24 horas por tres días, mediante la medición del eritema e induración, sacando el diámetro de este. Se tomaron muestras de suero, secreción nasal y saliva, desde el día 0 cada 7 días durante 8 semanas (Tabla 7).

Tabla 7. Calendario y vías de inmunización del experimento 1 (ver detalles en el texto).

<b>GRUPO 1</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 14</b>	<b>Día 43</b>
<b>A<sub>1</sub> (n=5)</b>	TC (8mg/100µl OVA)	TC (8mg/100µl OVA)	Prueba ID (1mg/100µl)
<b>B<sub>1</sub> (n=5)</b>	SC (8mg/1mL OVA)	SC (8mg/1mL OVA)	Prueba ID (1mg/100µl)
<b>C<sub>1</sub> (n=5)</b>	SC (8mg/1mL OVA)	TC (8mg/100µl OVA)	Prueba ID (1mg/100µl)
<b>D (control)<sub>1</sub> (n=5)</b>	SC (1mL PBS + adyuvante)	SC (1mL PBS + adyuvante)	No se realizó

## Diseño del experimento 2

Se ocuparon 20 cerdos destetados del CEIEPP Jilotepec de 21 días de edad divididos en 4 grupos con 5 cerdos cada uno, antes del procedimiento se les dio una semana de adaptación. Fueron inmunizados los días 0 y 10 con 8 mg/cerdo de ovoalbúmina en PBS con adyuvante oleoso por las vías SC y TC y con 16 mg/cerdo de OVA en PBS solo por la vía intranasal, al día 20, como sigue: grupo 1, SC/TC/TC; grupo 2, SC/SC/IN y grupo 3, SC/TC/IN, el control fue inoculado con PBS y adyuvante oleoso únicamente por vía subcutánea en las 3 ocasiones. Se tomaron muestras de suero, secreción nasal y saliva, los días 0, 10, 20, 27 y 57 post-inoculación (tabla 8).

Tabla 8. Calendario y vías de inmunización del experimento 2 (ver detalles en el texto).

GRUPO 2	Día 0	Día 10	Día 20
A <sub>2</sub> (n=5)	SC (8mg/1mL OVA)	TC (8mg/100µl OVA)	TC (8mg/100µl OVA)
B <sub>2</sub> (n=5)	SC (8mg/1mL OVA)	SC (8mg/1mL OVA)	IN (16 mg/1mL OVA)
C <sub>2</sub> (n=5)	SC (8mg/1mL OVA)	TC (8mg/100µl OVA)	IN (16 mg/1mL OVA)
D (control) <sub>2</sub> (n=5)	SC (1mL PBS + adyuvante)	SC (1mL PBS + adyuvante)	SC (1mL PBS + adyuvante)

## PREPARACION DEL ANTÍGENO

Vía subcutánea: se pesaron 8 mg de OVA (Sigma, grado V, Cat. No. A5503-10G), se disolvió en 1000µl de PBS pH 7.4, se pasó por un filtro de 0.22 µm, ya filtrado se añadió 50 µl de adyuvante oleoso (VET LO7 GIBCO), y se mezclaron por 1 minuto en un vortex Genie 2 (DAIGGER, Cat. No. 3030A). La mezcla se mantuvo refrigerada a 4 C hasta su utilización.

Vía transcutánea: se pesaron 8 mg de OVA, se disolvió en 100µl de PBS 1X pH 7.4, y se esterilizó con un filtro de 0.22µm.

Vía intranasal: se pesaron 16 mg de OVA, se disolvió en 1000µl de PBS 1X pH 7.4, se pasó por un filtro de 0.22µm.

Control: 1 mL de PBS pH7.4, se pasaron por un filtro de 0.22 $\mu$ m, posteriormente se le aplicaron 50  $\mu$ l del adyuvante oleoso y se mezclaron perfectamente en un vortex.

## **VÍAS UTILIZADAS**

### **Subcutánea**

- 1.- Se desinfectó el pliegue que está debajo de la oreja con alcohol al 70%
- 2.- Se aplicó 1 mL del antígeno, colocando la jeringa en un ángulo de 45°
- 3.- Se sacó la aguja y se presionó con el algodón, para evitar la salida del líquido.

### **Transcutánea**

- 1.- Se desinfectó la oreja con benzal al 1%
- 2.- Se aplicó xylocaína® al 10% (lidocaína 10g/ 100ml, Reg. No. 70354 SSA IV, AstraZeneca) en aerosol sobre la oreja.
- 3.- Se depiló la zona de la oreja donde se aplicó el Ag.
- 4.- Se limpió con xileno, para eliminar la grasa de la zona.
- 5.- Se tomó la oreja de tal forma que no se derramara el Ag, se colocó 100  $\mu$ l del Ag
- 6.- Con una lanceta (FinePoint™ lancetas, Lifescan. Inc. Johnson & Johnson Company) se dieron 20 pinchazos, sobre la gota y se colocó el parche (Nexcare® venditas).
- 7.- Posteriormente se dejaron a los cerdos individualmente en una corraleta por 24 horas.

### **Intranasal**

- 1.- Se les aplicó 1 ml del antígeno, con atomizador en las fosas nasales, aproximadamente 0.5 ml en cada una.
- 2.- Se mantuvo al animal con la cabeza hacia arriba aproximadamente 1 min, para evitar el derrame del antígeno.

### **Control**

- 1.- Se desinfectó el pliegue que esta debajo de la oreja con alcohol al 70%.
- 2.- Se aplicó 1 mL del PBS, colocando la jeringa en un ángulo de 45°.
- 3.- Se sacó la jeringa y se presionó con el algodón, para evitar la salida del líquido.

### **Prueba intradérmica**

- 1.- Se desinfectó el abdomen entre la teta 6 y 7, de ambos lados.
- 2.- Del lado izquierdo se le inoculó 100µl (1mg/100µl) de OVA en PBS.
- 3.- Del lado derecho se le inoculó 100µl de PBS.

### **OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

#### **Preparación del inhibidor de proteasas**

El día 0 del experimento se tomaron 2700 µl de PBS 1X a pH 7.4 y se colocaron en un tubo de 15 ml, posteriormente se tomaron 300 µl del stock de fluoruro de fenilmetil sulfonilo 0.01M (PMSF) los cuales fueron mezclados con el PBS. De esta solución se tomaron 50 µl y se colocaron en tubos Eppendorf y se mantuvieron refrigerados.

#### **Muestra de secreción nasal y saliva**

Para la toma de muestra de saliva y secreción nasal a los cerdos se les dio 200 µl de extracto de capsaicina, debajo de la lengua, para estimular la producción de las secreciones y con esponjas oftálmicas quirúrgicas (MEROCEL<sup>®</sup> Surgical Sponge Productscon, Cat.No. 400101, MEDTRONIC XOMED. INC.), se tomaron las secreciones, se colocaron en los tubos Eppendorf identificados con el número de cerdo y la fecha para que la esponja hiciera contacto en el inhibidor de proteasas, se mantuvieron en refrigeración durante su traslado.

#### **Muestra de suero**

Se colocó al animal en decúbito dorsal, con las extremidades anteriores y posteriores bien sujetas, así como la cabeza, se desinfectó el canal de la yugular que se encuentra entre la punta del hombro y la punta del esternón, se localizó la zona a puncionar, se tomó la muestra (entre 7 y 10 mL por animal), se colocó en una gradilla y se dejó a temperatura ambiente hasta que se obtuvo el suero que se clarificó centrifugando.

## PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

### Muestras de secreción nasal y saliva

En el laboratorio el día del muestreo se colocaron los tubos Eppendorf en gradillas y se dejaron en una hielera con refrigerante, se destaparon los tubos para colocar las esponjas de forma inversa a como se metieron al momento de la toma, se centrifugaron a 10,000 x G durante 3 minutos a 7 ° C, el sobrenadante se pasó a un vial de 600 µl bien identificado, con la muestra, número del cerdo y la fecha, y fueron guardadas a -20° C hasta su uso.

### Suero

Se sacó el coágulo y el suero se centrifugó a 800 x G por 10 min a 4° C, se alícuotó 1ml de suero en viales de 1.5 ml bien identificado con muestra, número del cerdo y la fecha, y se guardaron a -20°C hasta su uso.

## TECNICA DE ELISA CUANTITATIVA PARA IgG e IgA

- 1.- Se sensibilizó una placa de 96 pozos (Costar), con OVA (2µg /mL) en amortiguador de carbonatos, en los pozos donde van las muestras (columnas 2 al 11 y filas A a H), en los carriles de blanco del estándar (Bco STD, columna 1) y estándar (STD, columna 12) se colocó el anticuerpo de captura (*goat anti-pig IgG o IgA- affinity purified*, marca Bethyl) en *buffer* de carbonatos, y se transfirieron 100µl a los carriles de Bco STD y STD. Se tapó con parafilm y se puso en refrigeración toda la noche.
- 2.- Se lavó la placa con buffer de lavado (50mM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8)
- 3.- Bloqueo; se transfirió *buffer* de bloqueo (50mM Tris, 0.14M NaCl, 1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) en todos los pozos de la placa, se incubó 30 minutos a 37 °C en rotación constante.

- 4.- Se lavó la placa 3 veces con buffer de lavado.
- 5.- Las muestras y STD. Se utilizó un suero de referencia (*pig reference serum*, Bethyl), para IgG se ajustó la concentración a 1000 ng/ml de IgG para las muestras de suero y a 100 ng/ml para mucosas. Después se realizaron diluciones dobles seriadas, terminando con concentraciones de 7.8 y 0.77 ng/mL respectivamente. Para IgA el estándar se diluyó hasta tener una dilución inicial de 100 ng/ml para todas las muestras.
6. Se pusieron las diferentes concentraciones de la curva en los pozos correspondientes.
7. Muestras séricas: Se diluyeron 1:50 en *buffer* de dilución (50mM Tris, 0.14M NaCl, 0.05% Tween 20, 1% BSA, pH8) y luego en diluciones triples seriadas.
8. Muestra de secreción nasal y saliva: Se inició con una dilución de 1:5 y luego haciendo diluciones dobles seriadas.
9. Se incubó 1 hora a 37°C en rotación constante.
- 10.- Se lavó la placa 5 veces con *buffer* de lavado
- 11.- Para IgG, se añadió 100 µl del anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano (*goat anti-pig-HRP*, Bethyl), en *buffer* de dilución y se incubó 1 hora en rotación constante a 37°C.
12. Para IgA, se añadió un anticuerpo monoclonal (*Mouse Anti porcine IgA*, Serotec) y se incubó 1 hora en rotación constante a 37°C.
- 8.- Se lavó la placa 5 veces con *buffer* de lavado.
- 10.- Reacción de la enzima sustrato para IgG: Sustrato 1mL TMB (1mg de Tetrametil Bencidina (TMB)/1ml Dimetil Sulfóxido (DMSO) +10 mL de *buffer* de citratos+ 2µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Se dejó reaccionar hasta desarrollo de color, se paró la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se leyó a 450 nm.
- 11.- Se lavó la placa 5 veces con *buffer* de lavado
- 12.- Anticuerpo biotinilado (*Goat Anti mouse IgG*, Zymed), 100 µl a cada pozo, se incubó 1 hora a 37° en rotación constante.
- 10.- Se lavó la placa 5 veces con *buffer* de lavado

- 11.- Estreptavidina (*alkaline phosphatase-conjugated streptavidina*, Jackson), 100  $\mu$ l a cada pozo, se incubó 1 hora a 37°C en rotación constante.
- 12.- Se lavó la placa 5 veces.
- 13.- Reacción de la enzima sustrato: 1 mL de *buffer* de dietanolamina + 100  $\mu$ l del stock PNPP (1  $\mu$ g / 10 mL).
- 14.- Se dejó reaccionar de 30-45 minutos, se paró la reacción con EDTA y se leyó la reacción a 405 y 450 nm.

