



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Evaluación de la respuesta a la inmunización oral por virus de DEP en  
cerdas gestantes y su efecto en la inmunidad materna**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**SELENE FERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**ROSA ELENA SARMIENTO SILVA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**SUSANA MENDOZA ELVIRA**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM**

**Ciudad Universitaria, CDMX, Octubre 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, a la Dra. María Elena Trujillo Ortega por brindarme la oportunidad de pertenecer y guiarme en este proyecto, trabajar con ustedes compartiendo su conocimiento y experiencia.

A mi familia por simplemente permitirme llegar a donde estoy, siempre dándome su confianza.

A mis amigos y a Montserrat Eleme García, por darme su amistad, su apoyo y hacer más ameno este recorrido.

Al Dr. Francisco Ernesto Martínez Castañeda por su apoyo y conocimiento brindado en este trabajo.

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo del proyecto de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM. Financiamiento del proyecto “Impacto de la infección por el virus de la diarrea epidémica porcina en cerdas gestantes y su efecto en la inmunidad materna y la protección inmunológica lactogénica. Aprobado IN222020”. Al CONACYT por el otorgamiento de la beca para la realización de estudios de posgrado.

## RESUMEN

El virus de la diarrea epidémica porcina ha ocasionado grandes pérdidas económicas mundiales desde su aparición en 1971. Se caracteriza por causar diarrea, vómito y deshidratación en cerdos, principalmente en lechones, llegando a presentar mortalidades del 100%. Para esta enfermedad es fundamental estimular la inmunidad lactogénica por medio de inmunoglobulinas secretadas en calostro y leche para proteger a los lechones en las primeras semanas de vida, debido a la poca eficacia de las vacunas se han optado por diferentes métodos de inmunización por vía oral utilizando virus activo. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta humoral y celular de cerdas inoculadas con el virus aislado y cuantificado en comparación con el método de feedback e incluyendo un grupo control no inoculado con infección natural, así como la respuesta de los lechones nacidos de estas cerdas. La respuesta de inmunoglobulinas séricas (IgG) y de secreciones mamarias (IgG e IgA) ante los diferentes tratamientos y el análisis por sexo de los lechones no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, la respuesta de IgG en sueros de lechones presenta diferencia significativa en la edad del lechón en el grupo feedback y el grupo control. Los valores de IgG e IgA en calostro y leche en el día 0 mostraron diferencia significativa, particularmente en el grupo feedback, observándose una disminución con respecto a los demás días de lactancia. Por su parte, los valores de anticuerpos neutralizantes mostraron diferencias significativas, siendo el grupo inoculo el que presentó títulos mayores respecto a los otros grupos. Finalmente, no se identificaron diferencias en la detección de IL-12 e IL-22 entre los diferentes tratamientos, pero si en el tiempo postratamiento para IL-12.

## **ABSTRACT**

The swine epidemic diarrhea virus has caused great economic losses worldwide since its appearance in 1971. It is characterized by causing diarrhea, vomiting and dehydration in pigs, mainly in piglets, reaching 100% mortality. For this disease, it is essential to stimulate lactogenic immunity by means of immunoglobulins secreted in colostrum and milk to protect piglets in the first weeks of life. Due to the low efficacy of the vaccines, different inoculation methods have been chosen. Immunization by oral route using active virus. The objective of this study was to evaluate the humoral and cellular response of sows inoculated with the isolated and quantified virus in comparison with the feedback method and including a control group not inoculated with natural infection, as well as the response of the piglets born from these sows. . The response of serum immunoglobulins (IgG) and mammary secretions (IgG and IgA) to the different treatments and the analysis by sex of the piglets did not show significant differences. However, the IgG response in piglet sera shows a significant difference in the age of the piglet in the feedback group and the control group. The values of IgG and IgA in colostrum and milk on day 0 showed a significant difference, particularly in the feedback group, with a decrease compared to the other days of lactation. On the other hand, the values of neutralizing antibodies showed significant differences, being the inoculum group the one that presented higher titles with respect to the other groups. Finally, no differences were identified in the detection of IL-12 and IL-22 between the different treatments, but in the post-treatment time for IL-12.

## Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Coronavirus .....	1
1.2. Diarrea epidémica porcina .....	4
1.2.1. Antecedentes e impacto.....	4
1.2.2. Estructura.....	6
1.2.3. Epidemiología .....	7
1.2.4. Prevención y control .....	9
1.2.4.1. Bioseguridad.....	9
1.2.4.2. Feedback .....	10
1.2.4.3. Vacunas.....	11
1.2.4.4. Inóculo.....	12
1.3. Inmunidad innata .....	13
1.4. Inmunidad adaptativa .....	14
1.4.1. Humoral .....	15
1.4.1.1. Inmunoglobulinas.....	16
1.4.1.1.1. IgG .....	17
1.4.1.1.2. IgA .....	18
1.4.1.1.3. Anticuerpos neutralizantes .....	18
1.4.2. Celular.....	19
1.4.2.1. Citocinas .....	20
1.4.2.1.1. IL-12.....	21
1.4.2.1.2. IL-22.....	23
1.5. Inmunidad lactogénica .....	24
1.5.1. Transporte .....	27
1.5.2. Absorción .....	29
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	30
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	31
4.1. Objetivos específicos .....	31
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	32

<b>5.1. Lugar</b> .....	32
<b>5.2. Antecedentes</b> .....	32
<b>5.3. Grupos de estudio</b> .....	33
<b>5.4. Muestras</b> .....	34
<b>5.4.1. Hembras</b> .....	34
<b>5.4.2. Lechones</b> .....	35
<b>5.5. Pruebas</b> .....	36
<b>5.5.1. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgG</b> .....	36
<b>5.5.2. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgA</b> .....	36
<b>5.5.3. Ensayo de neutralización de la infectividad viral</b> .....	37
<b>5.5.4. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-12</b> .....	38
<b>5.5.5. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-22</b> .....	38
<b>5.6. Análisis estadístico</b> .....	39
<b>6. RESULTADOS</b> .....	39
<b>6.1. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgG</b> .....	39
<b>6.1.1. Suero</b> .....	39
<b>6.1.2. Calostro y leche</b> .....	43
<b>6.2. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgA</b> .....	45
<b>6.3. Neutralización de la infectividad viral</b> .....	47
<b>6.4. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-12</b> .....	48
<b>6.5. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-22</b> .....	49
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>8. CONCLUSIÓN</b> .....	54
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	55

## **Índice de cuadros**

Cuadro 1. Clasificación de citocinas de acuerdo con su efecto biológico (Trinchieri, 2003).....	21
Cuadro 2. Descripción de los sujetos de estudio que conformaron cada grupo analizado. ....	34
Cuadro 3. Resultados estadísticos obtenidos de la determinación por ELISA de IgG contra el DEPV en suero de lechones de diferentes edades. ....	40
Cuadro 4. Resultados estadísticos de IgG en calostro y leche. ....	43

## Índice de gráficas

Gráfica 1. Valores SP de IgG contra el DEPV. A) En suero de hembras tratadas inóculo directo o feedback. B) En suero de lechones de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control. C) En suero de lechones de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por sexo del lechón. D) En suero de lechones de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por edad del lechón 7= 7 días de edad y 21= 21 días de edad. ....	42
Gráfica 2. Valores SP de IgG contra el DEPV en calostro y leche de cerdas A) Tratadas con inóculo directo, feedback o control, B) de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por días de muestreo T=0 calostro, T=7, 14y 21 leche. ....	44
Gráfica 3. Densidad óptica de IgA contra el DEPV en calostro y leche de cerdas A) Tratadas con inóculo directo, feedback o control. B) Tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por días de muestreo T=0 calostro, T=7, 14y 21 leche. ....	46
Gráfica 4. Ensayo de neutralización de la infectividad del DEPV en calostro y leche de cerdas tratadas con inóculo directo, feedback o control. Color rojo= grupo inóculo directo, color azul= grupo feedback y color verde= grupo control. El número de animales está representado en la parte superior de cada barra. ....	47
Gráfica 5. Concentración de IL-12 en sueros de cerdas tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por muestreos. ....	48
Gráfica 6. Concentración de IL-22 en sueros de cerdas tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por muestreos. ....	49

## Índice de figuras

Figura 1. Mapa de distribución mundial de los coronavirus porcinos. A) GETV. B) EHPV. C) CRPV. D) DEPV. E) PDCoV. F) SADS-CoV (Turliewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).....	3
Figura 2. Mapa del tiempo y diseminación del DEPV en el mundo (Bolaños et al., 2016).....	5
Figura 3. Esquema del DEPV. A) Micrografía electrónica de un virión. (B) Diagrama esquemático de la estructura del virión. (C) Mapa genómico DEPV (Yang et al., 2020; Turliewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021). ....	6
Figura 4. Representación esquemática de la transmisión y patogenia del DEPV. ..	8
Figura 5. Elaboración del Feedback con material intestinal proveniente de un lechón infectado con el DEPV (Foto por Rolando Beltrán).....	10
Figura 6. Vacunas contra el DEPV. (A) vacuna comercializada por MSD® (MSD, 2022). (B) vacuna comercializada por Zoetis® (Zoetis, 2016).....	12
Figura 7. Esquema de la respuesta inmune innata en infecciones virales.....	13
Figura 8. Esquema de la respuesta inmune adaptativa en infecciones virales. ....	15
Figura 9. Esquema de la respuesta inmune humoral en infecciones virales. ....	16
Figura 10. Representación esquemática de una inmunoglobulina.....	16
Figura 11. Representación esquemática de los diferentes tipos de inmunoglobulinas. ....	17
Figura 12. Representación esquemática de la inmunoglobulina IgA e SIgA. Modificado de Tizard, 2018.....	18
Figura 13. Esquema de la respuesta inmune celular en infecciones virales. Elaborado en el programa BioRender con base a lo descrito por Fraile, 2018. ....	19
Figura 14. Participación de la IL-12 en la respuesta inmune. Modificado de Trinchieri, 2003.....	22
Figura 15. Papel de la IL-22 en el intestino durante la homeostasis. Los mecanismos de detección que conducen a señales que estimulan la producción de IL-22 están	

en el lado izquierdo, y las funciones efectoras de IL-22 en los diferentes tipos de células epiteliales están en el lado derecho. Modificado de Keir <i>et al.</i> , 2020. ....	24
Figura 16. Representación de la inmunidad lactogénica con el eje intestino-mamario-SIgA (Langel <i>et al.</i> , 2016). ....	27
Figura 17. Transporte de inmunoglobulinas en las células de la glándula mamaria. A) Inmunoglobulina IgG. B) Inmunoglobulina IgA. ....	28
Figura 18. Línea de tiempo de los antecedentes en CEIEPP respecto a DEP. ....	33
Figura 19. Cronograma de toma de muestras sanguíneas de hembras porcinas pie de cría. ....	34
Figura 20. Cronograma de toma muestras de calostro y leche de cerdas. ....	35
Figura 21. Cronograma tomas de muestra sanguíneas en lechones. ....	35
Figura 22. Ejemplos de placas de neutralización. A) Ejemplo de placa con control de células. B) Ejemplo de placa con título bajo de anticuerpos neutralizantes. ....	38

## Lista de abreviaturas

<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>AMP</b>	Proteínas antimicrobianas por sus siglas en inglés
<b>APNp</b>	Aminopeptidasa N porcina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BCR</b>	Receptor de células B por sus siglas en inglés
<b>CCL</b>	Ligandos de quimiocinas
<b>CCR</b>	Receptor de quimiocinas
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CEIEPP</b>	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos
<b>CRPV</b>	Coronavirus Respiratorio Porcino
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados a daño por sus siglas en inglés o
<b>D-MEM</b>	Medio de cultivo esencial mínimo de Eagle modificado por Dubelcco
<b>DEP</b>	Diarrea Epidémica Porcina
<b>DEPV</b>	Virus de la Diarrea Epidémica Porcina
<b>DICC</b>	Dosis infectivas en cultivo celular
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>E</b>	Proteína de la envoltura
<b>ECP</b>	Efecto citopático
<b>EHPV</b>	Virus de la Encefalomielitis Hemoaglutinante Porcina
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FcRn</b>	Receptor Fc neonatal por sus siglas en inglés
<b>FMVZ</b>	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
<b>FPC</b>	Fiebre Porcina Clásica
<b>FUT2</b>	Gen de la fucosiltransferasa 2
<b>g</b>	Gramo

<b>GETV</b>	Virus de la Gastroenteritis Transmisible
<b>Hr</b>	Hora
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano por sus siglas en inglés
<b>Hrs</b>	Horas
<b>IEC</b>	Células epiteliales intestinales por sus siglas en inglés
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgD</b>	Inmunoglobulina D
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ILC3</b>	Células linfoides innatas de tipo 3 por sus siglas en inglés
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>km</b>	Kilometro
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Proteína de la membrana
<b>MAdCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular 1
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimoles
<b>min</b>	Minutos
<b>N</b>	Proteína de la nucleocápside
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>NK</b>	Células asesinas naturales por sus siglas en inglés
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NPS</b>	Proteína no estructural por sus siglas en inglés
<b>° C</b>	Grados centígrados
<b>OMSA</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal

<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto por sus siglas en inglés
<b>ORF3</b>	Proteína accesoria
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos por sus siglas en inglés
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino por sus siglas en inglés
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés
<b>PDCoV</b>	Deltacoronavirus Porcino
<b>pg</b>	Picogramos
<b>pIgR</b>	Receptor de inmunoglobulina polimérica o componente secretor
<b>PRR</b>	Receptor de reconocimiento de patrones por sus siglas en inglés
<b>PRRS</b>	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
<b>PRRSV</b>	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino
<b>RBD</b>	Dominio de unión al receptor por sus siglas en inglés
<b>Rep</b>	Poliproteína replicativa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>rRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>S</b>	Proteína spike
<b>SADS-CoV</b>	Coronavirus del Síndrome de Diarrea Aguda Porcina
<b>SeACoV</b>	Alphacoronavirus Entérico Porcino
<b>SENASICA</b>	Servicio Nacional de Salud, Seguridad Alimentaria y Calidad de los Alimentos
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SICUAE</b>	Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales
<b>SIgA</b>	Inmunoglobulina A secretora
<b>SIgM</b>	Inmunoglobulina M secretora
<b>SP</b>	Muestra positiva por sus siglas en inglés
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCR</b>	Receptor de células T por sus siglas en inglés
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante por sus siglas en inglés

<b>Th1</b>	Linfocito T cooperador tipo 1
<b>Th2</b>	Linfocito T cooperador tipo 2
<b>TLR</b>	Receptor tipo toll por sus siglas en inglés
<b>TMB</b>	Tetrametilbencidina
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral por sus siglas en inglés
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma México
<b>UTR</b>	Región no traducida por sus siglas en inglés
<b>VCAM1</b>	Molécula de adhesión celular vascular 1



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Coronavirus

Los coronavirus han afectado durante mucho tiempo a diferentes especies animales, y los cerdos no son la excepción, siendo responsables de enfermedades respiratorias, entéricas y hepáticas. Los coronavirus pertenecen al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae* y se clasifica en los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*. Los *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* incluyen virus que infectan mamíferos, mientras que, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* hasta hace algún tiempo se consideraban que incluían virus de aves y cetáceos, sin embargo, la reciente aparición del Deltacoronavirus porcino, pone de manifiesto la capacidad de los coronavirus de infectar una gran variedad de especies y de la frecuencia de saltos inter-especie (Yang *et al.*, 2020; Khamassi *et al.*, 2021).

Actualmente se han identificado seis especies en tres de los géneros de coronavirus que afectan a los cerdos, dentro de los *Alphacoronavirus* se encuentran el Virus de la Gastroenteritis Transmisible (GETV), el Coronavirus Respiratorio Porcino (CRPV), el Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEPV) y recientemente el Coronavirus del Síndrome de Diarrea Aguda Porcina (SADS-CoV) o también llamado Alphacoronavirus Entérico Porcino (SeACoV); en el género *Betacoronavirus* se encuentra el Virus de la Encefalomiелitis Hemoaglutinante Porcina (EHPV) y en el género *Deltacoronavirus* se incluye al Deltacoronavirus Porcino (PDCoV) (Wang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020).

El primer coronavirus porcino reportado fue GETV en 1935, y se identificó en 1946 y por muchos años estuvo presentándose de forma esporádica hasta que se reportaron brotes epizooticos en gran parte de Europa, Asia y América. En México se detectó por primera vez en 1965 en el Laboratorio de Palo Alto a partir de muestras de cerdos provenientes de granjas en un brote en Michoacán, en años consecutivos se diagnosticó en gran parte del país. Con el tiempo se volvió altamente contagioso causando enfermedad entérica que afectaba principalmente

a lechones generando un impacto económico significativo (*Figura 1A*) (Morilla y Estrada 1981; Rodríguez *et al.*, 2005; Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

*Posteriormente* se reportó el primer *Betacoronavirus* EHPV, en brotes de encefalomiелitis en lechones en Ontario, Canadá en 1957, pero se aisló hasta 1962 a partir de cerebros de lechones con polioencefalomiелitis viral, degeneración neuronal y gliosis, por lo que es considerado el único coronavirus porcino neurotrópico. Se ha descrito solamente en algunos países de Europa, Asia y Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) y fue descrita como infección digestiva o nerviosa que afecta a cerdos de cualquier edad, siendo más grave en lechones a partir de los 4 días de edad (*Figura 1B*). Se transmite de forma directa por contacto nariz a nariz o indirecta por aerosoles, se replica en órganos respiratorios (mucosa nasal, tonsila y pulmones) y del sistema nervioso (ganglios y plexos), produce vómito y emaciación y/o encefalomiелitis. Actualmente los animales infectados permanecen con signología subclínica, esto debido a la circulación constante del virus en las granjas, lo que ha generado una buena protección por inmunidad lactogénica (Mora-Díaz *et al.*, 2019).

Ligado a los brotes de GETV, este virus sufrió una mutación (una delección en el gen de la proteína spike, de origen natural) dando origen a CRPV. Descrito por primera vez en Europa en 1980, sin embargo, se logró identificar en 1984 en Bélgica (*Figura 1C*). La mutación ocasionó que el CRPV cambiara de tropismo teniendo afinidad respiratoria, por tanto, se replica en órganos respiratorios (mucosa nasal, tráquea y pulmones) siendo los neumocitos de tipo 2 las principales células blanco. En los animales se observa disnea (dificultad respiratoria), tos, estornudos, fiebre, estreñimiento, vómito, anorexia, emaciación, falta de coordinación, pero la mayor parte de las infecciones son subclínicas por lo que genera poco impacto económico en las producciones porcinas, aunque se puede agravar si se presentan otros virus como el del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) o bacterias (Khamassi *et al.*, 2021; Turlewicz-Podbielska; Pomorska-Mól, 2021).

Recientemente se presentaron DECoV, PDCoV y SADS-CoV que son considerados emergentes, al igual que GETV son entéricos con signología indistinguible. DECoV se descubrió por primera vez en 1971 en Inglaterra, se extendió por gran parte de Europa, Asia y América generando grandes pérdidas productivas y económicas (*Figura 1D*). PDCoV se reportó en 2009 en Hong Kong y fue identificado en 2014 en Estados Unidos, en México se reportó en 2017. A diferencia de DECoV o GETV se describe con menor mortalidad en lechones. Hasta la fecha ha sido reportado en Canadá, Corea, China, Tailandia y México (*Figura 1E*). Y el más recientemente clasificado como coronavirus es SADS-CoV, reportado en 2016 con brotes de infección entérica en lechones generando alta mortalidad en la provincia de Guangdong, China; en 2018 presentó un brote en Fujian, hasta el momento no se ha informado en otras provincias de China u otras partes del mundo (*Figura 1F*). Mediante análisis filogenéticos se ha demostrado que su origen es de murciélagos debido a la evolución genética del virus con otros miembros de la misma familia (Pérez-Rivera *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

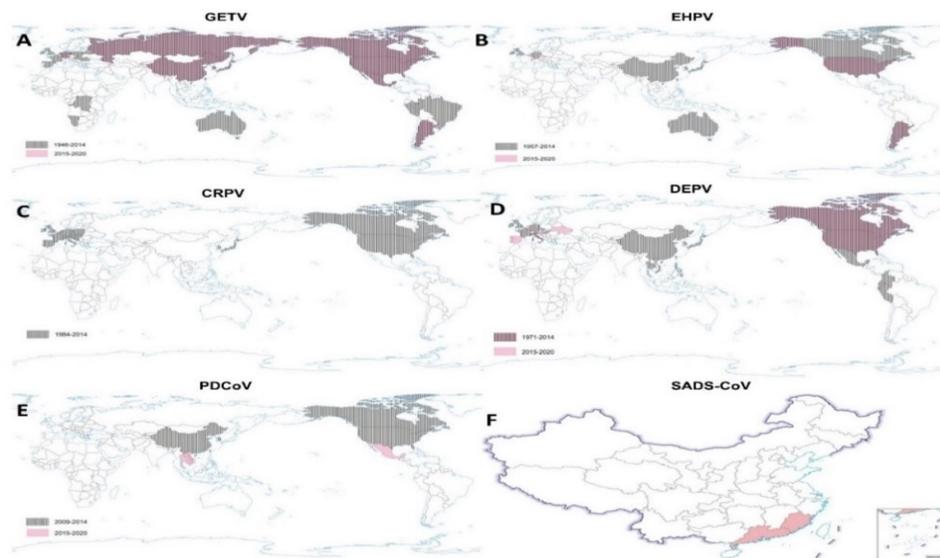


Figura 1. Mapa de distribución mundial de los coronavirus porcinos. A) GETV. B) EHPV. C) CRPV. D) DECoV. E) PDCoV. F) SADS-CoV (Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