## 6 RESULTADOS

### EXPERIMENTO 1

#### **IgG anti-OVA en suero**

En la figura 3 se muestran los promedios y error estándar de la concentración de IgG anti-OVA en suero ( $\mu\text{g/ml}$ ) de 5 cerdos de cada grupo, en todos los días de muestreo. Los animales del grupo SC/SC, tuvieron un pico de respuesta al día 21 ( $604 \pm 55.18\mu\text{g/ml}$ ) de IgG, teniendo diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) contra el control ( $0.26 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$ ) y el grupo TC/TC ( $3.03 \pm 0.62 \text{ ng/ml}$ ) ( $P < 0.01$ ) y contra el grupo SC/TC ( $P < 0.032$ ). El grupo SC/TC tuvo un pico de respuesta el día 28 ( $25.38 \pm 8.29\mu\text{g/ml}$ ), teniendo diferencia significativa contra el control ( $0.26 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$ ) ( $P < 0.05$ ) y el grupo TC/TC ( $0 \text{ ng/ml}$ ) ( $P < 0.005$ ). El grupo TC/TC no tuvo diferencia significativa en ninguno de los días (figura 3).

### IgG anti- OVA en suero

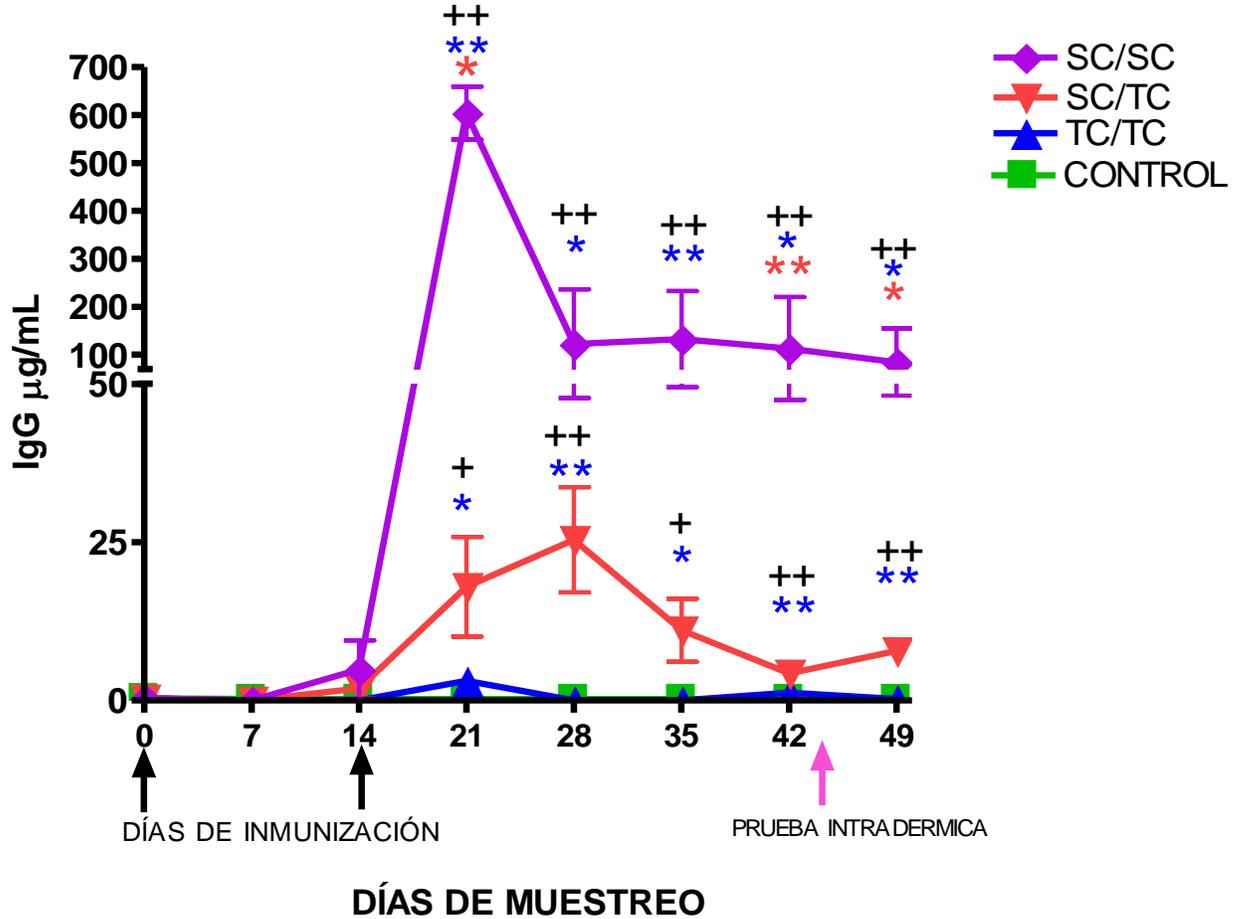


Figura 3.- Concentración de IgG específica ( $\mu\text{g/mL}$ ) contra OVA en suero de cerdos destetados inmunizados por vía SC/SC, SC/TC o TC/TC. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) representan diferencias contra el grupo control y los asteriscos (\*) representan diferencias entre grupos, los azules diferencias contra el grupo TC/TC y los rojos contra el grupo SC/TC. + ( $P < 0.05$ ), ++ ( $P < 0.01$ ). Las flechas negras muestran los días de inmunización y la rosa el día que se realizó la prueba intradérmica.

### **IgA anti- OVA en suero**

En la figura 4 se muestran los promedios y error estándar de la concentración de IgA anti-OVA en suero (ng/ml) de los cerdos de cada grupo, en los diferentes días de muestreo. Los animales inmunizados por la vía SC/SC, tuvieron un pico de respuesta al día 21 ( $250 \pm 13.3$  ng/ml), significativamente mayor al grupo control y el grupo TC/TC ( $P < 0.001$ ) y otros picos los días 42 y 49. El grupo SC/TC tuvo un pico de respuesta el día 21 ( $260.57 \pm 13.29$  ng/ml), teniendo diferencia significativa contra el control y el grupo TC/TC ( $P < 0.001$ ) y otro pico al día 49. El grupo TC/TC no mostró respuesta significativa en ninguno de los días (figura 4).

## IgA anti-OVA en suero

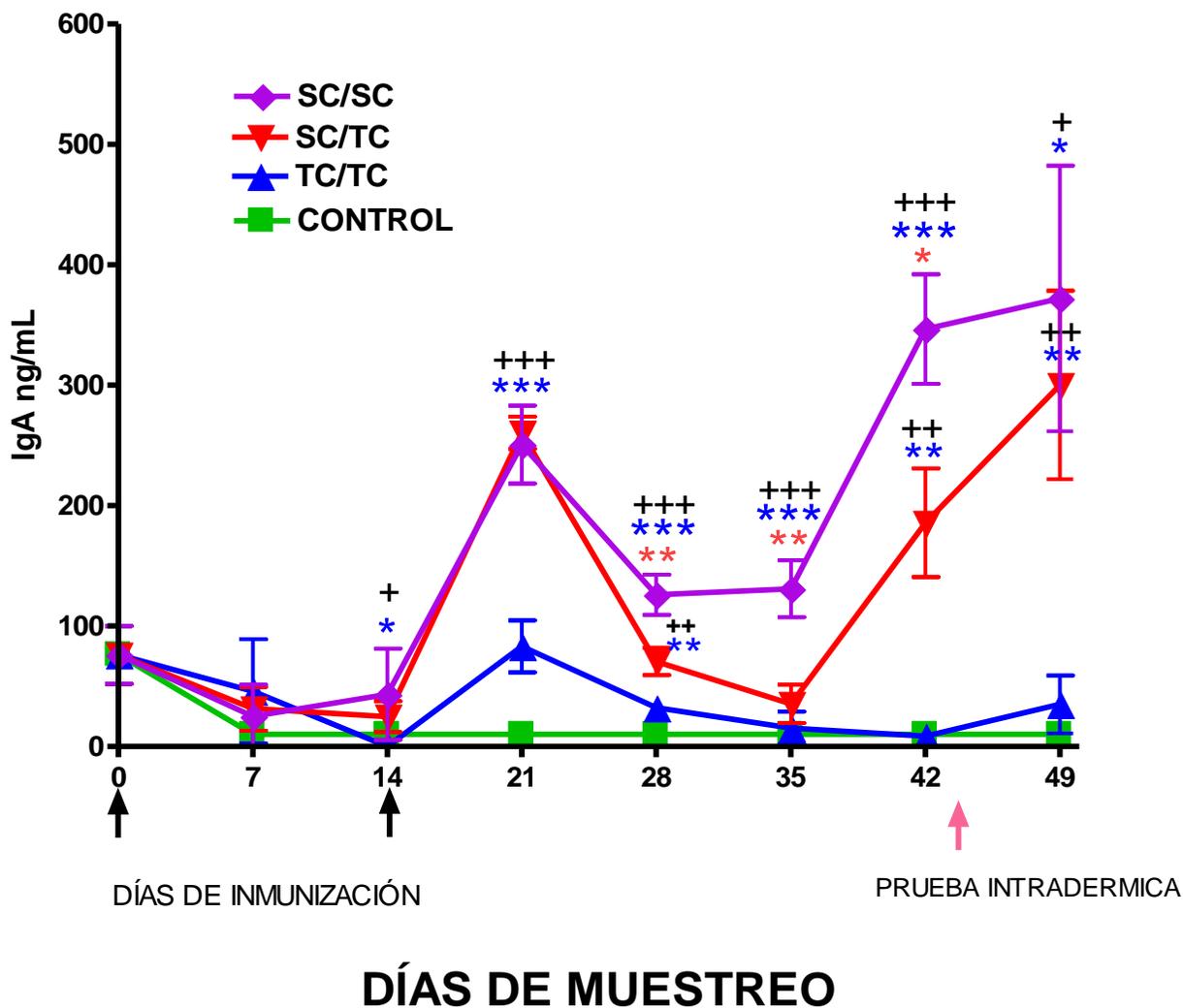


Figura 4.- Concentración de IgA específica contra ovoalbúmina (OVA) en suero de cerdos inmunizados por vía SC/SC, SC/TC o TC/TC, al destete. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) muestran las diferencias contra el grupo control y los asteriscos (\*) muestran diferencias entre grupos, los azules diferencias contra el grupo TC/TC y los rojos contra el grupo SC/TC. + (P<0.05), ++ (P<0.01), +++ (P<0.001), las flechas negras muestran los días de inmunización y la rosa el día que se realizó la prueba intradérmica.

## IgG anti- OVA en secreción nasal

En la figura 5 se muestran los promedios y error estándar de la concentración de IgG anti-OVA en secreción nasal (ng/ml) de por lo menos 5 cerdos de cada grupo, de todos los días de muestreo. No se encontraron diferencias significativas entre grupos, dada la gran variación entre individuos y solo algunos animales inmunizados por vía SC/SC tuvieron un pico de respuesta de IgG al día 42 ( $83.21 \pm 77.42$ .ng/ml),. En ningún grupo se encontró diferencia significativa contra el control (figura 5).

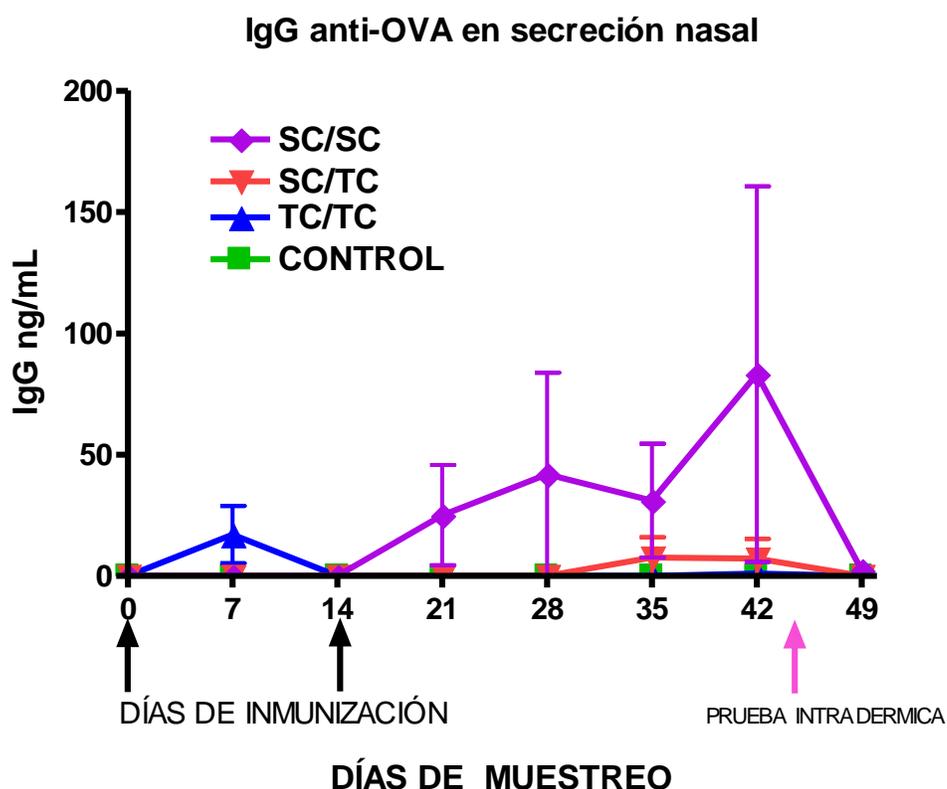


Figura 5.- Concentración de IgG específica contra ovoalbúmina (OVA) en secreción nasal de cerdos inmunizados por vía SC/SC, SC/TC o TC/TC. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales, las flechas negras muestran los días de inmunización y la rosa el día que se realizó la prueba intradérmica.

### **IgA anti- OVA en secreción nasal**

En la figura 6 se muestran los promedios y error estándar de la concentración de IgA anti-OVA en secreción nasal (ng/ml) de por lo menos 5 cerdos de cada grupo, de todos los días de muestreo. Los grupos de animales inmunizados por las vías SC/SC y SC/TC, tuvieron un pico de respuesta de IgA al día 35 ( $161.69 \pm 29.72$  ng/ml y  $166.18 \pm 14.81$  ng/ml respectivamente), con diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) contra el grupo control. El grupo TC/TC no tuvo respuesta significativa sobre el control (figura 6).

## IgA anti-OVA en secreción nasal

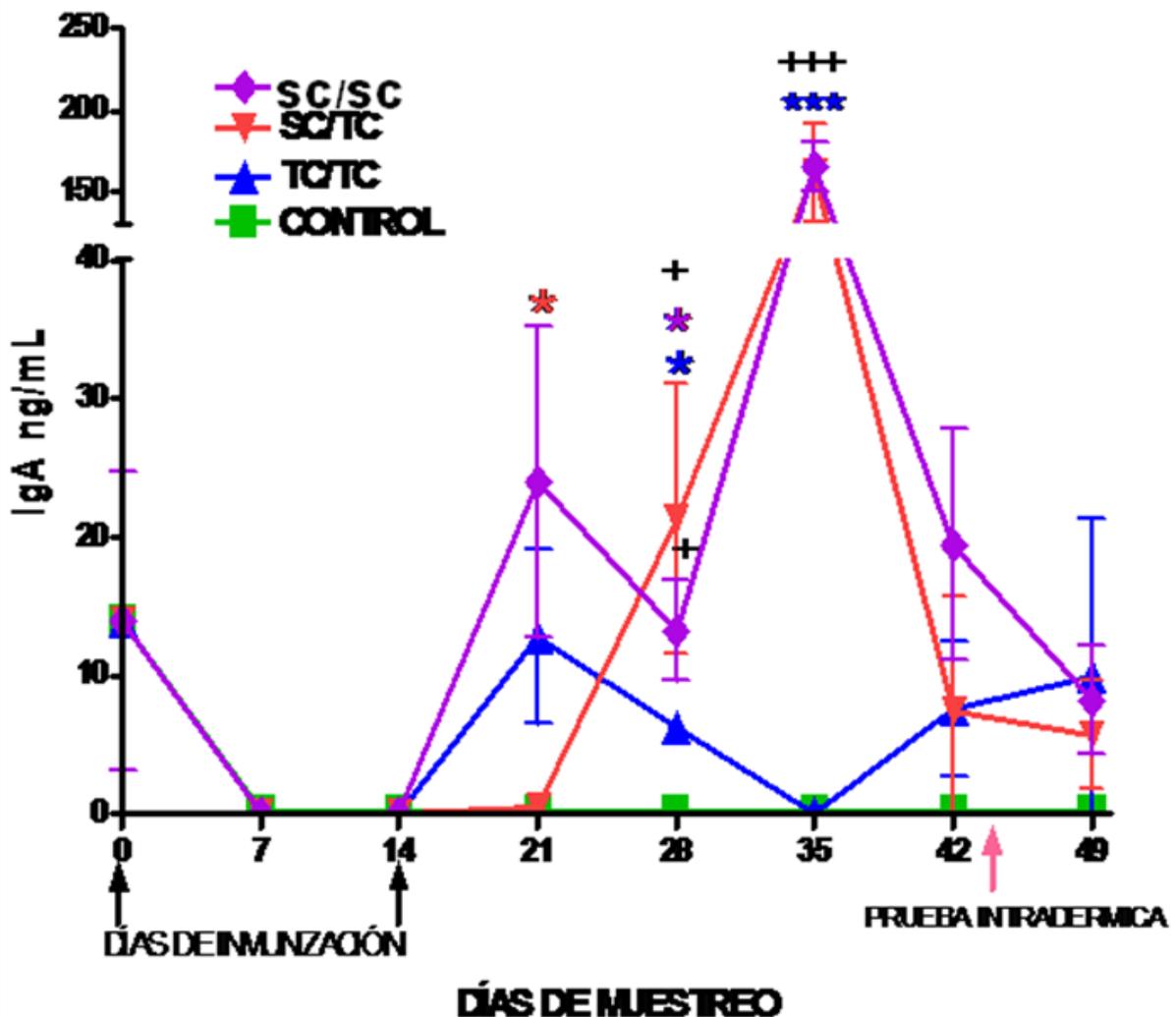


Figura 6.- Concentración de IgA específica contra ovoalbúmina en secreción nasal de cerdos inmunizados por vía SC/SC, SC/TC o TC/TC. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) muestran las diferencias contra el grupo control y los asteriscos (\*) muestran las diferencias entre grupos, los azules diferencias contra el grupo TC/TC y los rojos contra el grupo SC/TC. + (P<0.05), ++ (P<0.01), +++ (P<0.001), las flechas negras muestran los días de inmunización y la rosa el día que se realizó la prueba intradérmica.

### **IgG anti-OVA en saliva**

En la figura 7 se muestran los promedios y error estándar de la concentración de IgG anti-OVA en saliva (ng/ml) de por lo menos 5 cerdos de cada grupo, de todos los días de muestreo. No hubo diferencias significativas en los animales inmunizados dada la gran variación individual y solo algunos animales del grupo SC/SC tuvieron un pico de respuesta el día 35, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en ningún día (figura 7).

## IgG anti-ova en saliva

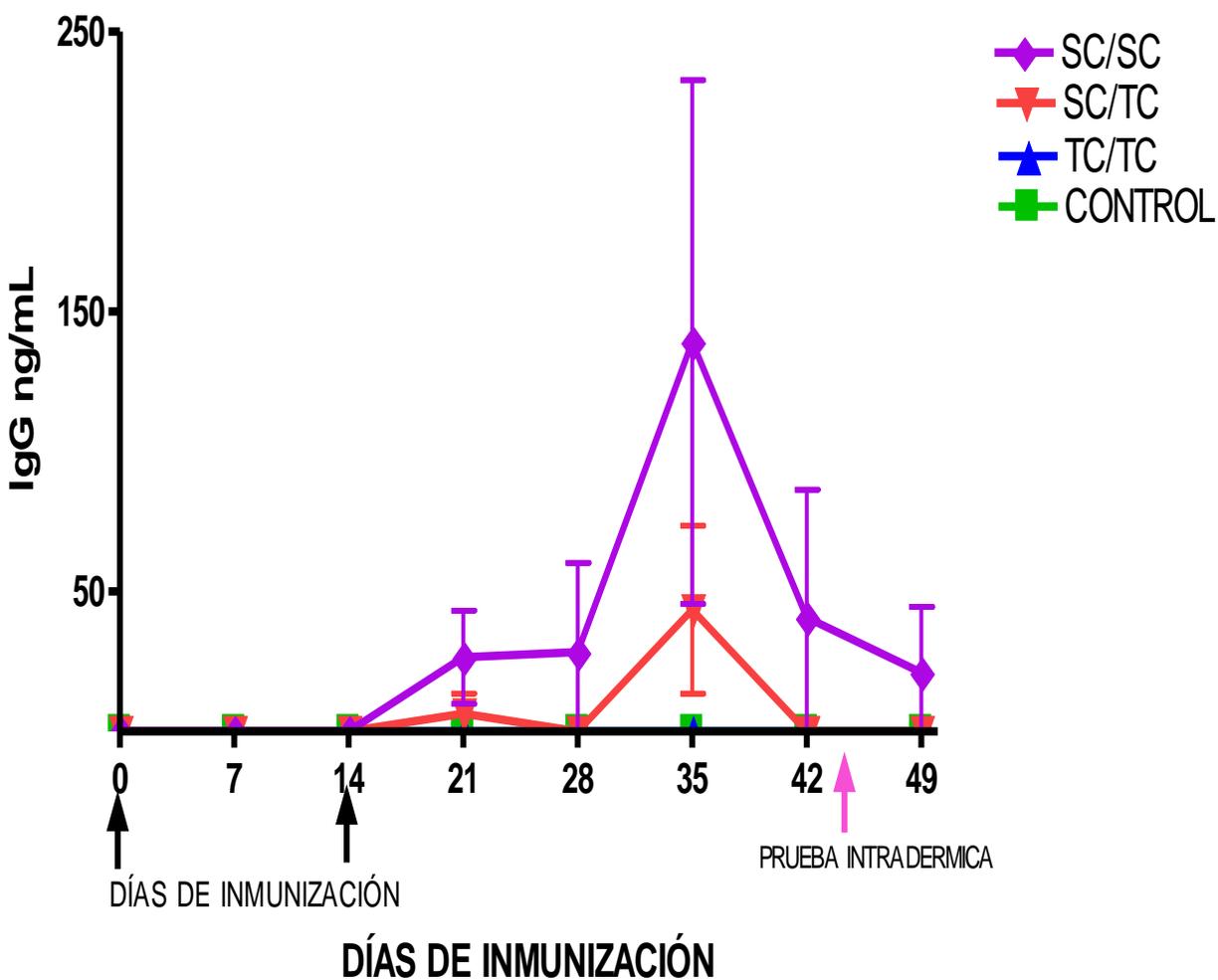


Figura 7.- Concentración de IgG específica contra ovoalbúmina en saliva de cerdos inmunizados por vía SC/SC, SC/TC o TC/TC (C). Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales, las flechas negras muestran los días de inmunización y la rosa el día que se realizó la prueba intradérmica.