## **1.2. Diarrea epidémica porcina**

### **1.2.1. Antecedentes e impacto**

En este proyecto nos enfocaremos solamente en el virus de Diarrea Epidémica Porcina. Es un virus que se sugiere tiene su origen en murciélagos y que se introdujo en la población porcina ocasionando una infección entérica con gran impacto económico (Poudel *et al.*, 2020). DEPV fue reportado por primera vez en Inglaterra en 1971 como enfermedad entérica grave y altamente contagiosa con manifestación durante el invierno, generando alta mortalidad en lechones. El agente etiológico se identificó hasta 1978 en Bélgica, clasificándolo dentro de la familia *Coronaviridae*. La enfermedad se propagó por varios países de Europa como Italia, Bélgica, Francia, Hungría y República Checa con brotes esporádicos, sin embargo, se presentaron brotes emergentes de 2014 a 2016 en Alemania, Bélgica, Ucrania, Francia, Italia y Austria (Khamassi *et al.*, 2021; Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

En Asia se detectó por primera vez en Japón en 1982, extendiéndose a varios países vecinos, incluidos Corea, China, Tailandia, Taiwán y Vietnam. Pero con la aparición de nuevas cepas, DEPV se volvió altamente virulento por lo que causó brotes masivos en lechones lactantes en 2010, caracterizados por presentar una tasa de morbilidad entre 80% y el 100%, y una tasa de mortalidad del 50% al 90% en lechones lactantes, convirtiéndose en el segundo patógeno de cerdos más importante en china, solo después del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (Wang *et al.*, 2019; Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

La enfermedad llegó a Estados Unidos desde Asia y se reportó por primera vez en abril del 2013 y se diseminó rápidamente por todo el país, luego de su primer brote de 2013-2014 culminó con pérdidas importantes en la industria, causando la muerte de más de 7 millones de lechones y una pérdida de \$900 millones a \$1.8 billones de dólares para los productores porcinos estadounidenses. Desde su introducción a los Estados Unidos se extendió a México, Canadá, Caribe, América Central y Sudamérica (Langel *et al.*, 2016; Bjustrom *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018).

El primer caso en México se presentó en julio del 2013 en la región de Degollado, Jalisco y La Piedad, Michoacán (*Figura 2*). Entre agosto 2013 y mayo 2014 se analizaron muestras por RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) con el 30% de positividad. En mayo de 2014 la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) la reconoció oficialmente en México y también se realizó el reporte oficial por parte del Servicio Nacional de Salud, Seguridad Alimentaria y Calidad de los Alimentos (SENASICA) en los Estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California, Colima, Distrito Federal, Guerrero, Puebla, Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa y Sonora. Desde entonces, se han reportado grandes pérdidas económicas y tasas de mortalidad del 100% en los primeros brotes, hoy en día los rebrotes reportan disminución en las tasas de mortalidad a un 75% en lechones recién nacidos. La Diarrea epidémica Porcina (DEP) es considerada en México como enfermedad endémica del grupo 3 y de distribución mundial (Bolaños *et al.*, 2016; Lara-Romero *et al.*, 2018).

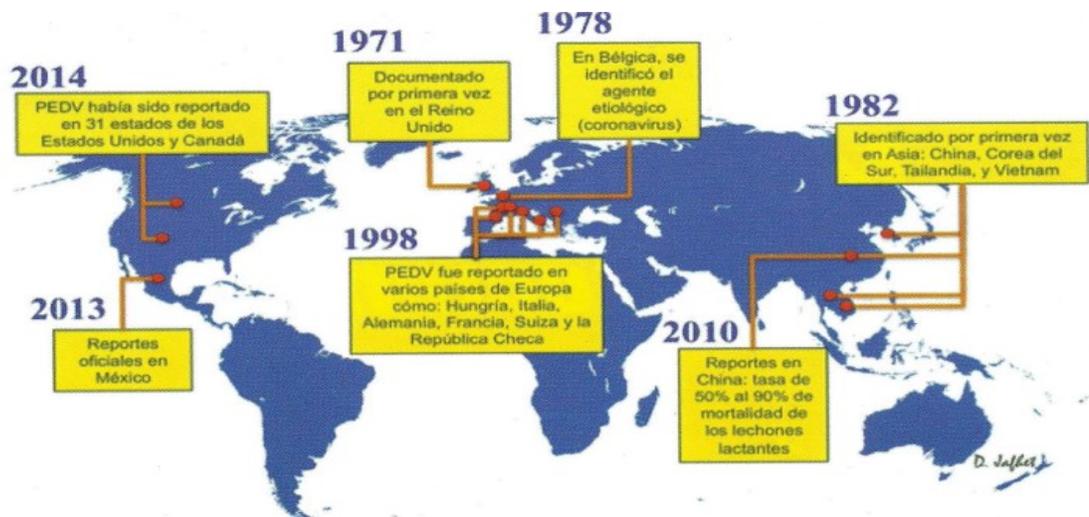


Figura 2. Mapa del tiempo y diseminación del PEDV en el mundo (Bolaños *et al.*, 2016).

### 1.2.2. Estructura

El DEPV es pleomórfico, con un diámetro de 95-190 nm y proyecciones en forma de espiga (picos) envueltos con una bicapa lipídica, su genoma es de ARN monocatenario de sentido positivo de 28 a 31 kilobases (kb) (excluyendo la cola poli A). Su estructura está conformada por una región no traducida (UTR) y siete marcos de lectura abiertos (ORF): ORF1, proteína spike (S), proteína accesoria (ORF3), proteína de la envoltura (E), proteína de la membrana (M) y proteína de la nucleocápside (N) (Figura 3) (Jung *et al.*, 2020).

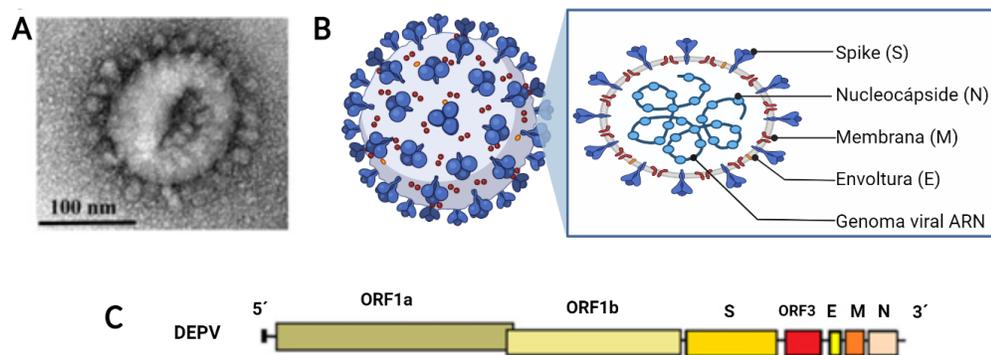


Figura 3. Esquema del DEPV. A) Micrografía electrónica de un virión. (B) Diagrama esquemático de la estructura del virión. (C) Mapa genómico DEPV (Yang *et al.*, 2020; Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

El ORF1 se encuentra en la región 5' y ocupa dos tercios del genoma, está dividido en ORF1a y ORF1b, codifica para una poliproteína replicativa (Rep), que genera proteínas no estructurales (NSP), las cuales se relacionan con el procesamiento proteolítico, replicación y transcripción del genoma viral (Lara-Romero *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

La proteína S o “Spike” (espícula) es codificada por el ORF2, es una proteína de superficie en formas de picos con 18 nm de longitud aproximadamente, por la cual recibe la denominación de coronavirus, y sirve fundamentalmente para la unión y entrada a la célula blanco. Así mismo esta estructura induce respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes, al contener epítomos neutralizantes: tres de ellos están

ubicados en el dominio S1 (residuos COE 499-638, residuos SS2 748-755 y residuos SS6 764-771), y el cuarto está en el S2 (residuos 2C10 1368-1374) (Pérez-Rivera *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020). La proteína N, la más abundante y altamente conservada, es la encargada de envolver el material genómico viral. Las proteínas M y E son componentes principales para envolver la partícula vírica y necesarias en el proceso de ensamblaje viral (Pérez-Rivera *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

### **1.2.3. Epidemiología**

La transmisión del DEPV puede darse de manera directa por vía fecal-oral por medio de la ingesta de heces o vómito infectado, o indirecta por fómites como ropa, calzado, alimento, contenedores y vehículos de transporte contaminados con vómito o heces que promueven su propagación (*Figura 4*). Sin embargo, también se ha reportado la transmisión de manera indirecta por medio de aerosoles que contienen partículas virales con capacidad infectiva, la gran importancia radica en que este virus puede diseminarse hasta 16 km alrededor de las granjas de acuerdo con algunos estudios que han identificado el movimiento de partículas virales o material genético (Hernández, 2016; Jung *et al.*, 2020). Por otra parte, estudios sugieren una transmisión a través de la leche de la cerda de manera vertical al identificarse genoma viral por medio de RT-PCR en leche de cerdas lactantes afectadas por el DEPV sin tratamiento (Jung y Saif, 2015).

Una vez que el DEPV entra al animal, se dirige a su célula diana para infectarla y replicarse en ella. Su ingreso a la célula lo realiza por medio de la proteína S, esta proteína se divide en dos subunidades S1 y S2, la subunidad S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD) este ligando se unirá al receptor celular, en este caso es la aminopeptidasa N porcina (APNp) expresada por los enterocitos vellosos del intestino delgado, sin embargo no es su principal receptor, de acuerdo con otros estudios moléculas de superficie en los enterocitos secretorios como ácido siálico podrían estar participando en la unión. Una vez que S1 se une a su receptor, S2 desencadena la fusión de la envoltura viral y la membrana de la célula blanco para permitir la infección de la célula (Wang *et al.*, 2019; Jung *et al.*, 2020).