## **IgA anti- ova en saliva**

En la figura 8 se muestran los promedios y error estándar de la concentración de IgA anti-ova en saliva (ng/ml) de por lo menos 5 cerdos de cada grupo, de todos los días de muestreo. Los grupos tratados tuvieron respuesta desde el día 7, el grupo SC/SC se mantuvo constante desde el día 7 hasta el 42 con un promedio de  $17.3 \pm 4$  ng/ml de IgA teniendo diferencia significativa contra el grupo control ( $P < 0.001$  el día 7 y de  $P < 0.01$  los días 14, 28 y 42), el grupo SC/TC tuvo su pico de respuesta el día 7 ( $19.4 \pm 7.1$  ng/ml) y fue disminuyendo paulatinamente, y el grupo TC/TC tuvo un pico al día 14 ( $16.5 \pm 2.8$  ng/ml) y fue bajando (figura 8).

## IgA anti-ova en saliva

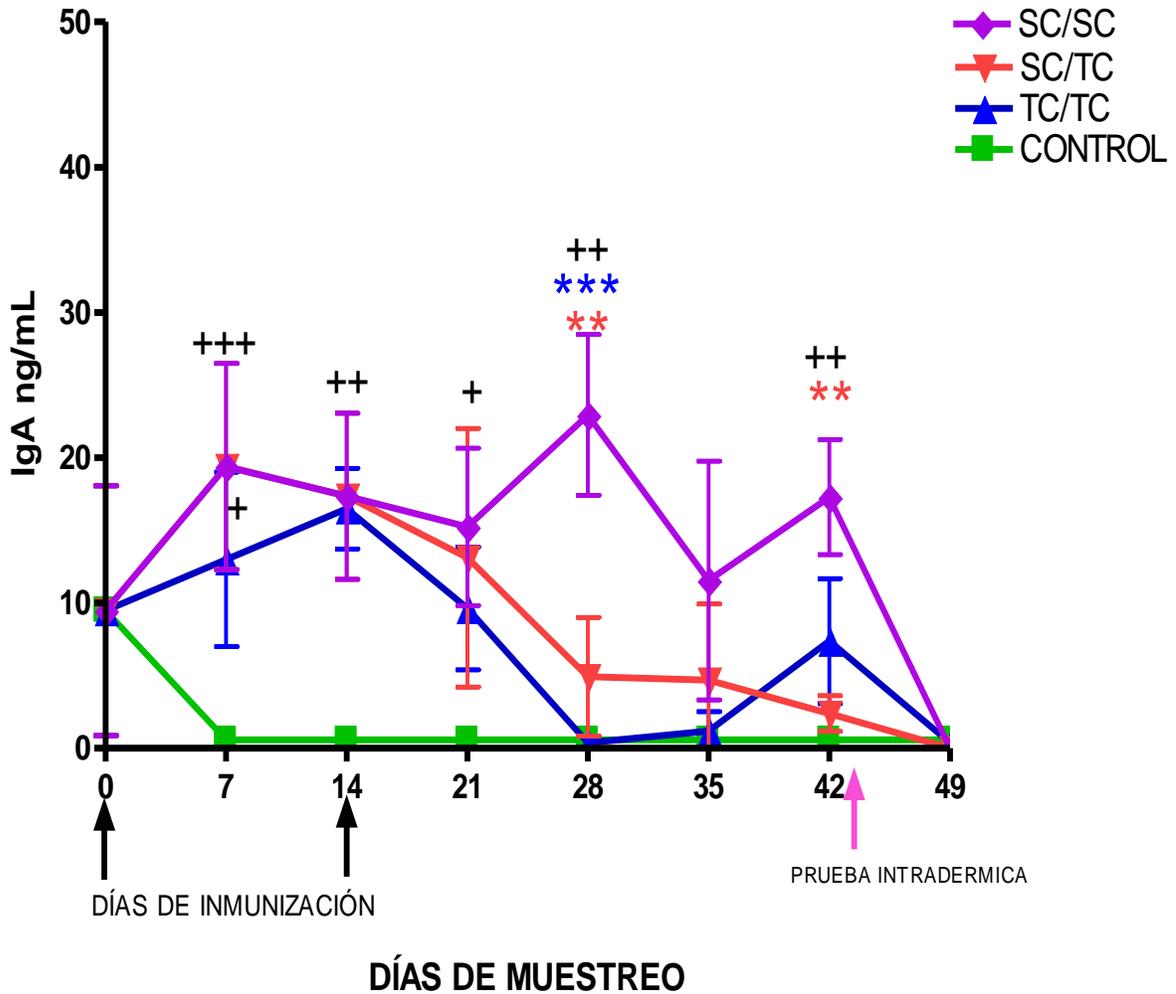


Figura 8.- Concentración de IgA específica contra ovoalbúmina en saliva de cerdos inmunizados por vía SC/SC, SC/TC o TC/TC, al destete. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) muestran las diferencias contra el grupo control y los asteriscos (\*) muestran las diferencias entre grupos, los azules diferencias contra el grupo TC/TC y los rojos contra el grupo SC/TC. + (P<0.05), ++ (P<0.01), +++ (P<0.001), las flechas negras muestran los días de inmunización y la rosa el día que se realizó la prueba intradérmica.

### Prueba intradérmica

La tabla 9 muestra los resultados obtenidos de la prueba intradérmica, de los 3 grupos inmunizados con ova, se midió el eritema a las 24 hrs y se observó que el grupo que tuvo respuesta de 4 animales fue el SC/SC y uno del grupo TC/TC, pero el diámetro del eritema de los animales del grupo subcutáneo fue 3 veces mayor que la del TC/TC, a las 48 horas solo respondió un animal de cada grupo y se observó que el eritema aumentó de tamaño.

Tabla 9. Resultados de la prueba intradérmica, diámetro en cm del eritema formado a las 24 y 48 horas postinoculación de cada grupo.

<b>Grupo</b>	<b>Eritema a las 24 horas</b>	<b>Eritema a las 48 horas</b>
	<b>mm</b>	<b>mm</b>
<b>TC/TC</b>		
<b>26</b>	5	12
<b>27</b>	0	0
<b>28</b>	0	0
<b>29</b>	0	0
<b>SC/SC</b>		
<b>31</b>	0	0
<b>32</b>	23	0
<b>33</b>	17	0
<b>34</b>	12	0

<b>35</b>	13	15
<b>SC/TC</b>		
<b>36</b>	0	12
<b>37</b>	0	0
<b>38</b>	0	0
<b>39</b>	0	0
<b>40</b>	0	0

En la primera columna es la identificación de cada cerdo por grupo, y las otras dos columnas representan la medida en mm del eritema.

## **EXPERIMENTO 2**

### **IgG anti- ova en suero**

En la figura 9 se muestran los promedios y error estándar de IgG anti-ova en suero ( $\mu\text{g/ml}$ ), de por lo menos 5 cerdos de cada grupo, de todos los días de muestreo. Los grupos tratados tuvieron respuesta después de la segunda inmunización y no mostraron diferencias entre ellos en ningún día. El grupo SC/SC/IN tuvo su pico de respuesta el día 20 ( $190.9 \pm 116.7 \mu\text{g/ml}$ ), el SC/TC/IN el día 27 ( $230.1 \pm 114.2 \mu\text{g/ml}$ ) y se mantuvo diferente contra el control hasta el día 57 ( $P < 0.041$ ), y el SC/TC/TC tuvo su pico el día 27 ( $268.5 \pm 98.5 \mu\text{g/ml}$ ) y también tuvo diferencia contra el control hasta el día 57 ( $P < 0.05$ ) (figura 9).

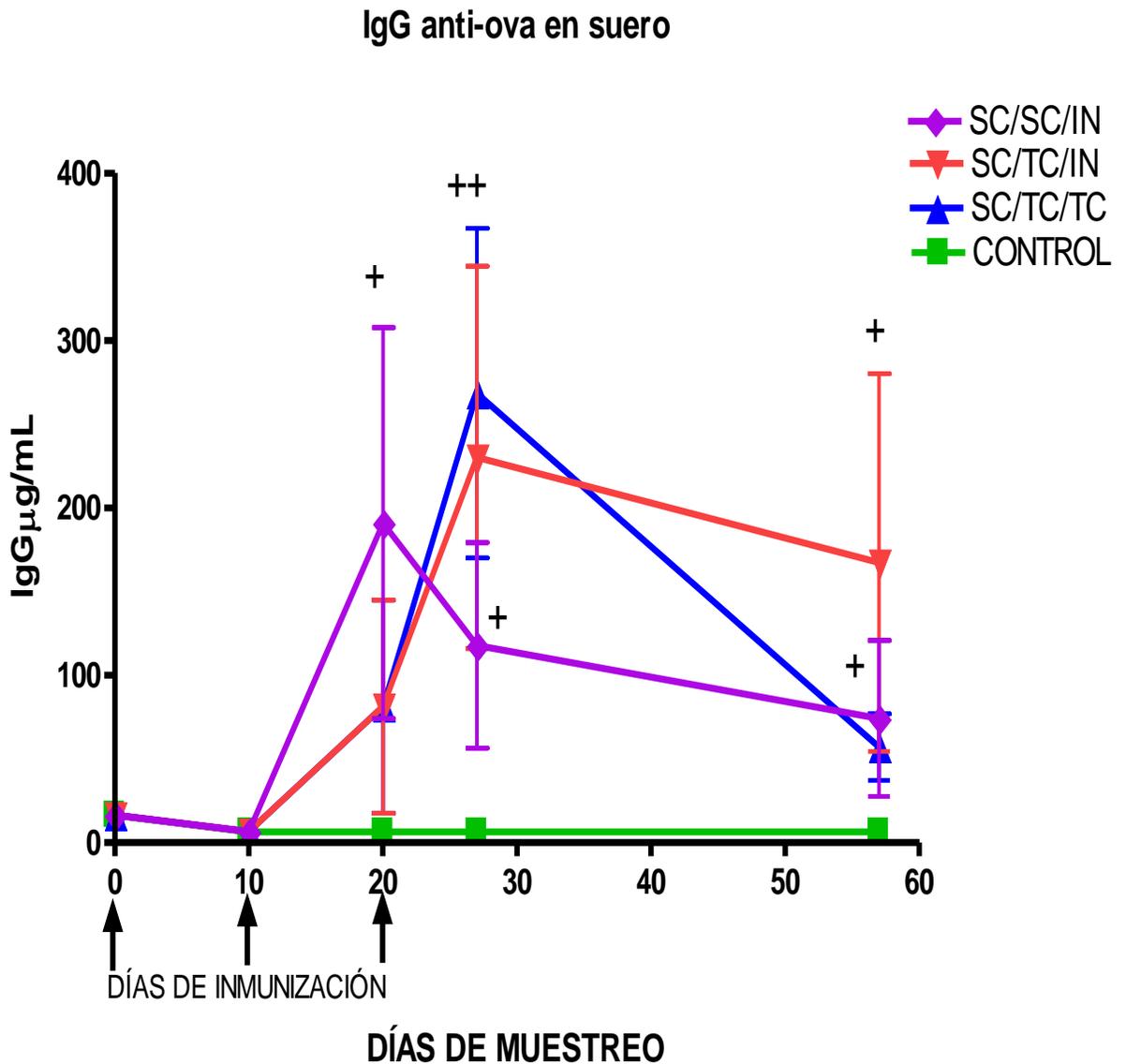


Figura 11.- Concentración de IgG específica contra ovoalbúmina en suero de cerdos destetados inmunizados con distintos protocolos, SC/TC/TC, SC/TC/IN y SC/SC/IN. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) representan diferencias contra el grupo control, + ( $P < 0.05$ ), ++ ( $P < 0.01$ ) y las flechas muestran los días que se realizaron las inmunizaciones.

## **IgA anti-ova en suero**

En la figura 10 se muestra el promedio y error estándar de la concentración de IgA anti-ova en suero (ng/mL), de 5 animales por grupo de tratamiento.

El pico de respuesta de todos los grupos fue el día 27 post inoculación con los siguientes valores, SC/TC/TC,  $170.7 \pm 31.1$  ng/mL; SC/TC/IN,  $252.9 \pm 100.9$  ng/mL; y SC/SC/IN,  $230.5 \pm 91.8$  ng/mL, con diferencias significativas en los días 20 ( $P < 0.001$ ) y 27 ( $P < 0.0063$ ) contra el grupo control ( $27.4 \pm 4.8$  ng/mL). Al día 57 solo hubo diferencia con el grupo SC/TC/IN ( $P < 0.001$ ). No se encontró diferencia significativa entre tratamientos (figura 10).

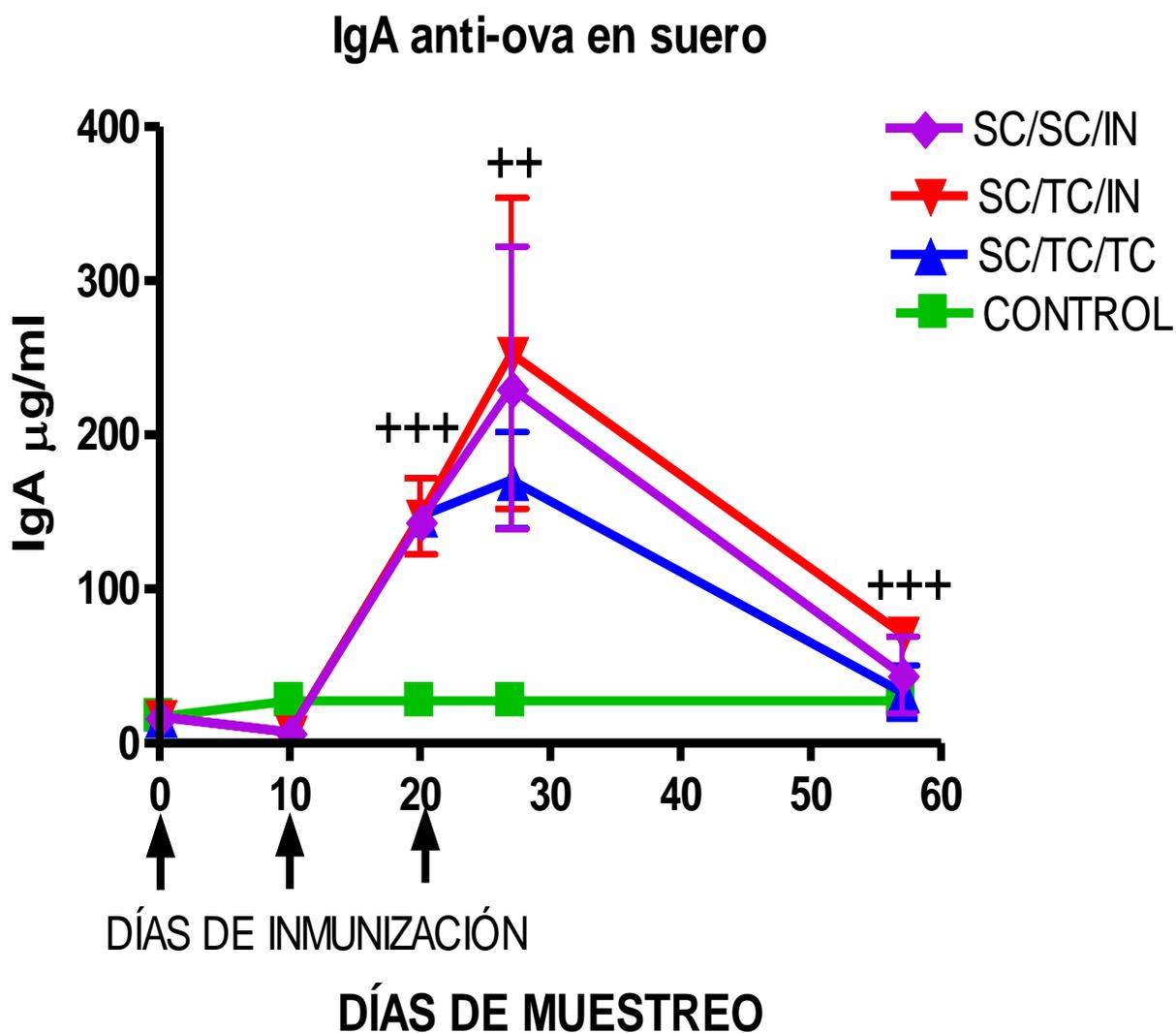


Figura 10.- Concentración de IgA específica contra ovoalbúmina en suero de cerdos destetados inmunizados con distintos protocolos, SC/TC/TC, SC/TC/IN y SC/SC/IN. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) representan diferencias contra el grupo control, ++ (P<0.01), +++ (P<0.001) y las flechas muestran los días que se realizaron las inmunizaciones.

### **IgG anti-ova en secreción nasal**

Los valores de IgG anti-OVA en secreción nasal mostraron que la respuesta fue nula, en todos los grupos y en todos los días (datos no mostrados).

### **IgA anti-ova en secreción nasal**

En la figura 11 se muestran los valores de todos los días para cada tratamiento de IgA anti-ova en secreción nasal (ng/ml), con sus promedio y error estándar de por lo menos 5 animales por grupo. En secreción nasal, los grupos tratados tuvieron diferencia significativa contra el grupo control ( $6.9 \pm 2.4$  ng/mL) desde el día 27, el grupo SC/TC/TC,  $27.6 \pm 5.7$  ng/mL ( $P < 0.0016$ ); el SC/TC/IN,  $24.5 \pm 11.2$  ng/mL ( $P < 0.0176$ ) y el SC/SC/IN,  $37.0 \pm 0.9$  ng/mL ( $P < 0.0032$ ). Los grupos SC/TC/TC,  $16.6 \pm 6.4$  ng/mL ( $P < 0.0245$ ) y SC/SC/IN  $27.8 \pm 12.7$  ng/mL ( $P < 0.0469$ ), se mantuvieron diferentes contra el control hasta el día 57 (figura 11).

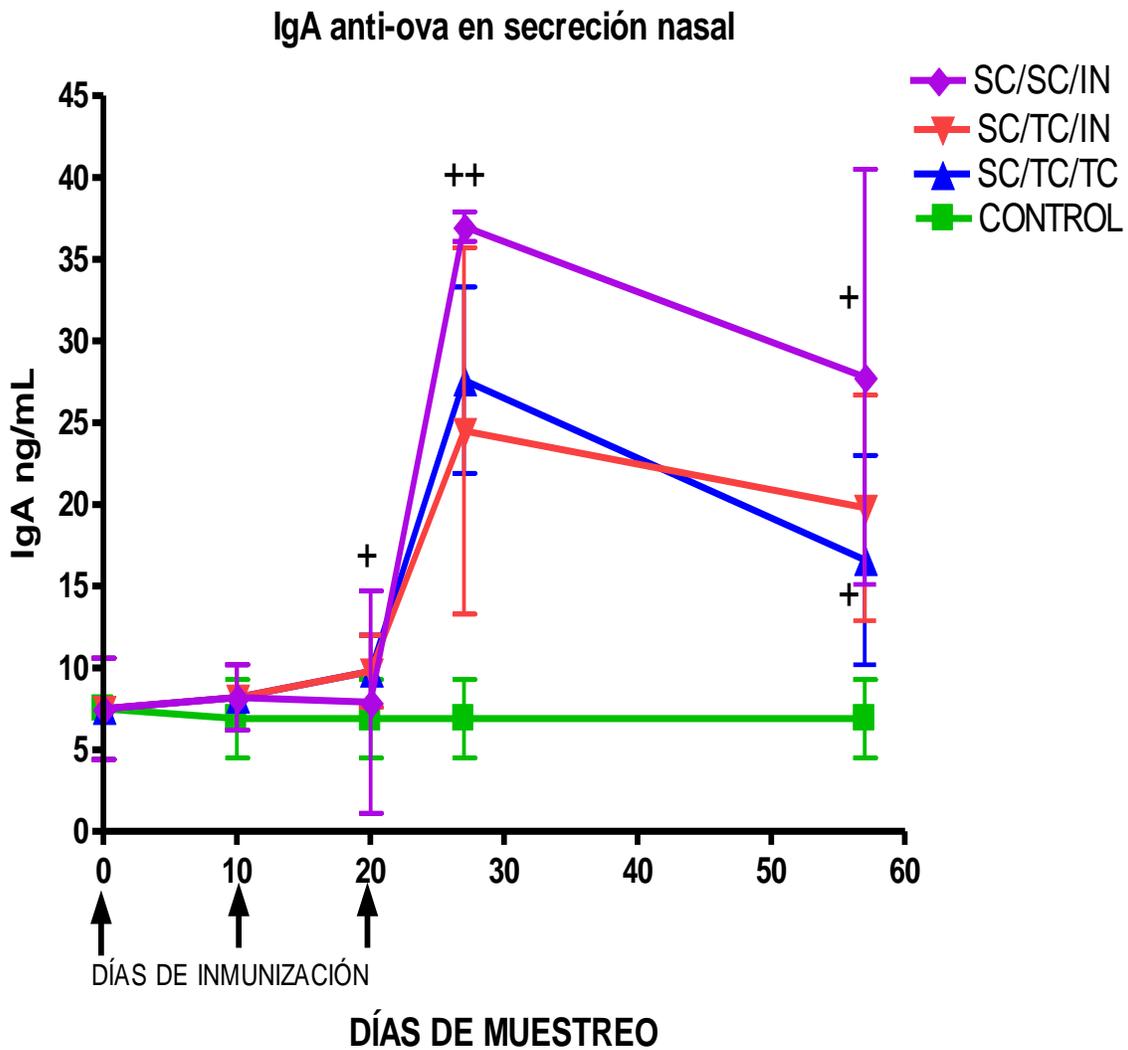


Figura 11.- Concentración de IgA específica contra ovoalbúmina en secreción nasal de cerdos destetados inmunizados con distintos protocolos, SC/TC/TC, SC/TC/IN y SC/SC/IN. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) representan diferencias contra el grupo control, + ( $P < 0.05$ ), ++ ( $P < 0.01$ ) y las flechas muestran en los días que se realizaron las inmunizaciones.

### **IgG anti-ova en saliva**

En esta muestra la respuesta fue nula, en todos los grupos y en todos los días.