La replicación del DEPV ocurre en el citoplasma de las células epiteliales en las vellosidades a lo largo del intestino delgado, ocasionando una degeneración de los enterocitos que con lleva a la atrofia de las vellosidades (Poonsuk *et al.*, 2016). La aparición de los signos clínicos es de 1 a 3 días después de la infección y como consecuencia de la malabsorción debida a la pérdida masiva de enterocitos absorbentes, se produce diarrea acuosa, vómitos, anorexia, deshidratación, emaciación y muerte, por lo general no duran más de 10 días (*Figura 4*). Afecta a cerdos de cualquier edad, pero generalmente es más grave y letal en lechones recién nacidos, debido a su susceptibilidad asociada a un sistema inmunológico que no está completamente maduro o adaptado y a una tasa de regeneración de enterocitos menor o más lenta que en cerdos adultos (Wang *et al.*, 2019; Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

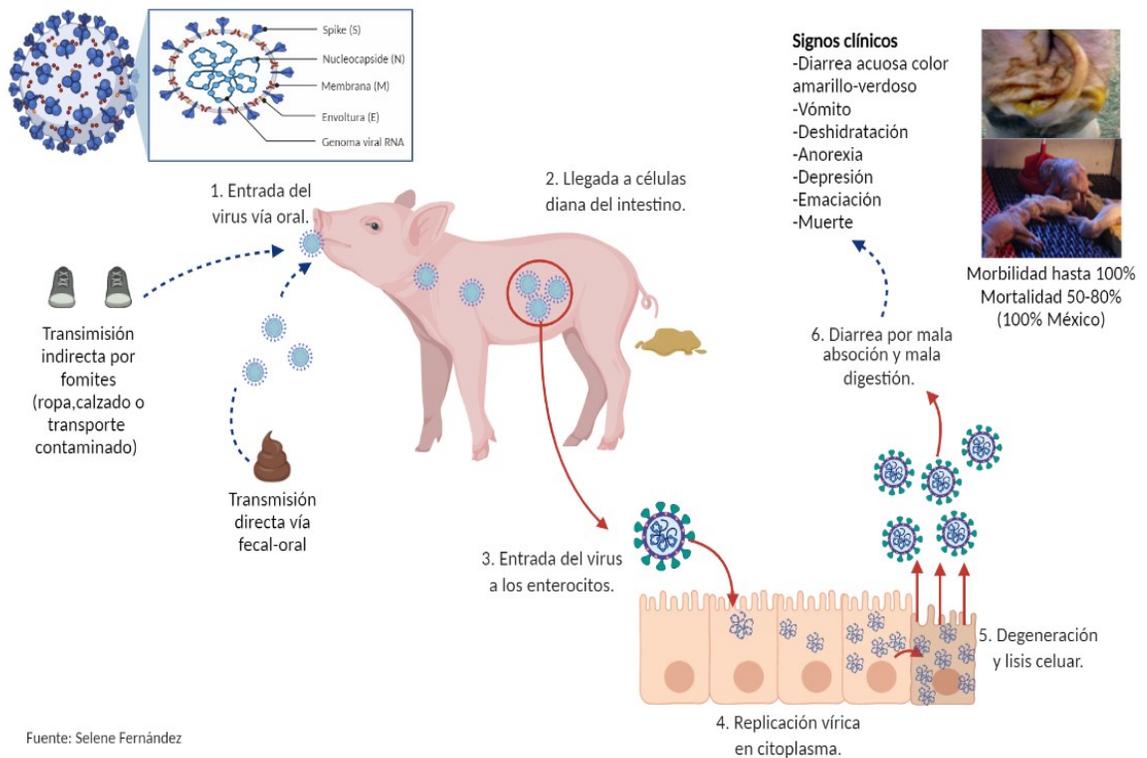


Figura 4. Representación esquemática de la transmisión y patogenia del DEPV.

La infección por el DEPV presenta tasas de morbilidad y mortalidad de hasta el 100% en lechones recién nacidos y mortalidad de 1-3% en cerdos más grandes (Wang *et al.*, 2019; Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021). Genera un impacto en el rendimiento reproductivo en cerdas jóvenes y cerdas gestantes con la disminución en el porcentaje de fertilidad del 12.6%, aumento en el porcentaje de abortos del 1.3% y momificaciones del 2.0% (Poonsuk *et al.*, 2016).

Se pueden observar lesiones macroscópicas como el estómago distendido lleno de leche cuajada, intestino con contenido acuoso amarillento, las paredes de la mucosa intestinal adelgazadas (aspecto transparente), linfomegalia mesentérica (agrandamiento de los linfonodos mesentéricos). Microscópicamente, se observa vacuolización citoplasmática y exfoliación de enterocitos del intestino delgado con acortamiento de vellosidades superficiales, atrofia de las vellosidades reducidas o ausentes (Duarte y Laude, 1994; Lv *et al.*, 2016).

#### **1.2.4. Prevención y control**

##### **1.2.4.1. Bioseguridad**

Actualmente no existe tratamiento para la DEP, así como para otras enfermedades virales de los cerdos, por lo que implementar un protocolo de bioseguridad eficaz es la mejor manera de evitar el ingreso de la infección a las explotaciones (Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021).

Es importante que, para que este protocolo sea eficaz se incluya un manejo adecuado de las instalaciones y de los animales para garantizar su bienestar, la práctica de “todo dentro, todo fuera” para romper el ciclo de transmisión dentro de la granja, además de programas de limpieza y desinfección con lavados de alta presión y con el uso de detergentes en instalaciones, herramientas utilizadas por los trabajadores y transportes de animales, así como de alimento donde se garantice la remoción de excretas y evitando residuos. Asimismo, es necesario contar con un programa de control de fauna silvestre o de cuarentena que disminuya el riesgo propagación de patógenos entre granjas (OIE, 2014; Bolaños *et al.*, 2016).

#### 1.2.4.2. Feedback

En inicios de brote de esta enfermedad y ante la ausencia de vacunas disponibles, se utilizó el método Feedback (retroalimentación) para controlar la infección (Jung *et al.*, 2020). Este método consta del suministro de material intestinal de lechones lactantes infectados con el DEPV (*Figura 5*), a hembras gestantes por la vía oral (Piñeros y Mogollón, 2015; Langel *et al.*, 2016).



Figura 5. Elaboración del Feedback con material intestinal proveniente de un lechón infectado con el DEPV (Foto por Rolando Beltrán).

Esta estrategia tiene como objetivo que las cerdas desarrollen la enfermedad en una etapa y nivel en que la salud general no se vea comprometida, para estimular inmunidad lactogénica, es decir, que será transferida a sus lechones por medio del calostro y la leche (Hill *et al.*, 2014; Clement *et al.*, 2016; Langel *et al.*, 2016,).

Estudios revelan que su éxito es relativo en los casos que optaron por este protocolo de exposición, ya que la incidencia de la enfermedad clínica disminuyó dramáticamente, pero los resultados no fueron 100% efectivos. Al no contar con un protocolo establecido el feedback puede fallar por razones como: cuando la dosis del virus es demasiado baja, el virus no es infeccioso debido a condiciones inadecuadas de la muestra o almacenamiento, si los cerdos presentan inmunidad preexistente se bloquea la replicación viral en el intestino (Langel *et al.*, 2016).

Además, se requiere conocer el estatus sanitario de las cerdas para identificar la posibilidad o riesgo de transmisión de otros patógenos dentro de la piara, y la posible propagación del DEPV a granjas no infectadas. Es importante previamente

tener un diagnóstico por pruebas de laboratorio positivas al DEPV, para tener precaución con el suministro de macerados (vísceras, pulmón, linfonodos, bazo) de lechones que presenten PRRS, enfermedad de Aujeszky o fiebre porcina clásica (FPC), debido al alto riesgo que esto representa para la salud de los cerdos. Este tipo de tratamiento no cuantifica la cantidad de virus administrado ya que en la mayoría de los casos en los que se emplea el feedback, no se realiza ningún tipo de titulación o cuantificación viral (Piñeros y Mogollón, 2015; Clement *et al.*, 2016).

#### **1.2.4.3. Vacunas**

A consecuencia de los brotes de DEP, países como China, Japón, Corea y los Estados Unidos han desarrollado vacunas atenuadas o inactivadas utilizando diferentes tecnologías que van dirigidas a las cerdas gestantes. Sin embargo, la eficacia genera dudas al ser muy variable para controlar los brotes, la falla puede atribuirse a diversos factores, principalmente a el sitio de infección y los sistemas y aparatos afectados en el cerdo, que a su vez dictan la naturaleza de la vacuna y la vía de administración. Ya que la mayoría utilizan la vía intramuscular para su administración, y la vía parenteral no desencadena una fuerte inmunidad local para inducir inmunoglobulina A (IgA) de la mucosa (Wang *et al.*, 2019; Alluwaimi *et al.*, 2020).

En México se comercializan dos vacunas, la primera por laboratorios MSD (Reg. SAGARPA B-0273-284) la cual es una vacuna recombinante de ARN. Se administra 1 dosis de 1ml vía intramuscular (IM) en cerdas primerizas o multíparas entre los 14 y 7 días previos al parto. Sin embargo, en zonas endémicas y cuando sea necesario puede realizarse la aplicación de una segunda dosis con un intervalo de por lo menos 3 semanas (*Figura 6A*) (MSD, 2022).

La segunda vacuna es fabricada por los laboratorios Zoetis, Inc (Florham Park, Nueva Jersey, Informe de estudio nº B826R-US-13-258, Zoetis Inc.), es una vacuna de DEPV inactivada. Indicada para cerdas gestantes aplicando 2 dosis de 2ml cada una, administradas por vía IM, la primera dosis administrada 5 semanas antes del

parto y la segunda dosis debe administrarse 2 semanas antes del parto (Figura 6B) (Zoetis, 2016).



Figura 6. Vacunas contra el DEPV. (A) vacuna comercializada por MSD® (MSD, 2022). (B) vacuna comercializada por Zoetis® (Zoetis, 2016).

#### 1.2.4.4. Inóculo

Actualmente hay varios estudios que han experimentado otro tipo de profilaxis, esto debido a la frecuente ineficacia o falta de seguridad de la retroalimentación, por lo que está siendo reemplazada por inmunización oral con DEPV activo, la cual consiste en someter a los individuos afectados a un inóculo por vía oral obtenido a partir del aislamiento del DEPV. El aislamiento viral se obtiene de órganos tales como intestino, pulmón, estómago de lechones afectados por el DEPV, propagado en cultivo de células Vero, este cultivo se titula, se diluye y se administra vía oral a los animales con diferentes vehículos (Poonsuk *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2016; Joshi *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos mediante este tipo de profilaxis han determinado que las cerdas y los lechones después de su inoculación, produjeron una respuesta de IgG, IgA y su capacidad neutralizante específica contra el DEPV en aquellas cerdas que recibieron el tratamiento y en lechones nacidos de las cerdas inmunizadas. En el caso de los lechones nacidos de cerdas inmunizadas mostraron una mejor termorregulación, mayores tasas de crecimiento, una menor morbilidad y mortalidad en comparación con los grupos control. Lo que demuestra protección al lechón a través de la transferencia de anticuerpos por medio del calostro y la leche (Poonsuk *et al.*, 2016; Joshi *et al.*, 2018).