### **IgA anti-ova en saliva**

En la figura 12 se muestran los promedios y error estándar de IgA anti-OVA en saliva (ng/ml) de de por lo menos 5 animales por tratamiento. En saliva todos los grupos tratados tuvieron diferencia significativa contra el control ( $2.9 \pm 2.6$  ng/mL) desde el día 10, siendo el pico de respuesta para el grupo SC/TC/TC ( $45.56 \pm 10.1$  ng/ml,  $P < 0.001$ ) el día 20 y para los grupos SC/TC/IN ( $63.7 \pm 5.2$  ng/mL,  $P < 0.001$ ) y SC/SC/IN ( $50.3 \pm 2.8$  ng/mL  $P < 0.001$ ), el día 27. Además se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos SC/TC/IN y SC/SC/IN contra SC/TC/TC en ese día. Los grupos SC/TC/IN ( $46.4 \pm 19.3$  ng/mL,  $P < 0.05$ ) y SC/SC/IN ( $28 \pm 15.2$  ng/mL,  $P < 0.05$ ), mantuvieron diferencia contra el control hasta el día 57 (figura 12).

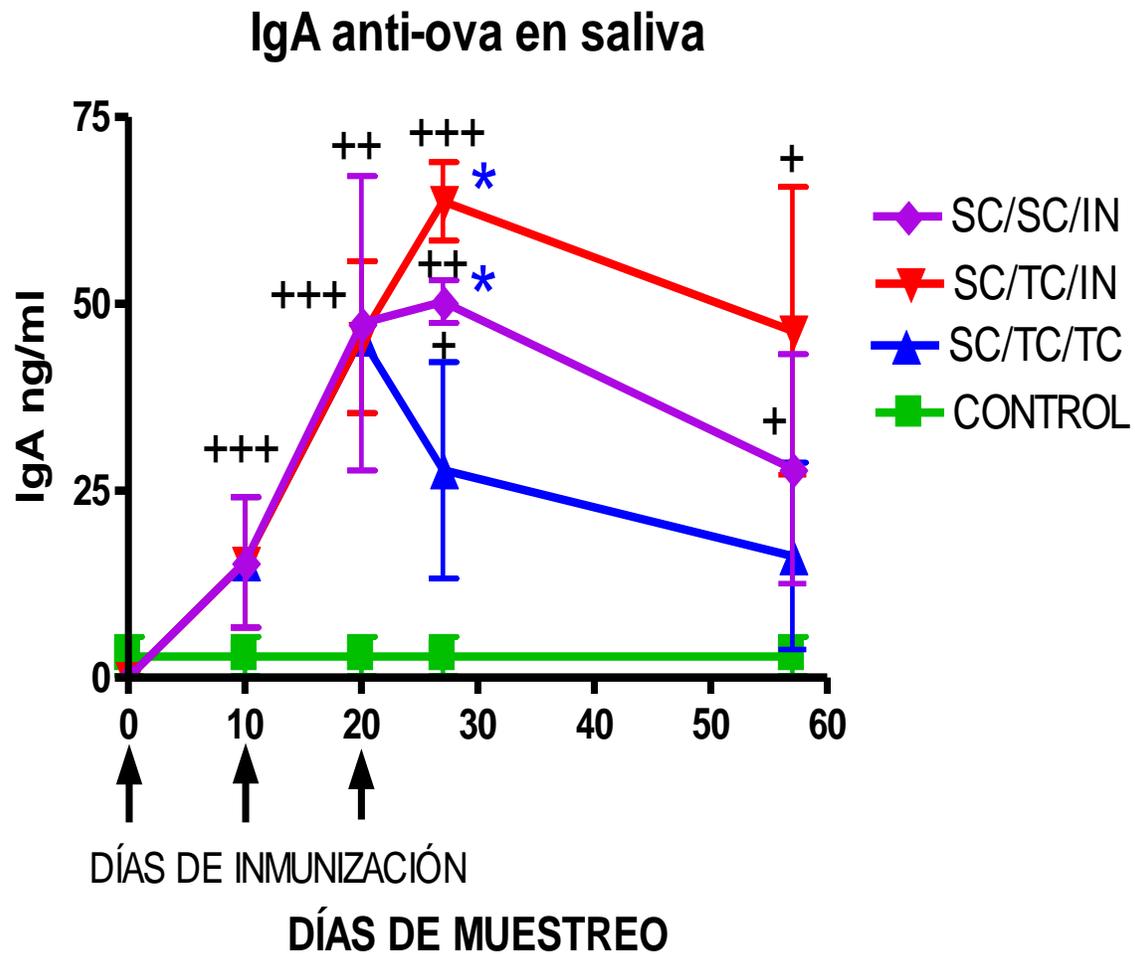


Figura 12.- Concentración de IgA específica contra ovoalbúmina en saliva de cerdos destetados inmunizados con distintos protocolos, SC/TC/TC, SC/TC/IN y SC/SC/IN. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. Las cruces (+) representan diferencias contra el grupo control y los asteriscos (\*) representan diferencias entre grupos, los azules contra el grupo SC/TC /TC. + (P<0.05), ++ (P<0.01), +++ (P<0.001) y las flechas muestran los días que se realizaron las inmunizaciones.

## 7 DISCUSIÓN

La porcicultura en México es una de las principales industrias agropecuarias (Germán *et al.*, 2005; Ortiz, 2008) y se debe mantener el buen estado sanitario de los animales para evitar el aumento de los costos. Una de las principales causas de esos aumentos son las enfermedades infecciosas (González, 2000), y una de las actividades efectivas para controlarlas es la vacunación (Rojas-Espinosa, 2006). En este trabajo se utilizaron cerdos destetados por 3 razones principales, la primera es que entre los 14 y 21 días de edad el cerdo se encuentra con niveles mínimos de anticuerpos maternos (Buxadé, 1996; Medel *et al.*, 1999; Cano y Pijoan, 2008), la segunda es que los cerdos no son capaces de producir su propia actividad inmunológica en cantidades adecuadas hasta al menos 28-30 días de edad (Cano y Pijoan, 2008), y la última es que los factores del destete, representan cambios muy agresivos con los cuales se pueden presentar problemas infecciosos de tipo diarreicos y neumónicos (García, 2002), y el bienestar en esta etapa va influir en los parámetros productivos durante la engorda (Forcada, 1997; Medel *et al.*, 1999; Chapinal *et al.*, 2006; Cano y Pijoan, 2008), por lo que es importante inducir inmunidad contra agentes patógenos lo más temprano posible para minimizar los problemas. En el presente trabajo, se evaluaron vías de inmunización que fueran capaces de producir inmunidad mucosal y sistémica en cerdos destetados, ya que la inmunidad más efectiva contra las infecciones respiratorias implica una respuesta de IgG e IgA (Ogra, 2003).

En el experimento 1 se probaron las rutas de inmunización SC y TC, después de que en el grupo de trabajo del Dr. Vega-López se demostró que las vías IM y SC son equivalentes (datos sin publicar) para estimular la respuesta inmune sistémica (Bowersock, *et al.*, 1997).

El grupo SC/SC fue el de mejor respuesta de IgG anti-ova en suero (ver figura 3), porque la vía parenteral induce una rápida y fuerte respuesta inmune humoral sistémica (Brokstad, 2002; Bernardy, 2008) y esta respuesta está representada por la presencia de altos niveles de IgG. En contraste, la pobre respuesta de los grupos donde se utilizó la vía TC se podría deber a que la aplicación tópica de la vacuna no proporciona la suficiente cantidad de

antígeno en la piel para generar una respuesta inmune adecuada, la concentración del inóculo podría ser muy baja para obtener buena respuesta y no hay buena captación por las células especializadas. La vía TC cuando se aplica con un coadyuvante, como la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT) y la toxina de *V. cholera* (CT) , en el sitio de administración del antígeno, proporcionan las señales de activación necesarias para la maduración de las células dendríticas, que expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras, secretan citocinas, y se conviertan en potentes células presentadoras de antígeno (CPA) capaces de impulsar la respuesta inmune al coadministrar el antígeno (Belyakov, *et al.*, 2004). Por el momento, el uso de toxinas como inmunoestimulantes no es una opción viable para uso humano ni veterinario.

El propósito de la prueba intradérmica fue observar la respuesta *in vivo* de las vías de inmunización utilizadas. Los resultados mostraron que el grupo SC/SC fue el que tuvo mejor respuesta ya que 4 de los 5 animales tuvieron una reacción positiva que se manifestó por la aparición de un eritema a las 24 horas post- inoculación. Esto se puede deber a que la respuesta de células B contra antígenos específicos fue más efectiva por esta vía de inmunización (Janeway, ,2003). En contraste, los animales inmunizados por la vía TC tuvieron buena respuesta sistémica, pero pobre respuesta intradérmica, tal vez porque en esta vía se requiere usar un adyuvante (tabla 9) (Chen, 2002).

En la respuesta de IgA anti-OVA en suero (figura 4) los protocolos SC/SC y SC/TC tuvieron una respuesta similar, la inmunización parenteral se ha reportado que induce la respuesta de IgA en suero poco después de la inmunización (Underdown, 2005) y además de que genera células de memoria que, al dar un segundo refuerzo, se estimulan y generen respuesta contra el antígeno. Por el contrario, el grupo TC/TC no logró que el antígeno generara respuesta en la primera inmunización y por lo tanto al colocar el refuerzo la respuesta no se logró.

En secreción nasal, la IgA anti-OVA (figura 6) en los grupos SC/SC y SC/TC tuvo su pico de respuesta 14 días después de la última inmunización, además de haber sido tardía la respuesta, también fue efímera, posiblemente porque la inmunización parenteral no induce buena respuesta en la mucosa o lo hace débilmente, más variable y de vida más corta que

las obtenidas con la inmunización mucosal (Rebelatto, *et al.*, 2001; McCluskie, 2002; Neutra, 2006). Giri *et al.*, observaron que la inmunización subcutánea genera solamente respuesta inmune sistémica, caracterizada por altos niveles de IgG en suero. Los bajos niveles de IgA en las secreciones después de la inmunización SC consisten en que en el tejido linfoide asociado a mucosas es donde inicia la respuesta inmune local (Giri, *et al.*, 2005) y al no ser una inmunización local, la respuesta es tardía y efímera en secreción nasal.

En los resultados de las concentraciones de IgA anti-OVA en saliva (figura 8), se observó que los tres grupos tuvieron respuesta desde la primera inmunización, y esto puede deberse a que la inmunización SC fue detrás de la oreja, cerca de los ganglios mandibular, retrofaríngeo y parotídeo, y estos tienen afinidad a la cavidad oral (Bernal, *et al.*, 2005) y están cerca de las glándulas salivales, que son responsables de la secreción de IgA secretora en la cavidad oral (Tappuni, *et al.*, 2005), por esta razón en los grupos donde se utilizó la ruta SC, se detectó la presencia de IgA en saliva y al dar el segundo refuerzo SC se logró mantener los niveles a lo largo de todo el muestreo y en los grupos donde se utilizó la inmunización TC no logró estimular al sistema inmune para mantener los niveles de inmunoglobulinas en esta muestra.

Respecto a la respuesta de IgG anti-ova en secreción nasal y saliva, el grupo que tuvo mejor respuesta fue el SC/SC, sin embargo se observó que la respuesta fue a nivel individual (figuras 5 y 7), esto puede ser porque las IgG no son tan resistentes a la degradación por las proteasas bacterianas (Neutra, 2006), a que las IgG no pueden pasar tan fácilmente del torrente sanguíneo a la mucosa (Mowat, *et al.*, 2005), a que la muestra no se conservó de forma adecuada y que se necesita un inhibidor de un espectro más amplio al que se ocupó. La presencia de IgG en las mucosas es el resultado de la producción local o consecuencia de la trasudación del suero (Enioutina, 1999).

La respuesta de la inmunización por vía SC/SC y SC/TC fue buena, sin embargo se buscaba una respuesta más duradera a nivel de mucosas. En estudios realizados con anterioridad se ha observado que para obtener buena respuesta inmune se necesitan al menos 3 inmunizaciones (Rebelatto, 2001; Alcón, 2005; Giri, 2005) y también se ha

observado que el método más efectivo para inducir inmunidad en las mucosas en el tracto respiratorio alto es la inmunización intranasal (Rebelatto, 2001), por lo consiguiente se decidió a probar estos protocolos de inmunización añadiendo una inoculación a nivel de mucosas, para ver si podía generar una respuesta más consistente y duradera. La decisión de usar la inmunización intranasal fue porque se ha visto que esta ruta de vacunación es efectiva para conferir protección contra enfermedades infecciosas (Giri, 2005), además de inducir respuesta específica mucosal de anticuerpos IgA en glándulas salivales y tracto respiratorio alto y bajo (Neutra y Kozlowski, 2006). Por esta razón al utilizar un protocolo que combina la vía parenteral y mucosal, se podría obtener una respuesta integral.

Los resultados del Experimento 2, mostraron que para IgG anti-OVA en suero (figura 9) los tres protocolos de inoculación tuvieron respuesta a partir de la segunda inoculación, al igual que en el experimento anterior, el grupo que destacó en esta fecha fue el SC/SC/IN que tuvo la mejor respuesta, ya que la vía parenteral estimula mejor la respuesta sistémica, además de que al dar la primera vacunación crea células de memoria y ya que este grupo recibió la segunda inmunización por vía parenteral su respuesta secundaria es mejor, más alta y superior a los de los grupos de SC/TC/IN y SC/TC/TC. Paradójicamente, después de la tercera inmunización estos dos últimos grupos tuvieron una respuesta superior a la del primero, aunque sin significancia estadística, pero se puede ver que la tercera inmunización fue la que determinó el aumento o disminución de la concentración de IgG sérica en los grupos. La disminución de IgG en el grupo SC/SC/IN podría deberse a que al ser estimulado en dos ocasiones por la vía subcutánea, la vía intranasal no logró estimular satisfactoriamente a nivel sistémico o podría tratarse de un efecto de tolerización ((Mestecky, 2005)).

La respuesta sérica de IgA anti-ova en los tres grupos tratados fue evidente y sin diferencias significativas entre ellos (figura 10). Es importante mencionar que la inmunización intranasal hizo que la concentración de esta inmunoglobulina aumentara más en los protocolos donde se utilizó esta vía, Se ha reportado que la inmunización combinada SC/IN induce altos niveles de IgA sérica, en comparación al protocolo SC/SC que produce altos

niveles de IgG sérica (Alacón, *et al.*, 2005) por lo que se puede decir que la inmunización IN induce respuesta efectora en los tejidos locales (Segmen, *et al.*, 2004).

A nivel de IgA anti-OVA en secreción nasal la respuesta apareció hasta la tercera inmunización (figura 11). Esto podría deberse a que la inmunización mucosal induce respuestas efectoras a nivel local (Segmen, *et al.*, 2004). En este caso todos los protocolos de inmunización funcionaron, pero se destaca el grupo SC/SC/ que fue diferente contra el control al día 57, puede ser que esta diferencia se deba a la capacidad del sistema inmune de reconocer al Ag tras una primera inmunización, y se generan dos tipos de linfocitos, unos de vida corta cuya función es eliminar las células infectadas por el patógeno y otros conocidos como células de memoria. Estos últimos linfocitos, que pueden llegar a vivir incluso tanto como el propio organismo, son los que se ocupan de mantener la memoria inmunológica, esto es, de recordar al patógeno para activar en el futuro una respuesta inmune mucho más rápida y efectiva ante el mismo microorganismo (Gonzalez, 2000). Por esta razón, la inoculación parenteral probablemente indujo una respuesta de sensibilización a nivel sistémico, generando células de memoria distribuidas en todo el organismo y la inoculación intranasal logró activar esas células en las mucosas, aumentando la respuesta a nivel de secreción nasal.

La respuesta de IgA anti-ova en saliva se evidenció desde la primera inmunización en los 3 grupos (figura 12) y fue diferente contra el control desde el día 10 post-inoculación. Al igual que en el experimento 1, la segunda estimulación hizo que la concentración de IgA aumentara hasta el doble en los 3 protocolos, y la tercera inmunización por la vía intranasal mantuvo los grupos diferentes contra el control hasta 30 días después de la última inoculación. Además, recientemente se ha comprobado que la inmunización intranasal es el método más eficaz para inducir anticuerpos en las mucosas incluyendo la saliva. Comparativamente, la nariz parece ser más eficaz que el intestino y da lugar a una respuesta mayor y de más larga duración (Challacombe y Shirlaw, 1991). Sin embargo, hay que tomar en cuenta, que la vía IN puede inducir tolerancia y esto depende de la dosis y la frecuencia en la que se aplica un antígeno (Tappuni, *et al.*, 2005), mientras que la TC bajó sus niveles después de su último refuerzo. La producción de IgG anti-ova en la secreción

nasal y saliva en este experimento fue nula, esto puede deberse a que las IgG son más susceptibles a la degradación proteolítica de las proteasas bacterianas (Neutra y Kozlowski., 2006), por lo que la conservación de las muestras tal vez no fue la adecuada y que el inhibidor de proteasa no fue suficiente para conservar las muestras. Otra razón podría ser que las IgG no pueden pasar fácilmente a la superficie de las mucosas.

En este experimento el grupo que destacó fue el SC/SC/IN que mantuvo la respuesta de IgA anti-OVA en suero y saliva diferente contra el control hasta 30 días después del último refuerzo. Por ello, la inmunización TC funciona adecuadamente después de una inmunización previa vía parenteral, y esto podría deberse a la respuesta secundaria que el sistema inmune genera al entrar en contacto con el antígeno, aunque sea una pequeña cantidad, en las mucosas.

Este experimento mostró que la vía intranasal es capaz de inducir tanto respuesta inmune sistémica como local, cuando se combina con un refuerzo subcutáneo (Alcón, 2005).

Los resultados sugieren que una primera inmunización por la vía SC puede inducir respuesta inmune sistémica (Bowersock, *et al.*, 1997) y combinando rutas de inmunización resulta en el incremento de IgG así como de IgA anti-OVA, siempre y cuando la vía de inmunización que se ocupe en el segundo o tercer refuerzo, sea mucosal, porque al estar el sistema inmune sensibilizado a nivel sistémico, hace que la respuesta después del refuerzo sea buena. Con estos protocolos combinados se demostró que no es necesaria la utilización de adyuvantes agresivos para inducir una respuesta, en contraste con los trabajos empleando únicamente la ruta intranasal (Sedgmen *et al.*, 2004; Giri *et al.*, 2005).

La diferencia más notable en los experimentos es que la tercera inmunización aumento y mantuvo los niveles en las secreciones, que es la parte que más interesa para la protección de los individuos.

En este trabajo se utilizó ovoalbúmina, que es antígeno soluble, de pobre inmunogenicidad y, aunque no es un antígeno relevante para las infecciones en las superficies de las mucosas (Imai *et al.*, 2004), es un antígeno estándar, purificado que permite realizar la prueba de concepto y facilita la realización de la técnica de ELISA sin interferencia de otros

componentes. Por otro lado, los experimentos fueron realizados en una granja porcina en la que, por bioseguridad, no se pueden introducir microorganismos patógenos.

## 8 CONCLUSIÓN

Se requiere una primera inmunización parenteral para alertar al sistema inmune y posteriormente otra inoculación que pueden ser por cualquier vía mucosal para que la respuesta sea más consistente y duradera.

La vía intranasal es efectiva, aplicada después de otra vía de inoculación.

Para obtener respuesta inmune sistémica y local contra ovoalbúmina, los protocolos de inmunización combinados (parenteral y mucosal) son efectivos que los que se aplican por una sola vía o por vías convencionales como la subcutánea e intramuscular.

Este trabajo fue realizado con la finalidad de que estas vías sean implementadas o utilizadas contra un microorganismo.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Aiello SE, 2000., El manual Merck de veterinaria, 5<sup>ta</sup> ed. Barcelona (España): Océano Grupo Editorial, S.A. Pp 284-315, 2238-2250.
- Alcón, V., Baca-Estrada, M., Vega-López, M., Willson, P., Babiuk, L., Kumar, P., Hecker, R., and FolFolduari, A., 2005. (B) Mucosal Delivery of Bacterial Antigens and CpG Oligonucleotides Formulated in Biphasic Lipid Vesicles in Pigs, *The AAPS Journal*; 7(3), E 566- E517.
- Alcón, V., Baca-Estrada, M., Vega-López, M., Willson, P., Babiuk, L., Kumar, P., Hecker, R., and FolFolduari, A., 2005.(A) Intranasal immunization using biphasic lipid vesicles as delivery systems for OmIA bacterial protein antigen and CpG oligonucleotides adjuvant in a mouse model, *Pharmacy and Pharmacology*, 57; 955-961.
- Aldaz, A., 2002, Enfermedades respiratorias del cerdo: algunos aspectos prácticos a considerar en el diagnóstico y control para la resolución de casos clínicos. *Anaporc* 221, 78-102.
- Batista, DA., 2003, Aplicación intranasal de vacunas, estado actual y prespectivas, *Revista Mexicana de patología clínica*, 50;(4), 199-208.
- Belyakov, I.M., Hammond, S.A., Ahlers, J.D., Glenn, G.M., Berzofsky, J.A., 2004, Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J Clin Invest* 113, 998-1007.
- Berinstein, A., Vazquez-Rovere, C., Asurmendi, S., Gomez, E., Zonetti, F, Zabal, O., Tozzin, A., Conte Grand, D., çTaboga, O., Calamante, G., Hebe Hopp, E., Carrillo, E., 2005. Mucosal and Systemic immunization elicited by newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens, **Vaccine**, 23, Pp 5583-5589
- Bernal, ZH., Carmona, OA., Carrillo, MF., Flores, OG., García, TC., González, LC., Hernández, HR., Nieto, BJ., Oliver, GM., Ortiz, BT., Reyes, PM., Reyes, SA., Soto, ZC., y Waldo, TS., 2005., Anatomía topográfica, apuntes y manual de prácticas, FES-C UNAM, Dep. Cienc. Biologicas, Secc. de Cienc. Morfológicas Agropecuarias, Pp 21-47.