### 1.3. Inmunidad innata

Las barreras físicas en un individuo son esenciales para excluir a los patógenos invasores, sin embargo, los patógenos pueden contar con estrategias para evadir las barreras físicas o estas no ser tan efectivas que logran atravesarlas (Tizard, 2018). Para ello, la inmunidad innata es la primera línea de defensa cuya misión es prevenir el establecimiento y propagación de agentes patógenos mediante varios mecanismos de acción inmediata (Tizard, 2018; Langel *et al.*, 2020).

La respuesta inmunológica que se desencadena es general (no específica) y se activa cuando el patógeno logra pasar las barreras epiteliales. A través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) se detectan moléculas que expresan los patógenos conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daño (DAMP) que son moléculas que liberan las células dañadas, provocando una respuesta celular rápida y producción de diversas proteínas (*Figura 7*) (Tizard, 2018).

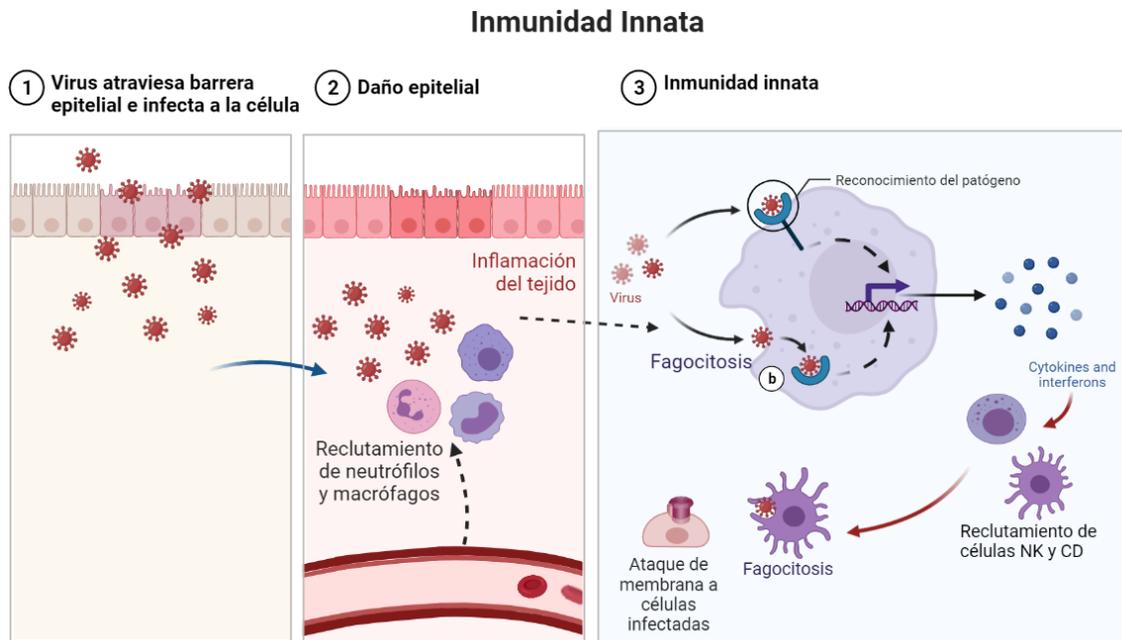


Figura 7. Esquema de la respuesta inmune innata en infecciones virales.

En caso del DEPV, tras la infección viral las células pueden utilizar PRR como receptores tipo toll (TLR) y receptores similares al gen 1 inducible por ácido retinoico [(RIG-I) (RLR)], presentes en las células presentadoras de antígenos (CPA) para reconocer las glicoproteínas y ARN virales, este reconocimiento inicia con la producción y propagación de células y componentes antivirales solubles como citocinas proinflamatorias y quimiocinas, principalmente interferón (IFN) de tipo I y III. La inducción de IFN es importante por sus efectos antivirales en las células epiteliales de la mucosa para eliminar a los virus, al reclutar células asesinas naturales (NK), células dendríticas (CD) y macrófagos en el sitio de la infección. Las células NK son responsables de la muerte citotóxica de células infectadas y son una fuente importante de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y, otras citocinas y quimiocinas. Por su parte, los macrófagos son las primeras células inmunes en localizar al DEPV; y junto con las CD además de fagocitar, juegan un papel esencial en la presentación de antígenos a linfocitos T y B para preparar una respuesta inmune adaptativa (Du *et al.*, 2019; Koonpaew *et al.*, 2019; Langel *et al.*, 2020).

#### **1.4. Inmunidad adaptativa**

Posterior a una respuesta inmune innata el organismo busca defenderse de manera definitiva y específica, para ello se genera una respuesta inmune adaptativa la cual se basa en reconocer y destruir específicamente a los patógenos; sobre todo genera memoria para que en caso de una reinfección esta respuesta sea más rápida y eficiente (Tizard, 2018).

Este tipo de inmunidad comienza cuando las CPA (principalmente las CD) captan el antígeno de las células epiteliales intestinales o de las células epiteliales intestinales apoptóticas durante la infección; y migran a los linfonodos para interactuar con los linfocitos y desencadenar una respuesta humoral y celular (*Figura 8*) (Fraile, 2018; Langel *et al.*, 2020).

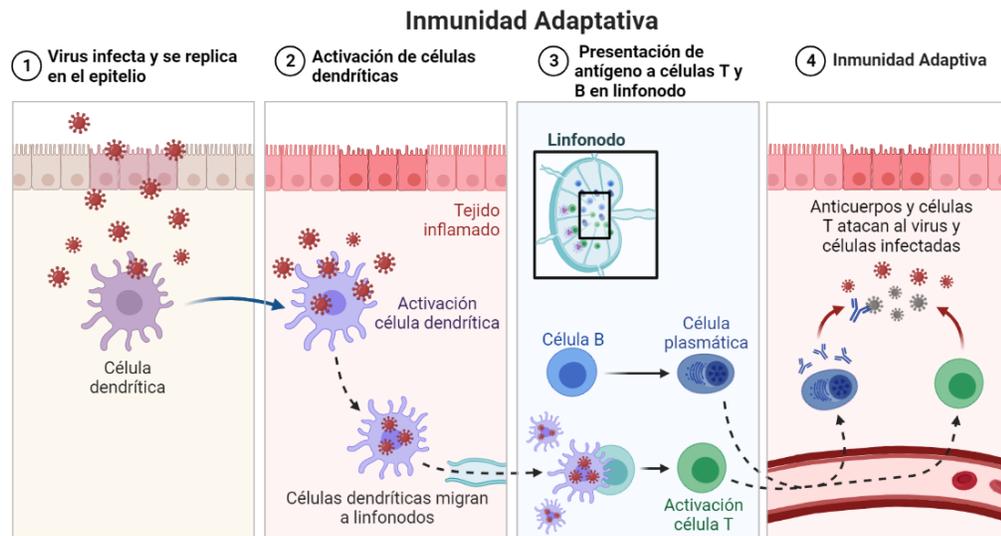


Figura 8. Esquema de la respuesta inmune adaptativa en infecciones virales.

#### 1.4.1. Humoral

La inmunidad humoral se caracteriza por la participación de los linfocitos B que maduran a células plasmáticas, las cuales producen anticuerpos que actúan contra patógenos extracelulares. Inicia cuando las CPA presentan el antígeno a los linfocitos B, estos capturan el antígeno por medio de su receptor de célula B (BCR) formando el complejo antígeno/anticuerpo que se internaliza en la célula donde se procesa por medio de proteólisis generando péptidos. Los antígenos peptídicos son llevados a la superficie de los linfocitos B unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, lo presentan a los linfocitos T cooperadores (CD4) para que liberen citocinas que activan al linfocito B o también por sí solo el linfocito B puede activarse (*Figura 9*). Una vez activo el linfocito B comienza su división y maduración a célula plasmática para generar clonas que reconocen el antígeno, que posteriormente serán secretados a los fluidos corporales (sangre, linfa, etc.), donde reciben el nombre de inmunoglobulinas o anticuerpos (Fraile, 2018; Tizard, 2018).

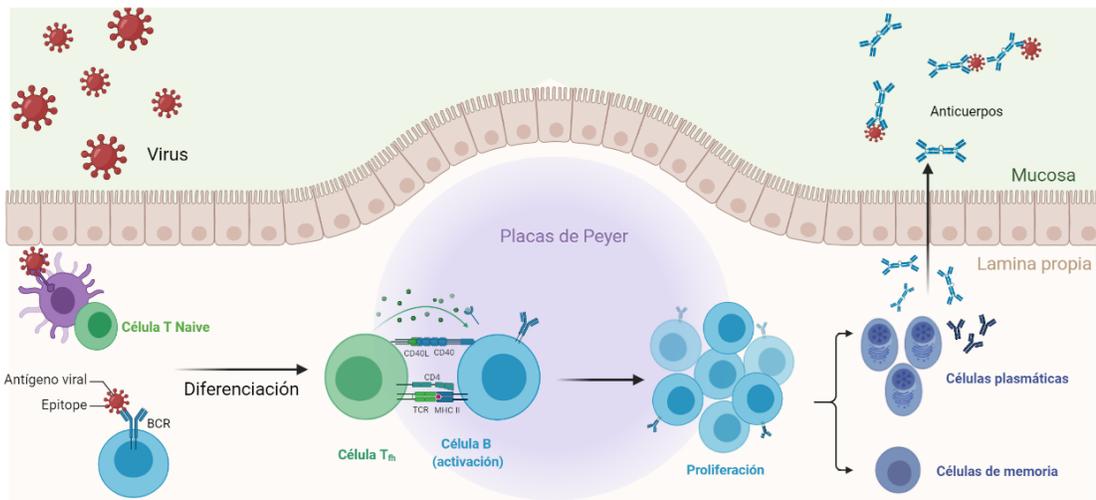


Figura 9. Esquema de la respuesta inmune humoral en infecciones virales.

#### 1.4.1.1. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas o también llamados anticuerpos son producidos por las células plasmáticas y son receptores de unión al antígeno que se encuentran en los fluidos biológicos en los todos los mamíferos.

Son glicoproteínas constituidas por cuatro cadenas: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, unidas por puentes disulfuro dándole la forma de “Y”. Su estructura se divide en dos regiones: la región FC (la base de “Y”) conformada por dos cadenas pesadas, es el sitio de anclaje al linfocito B; y la región Fab (los brazos de “Y”) conformada por las dos cadenas ligeras unidas a las dos cadenas pesadas, corresponde a la zona de unión al antígeno (*Figura 10*).