- Bowersock, L.T., HogenEsch, H., Torregrosa, S., Borie, D., Wang, B., Park, H, Park, K., 1997, Induction of pulmonary immunity in cattle by oral administration of ovalbumin in alginate microspheres. *Immunology Letters* 60, Pp 37-43.
- Brave, A., Hallengard, D., Schroder, U., Blomberg, P., Wahren, B., Hinkula, J., 2008, Intranasal immunization of young mice with a multigene HIV-1 vaccine in combination with the N3 adjuvant induces mucosal and systemic immune responses. *Vaccine* 26, Pp 5075-5078.
- Boyaka, N. P., Mc Ghee, R.J., Gerkinsky, C., Mestecky, J., *Mucosal Vaccines: An Overview*, USA, Mucosal Immunology, Editorial ELSEVIER Academic press, 2005, 3ª edition. Pp 855-860.5
- Buxadé, C.C., 1996, *Zootecnia: Bases de Producción Animal*, Vol VI, 1º Edition. Mundi-Prensa, España, Pp 171-179
- Challacombe, SJ, and Shirlaw, PJ, 1991., Oral ulceration: When to treat, refer or ignore. *Dental Update* 52, 368-373.
- Caballero de la Calle, J., 1996, *Enfermedades respiratorias de los cerdos*. MG Mundo ganadero 75, Pp 32-34.
- Cano JP, Pijoan C. 2008 *Salud de los lechones después del destete*. Universo Porcino [www.aacporcinos.com.ar/]. Octubre 2008 [citada el 10 mayo 2009]. Disponible: [http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/manejo\\_porcino\\_salud\\_de\\_los\\_lechones\\_des\\_pues\\_del\\_destete\\_2da\\_parte.html](http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/manejo_porcino_salud_de_los_lechones_des_pues_del_destete_2da_parte.html).
- Ciprian, C., Mendoza, E. 2007. *La investigación en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (México, Querétaro)*, Memorias del XLII Congreso Nacional de AMVEC, A.C.), Pp. 27-37.
- Chapinal, N., Dalmau, A., Fàbrega, E., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J.L., Velarde, A., 2006, Bienestar del lechón en la fase de lactación, destete y transición. *Avances en Tecnología porcina*, Pg 77.
- Chavéz, E., 2009; *Técnicas diagnósticas para el Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS): Interpretación.*, México. Departamento Técnico –PIC México. [consultada 24 mayo 2011]. Disponible: <http://www.engormix.com/MA-porcicultura/sanidad/articulos/tecnicas-diagnosticas-sindrome-reproductivo-t215/165-p0.htm>

Cushing, Je., nad Campbell, DH., Principios de inmunología, Zaragoza, España, Acribia, 1960, 1ª edición., Pp 307-312.

Enioutina EYu, Visic DM, McGee ZA, Daynes RA, 1999. 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*; 17(23-24): 3050-3064

Falero-Diaz, G., Challacombe, S., Banerjee, D., Douce, G., Boyd, A., Ivanyi, J., 2000. Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 18, 3223-3229.

Felder, C.B., Vorlaender, N., Gander, B., Merkle, H.P., Bertschinger, H.U., 2000. Microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* and detached fimbriae for peroral vaccination of pigs. *Vaccine* 19, 706-715.

Forcada, F., 1997, Alojamiento para ganado porcino, Vol 1, 1º Edition. Mira Editores, S.A, España, 32-35, 199-211.

García, C.D., 2002, Etología, manejo físico y alternativas terapéuticas en cerdos, Vol 1, 1º Edition. ADC, México, Pp. 45-51.

García, A., Herrera, ZL., Alvarado, EK., Garcidueñas, C., Guerrero, BA. 2007. Estandarización de técnicas para la detección de enfermedades respiratorias del cerdo, I. Análisis de cambios morfológicos. Noveno verano de la ciencia de la región central (Universidad Autónoma de Querétaro, Memorias del programa verano de la ciencia 2007). Pp 1-5.

Germán AC, Camacho RJ, Gallegos SJ., 2005. Secretaría de la Reforma Agraria [www.sra.gob.mx/]. Manual del participante producción de cerdos. México D.F, (SRA) 2005, [citada 07 junio 2009]. Disponible: [http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tierras/manuales/Prod\\_Cerdos.pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/Prod_Cerdos.pdf) (México, Secretaria de la Reforma Agraria).

Giri, P.K., Sable, S.B., Verma, I., Khuller, G.K., 2005, Comparative evaluation of intranasal and subcutaneous route of immunization for development of mucosal vaccine against experimental tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45, 87-93.

Gleeson, M., Francis, J.L., Lugg, D.J., Clancy, R.L., Ayton, J.M., Reynolds, J.A., McConnell, C.A., 2000. One year in Antarctica: mucosal immunity at three Australian stations. *Immunol Cell Biol* 78, 616-622.

- González, M., 2000. Control de complejo respiratorio porcino a través de diferentes tratamientos usando lincomicina y vacunación A *Mycoplasma hyopenumoniae*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F Salud Animal 30, 13-29
- Guzmán-Vázquez, E., 2004, Las pruebas de ELISA. Méd Méx Vol. 140, Suplemento No. 3, 548-549
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., 2005, Mucosal immunity and vaccines. Nat Med 11, S45-53.
- Imai, Y., Nagai, R., Ono, Y., Ishikawa, T., Nakagami, H., Tanikawa, T., Kurohane, K., 2004, Production of secretory immunoglobulin A against Shiga toxin-binding subunits in mice by mucosal immunization. Infect Immun 72, 889-895.
- Janeway, C., Travers, P., Shlomchik, M., Inmunología; El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad, 2ª Edición, Masson, 2003.50-114.
- Unión Ganadera Regional de Jalisco [www.ugrj.org.mx/]. El destete parcial de lechones. México (Jalisco), (UGRJ) 2008, [citada 2 junio 2009]. Disponible:  
[http://74.125.47.132/search?q=cache:K\\_xJinaIrVUJ:www.ugrj.org.mx/index2.php%3Foption%3Dcom\\_content%26do\\_pdf%3D1%26id%3D373+%22el+destete+parcial+de+lechones%22&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx](http://74.125.47.132/search?q=cache:K_xJinaIrVUJ:www.ugrj.org.mx/index2.php%3Foption%3Dcom_content%26do_pdf%3D1%26id%3D373+%22el+destete+parcial+de+lechones%22&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx).
- Kurono, Y., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Kodama, S., Suzuki, M., Mogi, G., McGhee, J.R., Kiyono, H., 1999, Nasal immunization induces Haemophilus influenzae-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. J Infect Dis 180, 122-132.
- Mayer, L., Shao, L., 2004, Therapeutic potential of oral tolerance. Nat Rev Immunol 4, 407-419.
- McCluskie, JM., Weeratna, DR., Payette, JP., Heather, LD.,2002., Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis b superfase antigen and CpG DNS, Immunology and medical microbiology, 32; 179-185.
- Medel, P., Latorre, M., Mateos, G. 1999. Nutrición y alimentación de lechones destetados precozmente (España, Departamento de Producción Animal. Universidad Politécnica de Madrid).. Revista Producción Animal 170, 11-16.
- Mestecky, J., Rossell, M.W., and Elson, C., 2007. Perspectives on Mucosal Vaccines: s Mucosal Tolerance a Barrier?, Immunology, 179, 563-5368.

- Metzger, D. W., 2007. IgA and Respiratory Immunity; Lexington, Kentucky, Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A, Springer, 269-284
- McNeilly, T., Naylor, S., Mitchell N., Mc Ateer, S., Mahajan, A., Smith, D., Huntley, J., 2007. Simple methods for measurement of bovine mucosal antibody responses *in vivo*, Veterinary immunology and immunopathology, 118, 160-167.
- Mowat, MA., Faria MC., Weiner LH., 2005, Oral Tolerance: Physiologic Basis and Clinical Applications, USA, Mucosal Immunology, ELSEIVIER, 2005, 3<sup>a</sup> edition. Pp 487-530
- Murria R. Spiegel, Estadística, 2<sup>a</sup> Edición España, Mc. Graw Hill, 1991. Pp 42-56
- Neutra, R., Kozlowski, PA., 2006, Mucosal vaccines: the promise and the challenge. Nature 6,148-158.
- Ogra, P.L., 2003, Mucosal immunity: some historical perspective on host-pathogen interactions and implications for mucosal vaccines. Immunol Cell Biol 81, 23-33.
- Ortiz, R., Jaimes, H., Gómez, B., Pérez, RE., 2008, Análisis económicos de los sistemas semi-intensivos de producción porcina de Purepero, Michoacán. . Revista Computadorizada de Producción Porcina 15, 282-286.
- Pluske, J.R., Le Dividich, J., Verstegen, M.W.A., 2003, weaning the pig concepts and consequences, Vol 1, primera Edition. Wageningen Academic, Pg 432 .
- Porcaro J. 2007 Máxima eficiencia. Conciencia Rural la vida del campo [www.concienciarural.com.ar/...vida-del-campo/art321.aspx]. Agosto 2007 [citada el 17 mayo 2009]. Disponible: <http://www.concienciarural.com.ar/articulos/produccion-porcina/maxima-eficiencia/art43.aspx>
- Porporatto, C., Darío BC., Correa, SG. 2007., La modulación del sistema inmune de mucosas con polisacáridos Bases para una atractiva alternativa en terapia, Acta BIOQUÍM. CLÍN. LATINOAM. v.41 n.2.203-211,
- Rebelatto, M.C., Guimond, P., Bowersock, T.L., HogenEsch, H., 2001, Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles. Vet Immunol Immunopathol 83, 93-105.
- Rojas-Espinosa, O., 2006, Inmunología (de memoria), Vol 1, 3<sup>o</sup> Edicion Edition. Editorial Medica Panamericana, México, 27-37,179-210, Pp. 429-448.
- Saito, M., Otake, S., Ohmura, M., Hirasawa, M., Takada, K., Mega, J., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J.R., Takeda, Y., Yamamoto, M., 2001, Protective immunity to

- Streptococcus mutans induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant. *J Infect Dis* 183, Pp. 823-826.
- Sánchez, F. S., Quiroga, C.J.L, Villegas, A. F. 2004. Cisticercosis porcina mediante la técnica “ELISA sandwich” en el matadero de quillacollo del Dpto. de Cochabamba, Tesis para obtener el grado de Medico Veterinario y Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.G.R.M., Santa Cruz, Bolivia, Pg 21
- Sedgmen, B.J., Meeusen, E.N., Lofthouse, S.A., 2007, Alternative routes of mucosal immunization in large animals. *Immunol Cell Biol* 82, 10-16.
- Slayton, KC., 2007, *Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A, IgA and Respiratory Immunity*, editorial Springer, Kentucky, USA, 269-284
- Tosi, M., F 2005, Innate immune responses to infection. *Allergy clin immunol* 116, 241-249.
- Tappuni, AR., Kovacevic, T., Shirlaw, PJ., and Challacombe, SJ., 2005. Clinical Assessment of Disease Severity in Recurrent Aphthous Stomatitis, *Oral Biosciences & Medicine*, 2, 5-13.
- Tizard, I., 2006, *Inmunología Veterinaria*, Vol 1, 6° Edition. McGraw-Hill Interamericana, México, Pp 1-10, 19-49, 254-273.
- Trevizo C, R. 2007: Aumentar la productividad de las granjas es el camino a seguir, para sobrevivir en esta nueva etapa de la porcicultura. *Memorias 2007 Congreso en Producción; 2007, (Sonora) México. Asociación de Veterinario de Navojoa*, [consultada 30 mayo 2009]. Disponible: <http://74.125.47.132/search?q=cache:JCCeI5ShYHIJ:asocvetnavojoa.com/PUBLICACIONES/memorias2007/congreso/produccion/produccion1.pdf+los+porcicultores+y+su+entorno+%2B+Los+Costos+de+la+Ineficiencia+Productiva.%2B+agula&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx>
- Utreta, T. 2007. *Vacunología en la medicina porcina (México, Queretaro, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracay. Aragua. Venezuela.)*, Tesis, Pp. 47-50.
- Underdown, JB., 2005. Parenteral Immunization Induced Mucosal protection: A challenge to the mucosal immunity Paradigm, USA, *Mucosal Immunology*, Editorial ELSEVIER Academic press, 3ª edition. Pp 831-838

Villena, J., Medina, M., Raya, R., and Alvarez, S., 2008. Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* confers protection against respiratory pneumococcal infection, *Can. J. Microbiology*; 54, 845-853.