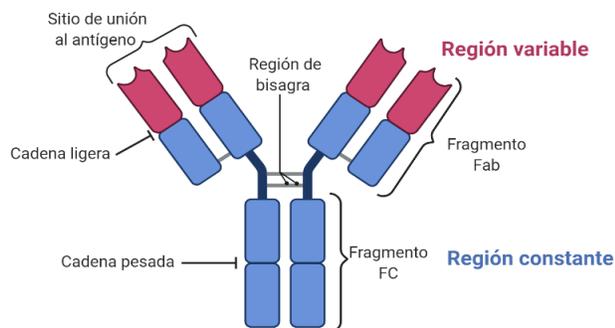


Figura 10. Representación esquemática de una inmunoglobulina.

Se han descrito cinco clases (isotipos) de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. La IgG es la más abundante en el suero, seguida de la IgM y la IgA, aunque está en su forma dimérica predomina en secreciones (leche, saliva, etc.), por último, IgE presenta la concentración más baja y se asocia a reacciones de hipersensibilidad. La IgD localizada en la superficie de linfocitos inmaduros y no se ha descrito en cerdos (*Figura 11*) (Tizard, 2018).

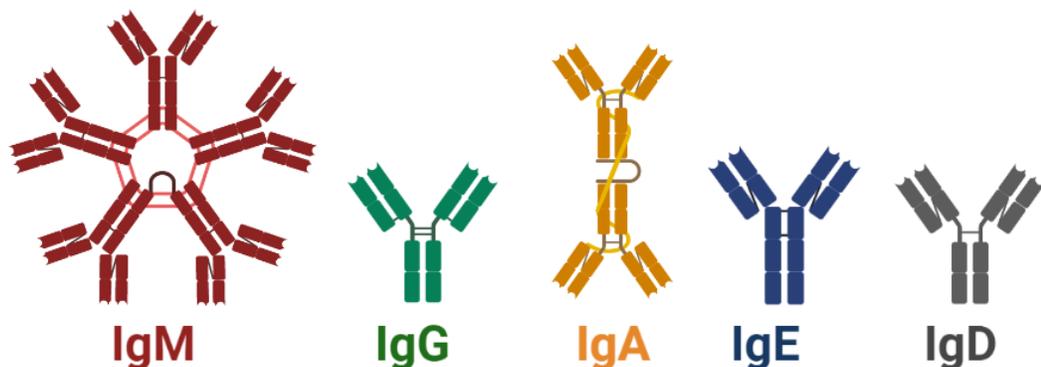


Figura 11. Representación esquemática de los diferentes tipos de inmunoglobulinas.

La función de las inmunoglobulinas es unirse a los patógenos que portan el antígeno marcándolos para su destrucción por medio de complemento, fagocitosis, citotoxicidad, o neutralizándolos al unirse a sus ligandos bloqueando la unión del patógeno a la célula diana (Fraile, 2018).

#### 1.4.1.1.1. IgG

Las inmunoglobulinas IgG son sintetizadas por células plasmáticas en bazo, linfonodos y médula ósea. Presenta una estructura típica y es la más pequeña de las inmunoglobulinas. Se encuentra en mayor concentración en sangre y además su tamaño le permite atravesar fácilmente vasos sanguíneos por lo que es considerada la principal para defensa mediada por anticuerpos, su unión al antígeno puede producir aglutinación y opsonización y activa el complemento por la vía clásica (Tizard, 2018).

#### 1.4.1.1.2. IgA

La IgA igualmente es sintetizada por células plasmáticas localizadas bajo las superficies corporales y secretada en secreciones como saliva, líquido intestinal, leche, calostro y orina, que protegen a las superficies corporales.

Se sintetiza como monómero de IgA, pero se secreta como dímero al unirse dos moléculas de IgA con la cadena J. Los dímeros de IgA se unen al receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) o componente secretor para formar una IgA secretora (SIgA) (Figura 12), con ello logra pasar a través de las células epiteliales hacia secreciones externas protegiéndola de la digestión de las proteasas intestinales. Su importancia es principalmente la protección que brinda al neutralizar virus, impidiendo su adhesión a las superficies corporales y así evitando la infección viral a las células (Tizard, 2018).

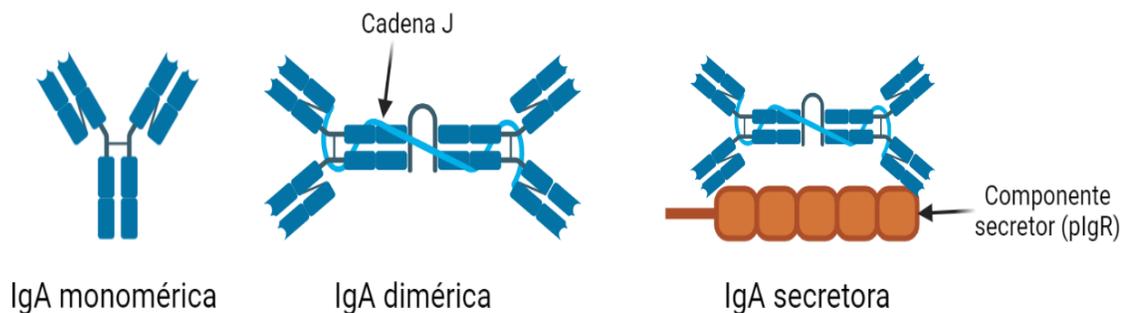


Figura 12. Representación esquemática de la inmunoglobulina IgA e SIgA.

Modificado de Tizard, 2018.

#### 1.4.1.1.3. Anticuerpos neutralizantes

Los anticuerpos neutralizantes son aquellas inmunoglobulinas capaces de inhibir la infección viral. Lo logran mediante la unión de su fragmento de dominio de unión al antígeno (Fab) con el ligando del patógeno específico, en el caso del DEPV es la glicoproteína S, evitando que esta glicoproteína se una a la célula diana, por consiguiente, bloqueando la internalización e infección viral (Gong *et al.*, 2018).

Los anticuerpos neutralizantes se detectan por primera vez entre los días 7 a 14 días con un punto máximo a los 21 días y pueden persistir durante 6 meses posteriores a la infección, tiempo en el que se pueden realizar pruebas serológicas para conocer el estatus de la piara ya que estos van a tener la función de inhibir al virus bloqueando su capacidad de infectar (Clement *et al.*, 2016).

### 1.4.2. Celular

A diferencia de la inmunidad humoral, los linfocitos T son las células involucradas en la inmunidad celular y son de mucha importancia para el control de las infecciones. Posterior al procesamiento del antígeno, este va a ser presentado a través del CMH y el linfocito T se activa al reconocer el antígeno por medio de su receptor de célula T (TCR). Existen dos tipos de linfocitos T: los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos T cooperadores (*Figura 13*).

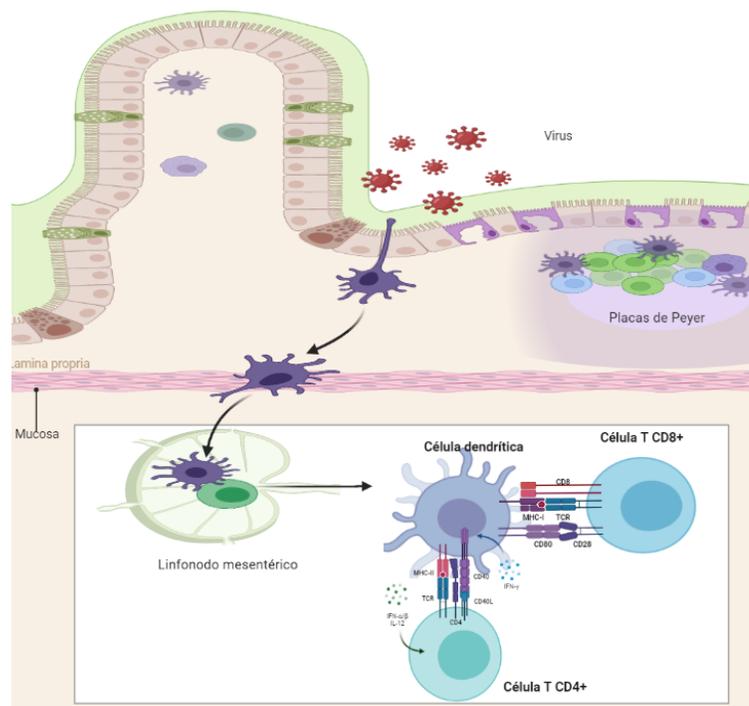


Figura 13. Esquema de la respuesta inmune celular en infecciones virales. Elaborado en el programa BioRender con base a lo descrito por Fraile, 2018.

Los linfocitos T citotóxicos reconocen y destruyen células infectadas evitando la diseminación del patógeno. Contienen una proteína llamada CD8, en su membrana y para activarse reconocen antígenos unidos al CMH clase I, generando la liberación de citocinas que forman poros en las membranas de las células infectadas, provocando muerte por apoptosis (Fraile, 2018).

Los linfocitos T cooperadores por su parte, no destruye a las células infectadas, pero ayudan a determinar el tipo de respuesta. La proteína marcadora que contienen es la CD4 y los linfocitos cooperadores se activa cuando su TCR reconoce CMH clase II, cuando esto sucede se liberan citocinas que se dirigen a otros tipos de células para controlar la respuesta celular. Dentro de los linfocitos cooperadores hay diferentes subtipos los principales linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) y T cooperadores tipo 2 (Th2). Los Th1 responden a antígenos presentados por células dendríticas y células B, su estimulación libera interleucina 2 (IL-2) e  $INF\gamma$  para reforzar la actividad de los macrófagos y linfocitos citotóxicos, importante para combatir patógenos intracelulares. Los linfocitos Th2 responden a antígenos de células dendríticas y macrófagos, una vez activados secretan interleucinas para expresar moléculas de superficie en células T y estimular la activación de células B, aumentando así la producción de anticuerpos, este tipo de respuesta es mayormente favorable cuando se trata de patógenos extracelulares (Fraile, 2018). El tipo de respuesta que se induce va a depender del patrón de citocinas que se secreten (Trinchieri, 2003).

#### **1.4.2.1. Citocinas**

Las citocinas son proteínas producidas por células del sistema inmune, su función es modular la respuesta a través de estimular otras células para su diferenciación, producción de otras proteínas o por el contrario su inhibición (Tizard, 2018); se producen durante una respuesta inflamatoria innata para generar una respuesta adaptativa. Están divididas en 5 grupos (*Cuadro 1*).

Cuadro 1. Clasificación de citocinas de acuerdo con su efecto biológico (Trinchieri, 2003).

<b>Grupo</b>	<b>Efecto</b>	<b>Citocinas</b>
Grupo 1: Citocinas proinflamatorias	Involucradas en el inicio e intensidad de la respuesta inflamatoria.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-1, IL-6, IL-8</li> <li>• Factor de necrosis tumoral (TNF) -<math>\alpha</math></li> </ul>
Grupo 2: Citocinas T-auxiliares 1	Generan una respuesta proinflamatoria y actúan en enfermedades autoinmunes y contra patógenos intracelulares.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-2 e IL-12</li> <li>• IFN-<math>\gamma</math></li> </ul>
Grupo 3: Citocinas T-auxiliares 2	Contrarrestan efectos de citocinas Th1.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-4, IL-5 e IL-13</li> </ul>
Grupo 4: Citocinas T-auxiliares 17	Participan en procesos proinflamatorios y defensa contra patógenos extracelulares.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-17 e IL-23</li> </ul>
Grupo 5: Citocinas reguladoras	Inhiben las respuestas inmunitarias.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-10</li> <li>• Factor de crecimiento transformante (TGF) -<math>\beta</math></li> </ul>

#### **1.4.2.1.1. IL-12**

La familia de la interleucina-12 (IL-12) está conformada por IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35. Es considerada la única familia de citocinas heterodiméricas que les confiere varias características estructurales, funcionales e inmunológica únicas y distintivas, como controlar la retroalimentación positiva y negativa. Son importantes reguladoras del sistema inmunológico contra enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes y cáncer (Vignali y Kuchroo, 2012; Behzadi *et al.*, 2016).

La IL-12 es una de las citocinas más importantes en la regulación de la respuesta inmune, es una citocina proinflamatoria producida por células dendríticas, macrófagos, monocitos y neutrófilos (Vignali y Kuchroo, 2012). Su secreción conduce a la producción de IFN- $\gamma$  tanto por las células T como por células NK, regulando la reacción inmunológica al activar a los fagocitos (Behzadi *et al.*, 2016). La IL-12 además aumenta la proliferación de las células NK, células T citotóxicas CD8+, y potenciando su citotoxicidad mediante la expresión de mediadores citotóxicos y producción de citocinas de manera directa o por efecto de IFN- $\gamma$ . Promueve la inmunidad celular al inducir que las células Th vírgenes puedan diferenciarse a células Th1 y células B (Trinchieri, 2003).

Por lo tanto, la IL-12 resulta fundamental en la respuesta mediada por células contra patógenos intracelulares, sobre todo en la inducción de linfocitos Th1 al desencadenar una actividad antiviral secretando IFN- $\gamma$  y regulando a la baja la expresión de IL-12 (Figura 14) (Barranco *et al.*, 2012). En el caso de la DEP, se ha reportado que los niveles séricos de IL-12 se inducen notablemente en lechones infectados con el DEPV cuando es inoculado por la vía oral (Langel *et al.*, 2020).

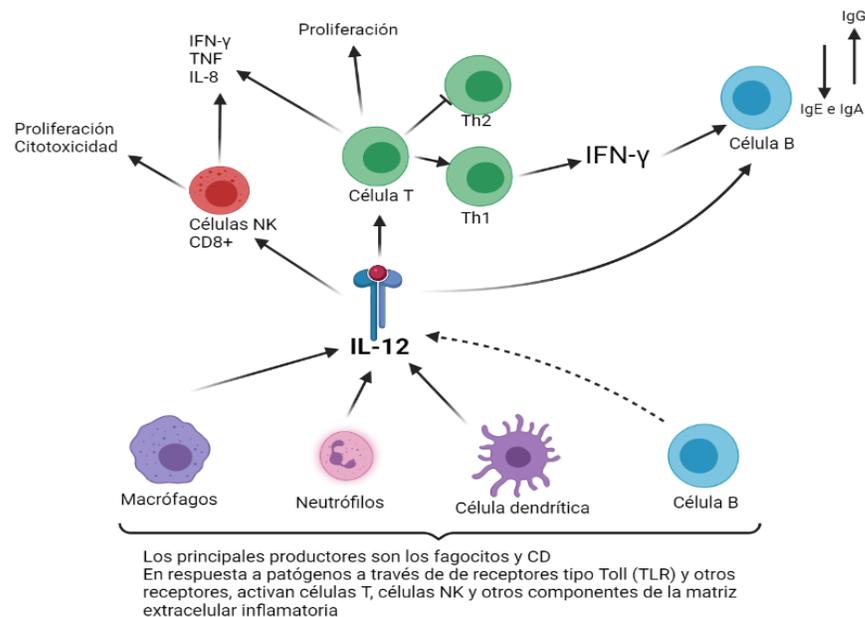


Figura 14. Participación de la IL-12 en la respuesta inmune. Modificado de Trinchieri, 2003.

#### 1.4.2.1.2. IL-22

La interleucina-22 (IL-22) es un miembro de la familia de citocinas IL-10, dentro de las cuales también se encuentran IL-19, -20, -24 y -26 e IFN $\lambda$  (Keir *et al.*, 2020). Es producida principalmente por linfocitos Th1, Th17, Th22, linfocitos T CD8, células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3), células NK, células epiteliales (Xue *et al.*, 2017; Keir *et al.*, 2020).

La IL-22 desempeña un papel esencial en el control de infecciones y en el mantenimiento de la integridad de mucosas como el intestino. Su función se basa en múltiples aspectos de la barrera epitelial, comenzando desde la primera línea de defensa contra patógenos, como es la mucina producida por células caliciformes; la IL-22 induce la expresión de genes de mucina y aumenta el número de células caliciformes por consiguiente aumenta la producción de moco. Se ha reportado que IL-22 parece tener una función protectora en el intestino al reducir la adherencia de los agentes patógenos, ya que su presencia induce la expresión intestinal del gen de la fucosiltransferasa 2 (FUT2), estimulando la fucosilación, es decir, añadiendo moléculas de fucosa en las células epiteliales intestinales (IEC). Además, participa en la fisiopatología de la diarrea, la IL-22 regula positivamente a la claudina-2 epitelial la cual regula las uniones epiteliales, su estimulación provoca la salida de agua y como consecuencia se presenta la diarrea, método por el cual se eliminan patógenos a través de las heces.

IL-22 induce la producción de proteínas antimicrobianas (AMP) como  $\beta$ -defensinas, proteínas en regeneración y proteínas S100, proteínas clave que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de patógenos. Finalmente, si los patógenos logran atravesar la barrera epitelial, la IL-22 induce la expresión de citocinas antivirales como IL-18 en IEC, la IL-18 facilita el reclutamiento de células innatas al sitio de infección. También IL-22 regula la vía del complemento, al inducir la expresión del gen C3 del complemento. Por último, es capaz de regular el crecimiento y regeneración del epitelio, sobre todo su producción en las células ILC3 lo que impide la infección viral (*Figura 15*). Existen estudios que demuestran

actividad antiviral de IL-22 *in vitro* en infecciones con el DEPV, sin embargo, en estudios *in vivo* esto no ha sido dilucidado (Keir *et al.*, 2020).

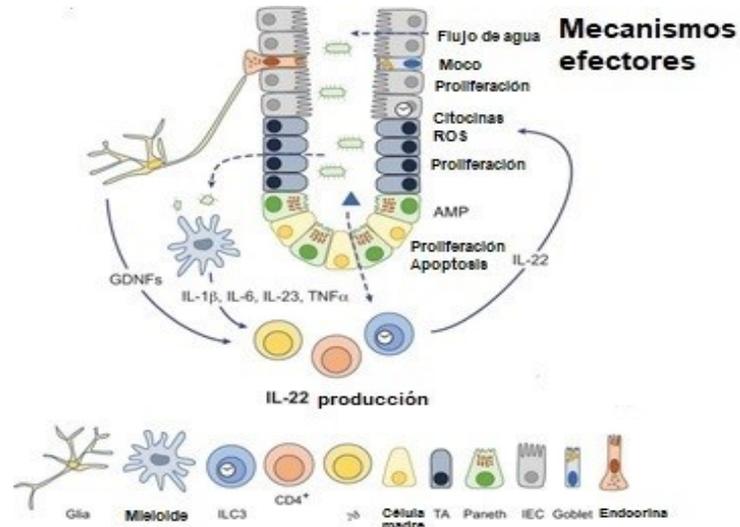


Figura 15. Papel de la IL-22 en el intestino durante la homeostasis. Los mecanismos de detección que conducen a señales que estimulan la producción de IL-22 están en el lado izquierdo, y las funciones efectoras de IL-22 en los diferentes tipos de células epiteliales están en el lado derecho. Modificado de Keir *et al.*, 2020.

### 1.5. Inmunidad lactogénica

Desde 1954 se informó que en el caso de los cerdos no es posible la transferencia de anticuerpos a través de la placenta. Esto debido a su estructura considerada epiteliocorial, este tipo de placenta presenta seis capas de tejido lo que impide el paso de inmunoglobulinas; y por esta razón los lechones al nacer son agammaglobulinémicos. Además, el lechón se vuelve completamente inmunocompetente a partir de la 5 semana de edad, donde comienza a sintetizar activamente las inmunoglobulinas, sin embargo, mientras eso sucede su capacidad para responder a agentes infecciosos se ve comprometida durante el primer mes de vida. Por lo tanto, en esta brecha los hace dependientes de las inmunoglobulinas

secretadas por la cerda a través del calostro y la leche (Langel *et al.*, 2016; Poonsuk y Zimmerman, 2018).

Para el caso de la DEP y otras enfermedades entéricas, crear una inmunidad lactogénica efectiva es primordial para el control de la infección en los lechones, debido a que es una infección localizada principalmente en el intestino, por lo tanto, las estrategias efectivas deben centrarse en inducir inmunidad en la mucosa intestinal (Langel *et al.*, 2016).

Para que esta inmunidad pasiva pueda darse es necesario saber cómo ocurre la lactogénesis. La lactogénesis es un proceso que comienza entre los 90 y 105 días de gestación, en el cual se crean componentes que serán secretados en calostro y leche. La lactogénesis se divide en dos fases: La fase 1 de la lactogénesis, donde se sintetizan los componentes de la leche como lactosa, caseína y lípidos. Y la fase 2, la cual inicia en el momento del parto e implica la síntesis y secreción de la leche. La fase 2 a su vez se divide en fases calostrales, ascendente, meseta y descendente. La fase calostrales comienza inmediatamente después del parto, con producción total de calostro por día es <50% de la producción de leche de la lactancia temprana; este calostro contiene más proteínas, menos grasa y menos azúcar que la leche, de acuerdo con estudios se produce en promedio 3.5 Kg de calostro en las primeras 24 hrs. Continúa la fase ascendente de 24 a 48 hrs después del parto donde el calostro cambia por leche, en esta fase la frecuencia y volumen de secreción aumentan hasta alcanzar su máxima producción al día 10 posterior al cambio, con un rendimiento de aproximadamente 13-15 kg/día. Posteriormente la fase de meseta es el periodo donde se mantiene el nivel de producción de leche que puede durar hasta 28 días. Y por último la fase descendente, comienza la disminución de la producción láctea, sin embargo, en producción puede no existir la fase descendente al destetarse antes del día 28 (Poonsuk y Zimmerman, 2018). Esta producción puede variar en las cerdas por diferentes factores como el tamaño de la camada, el tamaño de los lechones, la frecuencia de lactancia, la etapa de lactancia,

la edad de la cerda, la condición corporal, el número de parto y el comportamiento materno (Tizard, 2018; Theil y Hurley, 2016).

Las secreciones mamarias contienen componentes como células, se ha reportado que en calostro la población celular consiste en neutrófilos 71.7%, linfocitos 26.4%, macrófagos 1.3%, células epiteliales 0.4% y eosinófilos 0.2%. La mayor proporción de células se presentan en calostro y posteriormente disminuyen hasta el día 20 postparto, con excepción de las células epiteliales que al contrario aumentan. Por su parte del total de linfocitos secretados, los linfocitos T CD4 y CD8 son los que se presentan en mayor proporción de 70 a 90% (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

Otro tipo de componentes que se encuentran en las secreciones mamarias son los anticuerpos. Los isotipos de anticuerpos identificados son IgG en un 79.7%, IgA con 14.1% e IgM con 6.2%, sin embargo, las proporciones cambian entre el calostro y la leche. En el calostro se presentan concentraciones más altas de inmunoglobulinas, en promedio 65 g/L de IgG total, 13 g/L de IgA y 8 g/L de IgM aproximadamente y disminuyen entre un 30% a 45% a las 12 horas, y continúan disminuyendo en los próximos días. En la leche madura las concentraciones son aproximadamente de IgG 1 g/L, IgA 4 g/L e IgM 1.6 g/L aproximadamente (Theil y Hurley, 2016; Poonsuk y Zimmerman, 2018).

Los anticuerpos secretados derivan de dos fuentes distintas: de suero, producido por las células plasmáticas en los tejidos linfoides y llega a las glándulas mamarias a través del sistema circulatorio. Donde en calostro es del 100% la presencia de IgG, 24 a 54% de IgA y 70 a 100% de IgM y en la leche el 20 a 38% corresponde a IgG, 12 a 27% de IgA y 4 a 32% de IgM provienen del suero. El resto se producen en el tejido mamario, dentro del parénquima por las células plasmáticas que maduran en los folículos linfoides de la mucosa que luego vuelven a ingresar al sistema circulatorio y migran al parénquima mamario (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

Todo comienza cuando los linfocitos B inmaduros migran de la médula ósea a tejidos linfoides secundarios. Posteriormente después de la estimulación con algún antígeno, las células B se convierten en células plasmáticas (o plasmoblastos) que migran a tejidos extralinfoides (como la lámina propia o glándula mamaria), este proceso va a depender de diferentes elementos como ligandos, receptores y quimiocinas. El tráfico en mucosa intestinal está regulado en gran medida por la expresión de linfocitos  $\alpha 4\beta 7$  que interactúa con la molécula de adhesión celular 1 (MAdCAM-1) y los ligandos de quimiocinas CCL25 y CCL28 en la superficie de las células endoteliales que se unen a los receptores de quimiocinas de linfocitos, CCR9 y CCR10, respectivamente (Figura 16) (Langel *et al.*, 2020).

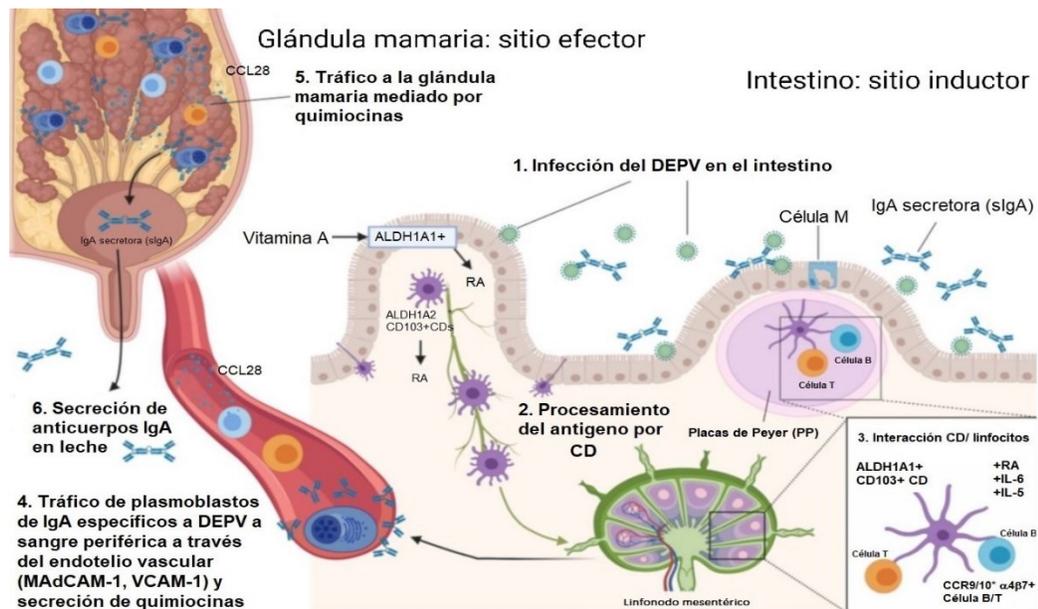


Figura 16. Representación de la inmunidad lactogénica con el eje intestino-mamario-SIgA (Langel *et al.*, 2016).

### 1.5.1. Transporte

El tránsito de las inmunoglobulinas a los alveolos se genera por mecanismos dependientes de isotipo. El transporte de IgG esta mediado por la unión de la cadena pesada de IgG y el receptor Fc neonatal (FcRn) localizado en la superficie de las células epiteliales mamarias. Esta unión se da con alta afinidad en un pH

<6.5, una vez unida la IgG al receptor esta se endocita y es transportada a los alveolos de la glándula mamaria, donde cambia el pH a 7.2-7.8 y esto provoca que el receptor FcRn pierda afinidad por la IgG, deshaciendo la unión y liberando la IgG (*Figura 17A*) (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

En contraste, para IgA e IgM su transporte esta mediado por el receptor plgR en células epiteliales mamarias. Estos isotipos de inmunoglobulinas son poliméricas, al unirse dos (en el caso de IgA dimérica) o cinco (en el caso de IgM pentamérica) monómeros al péptido de la cadena J. Esta cadena J se une al receptor plgR, lo que ocasiona que la inmunoglobulina sea internalizada por endocitosis y trasportada a la superficie basolateral de las células epiteliales en su superficie apical, donde el receptor plgR es escindido por enzimas proteolíticas, liberando a la inmunoglobulina (junto con la cadena J y el receptor plgR) en el alveolo para ser secretada (*Figura 17B*) (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

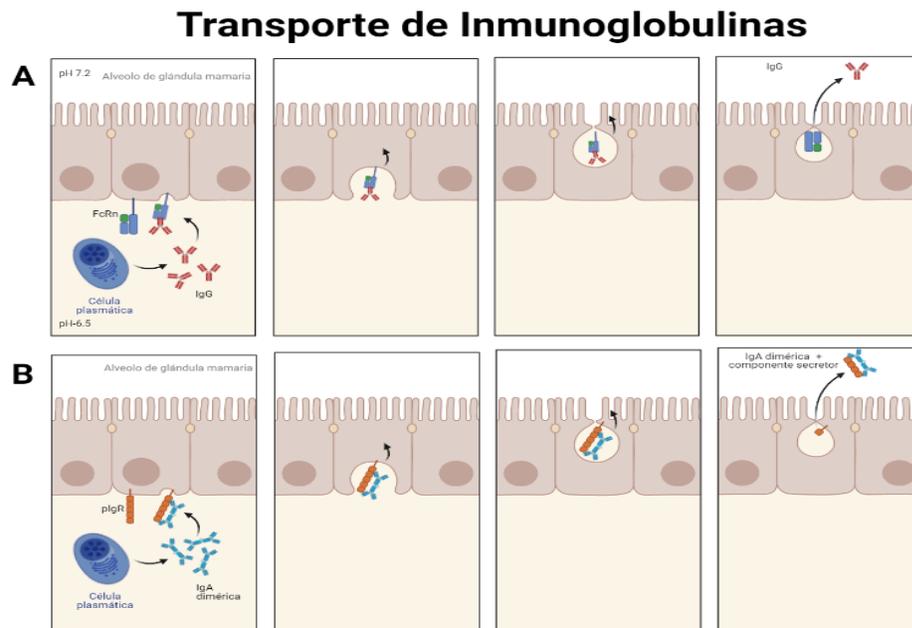


Figura 17. Transporte de inmunoglobulinas en las células de la glándula mamaria.

A) Inmunoglobulina IgG. B) Inmunoglobulina IgA.

### **1.5.2. Absorción**

El sistema inmune adaptativo del lechón recién nacido se considera inmaduro, por contener células linfoides limitadas, tejido linfoide no desarrollado y ausencia de linfocitos efectores y de memoria. Para compensar estas carencias, tanto anticuerpos y células son proporcionados a través del calostro y la leche otorgando protección al lechón en las primeras semanas de vida. En el caso de los anticuerpos, después del nacimiento los lechones ingieren calostro, al tener una actividad de proteolítica baja y con los inhibidores de tripsina presentes en calostro permiten que las inmunoglobulinas no se degraden y lleguen intactas al intestino delgado y sean absorbidas (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

Esta absorción de las inmunoglobulinas se inicia al ocurrir alguno de estos dos mecanismos: endocitosis no selectiva o unión del anticuerpo mediada por receptores específicos. La endocitosis no selectiva se basa en que las células del intestino delgado están revestidas con células epiteliales de mucosa temporales que pueden absorber macromoléculas intactas, posteriormente se liberan en lamina propia, se difunden en el sistema linfático intestinal e ingresan a circulación. Este tipo de absorción existe durante un período de tiempo muy limitado (posterior al nacimiento, 2 h en el duodeno, 48 h en el yeyuno y 72 h en el íleon), ya que el epitelio de la mucosa es reemplazado por células que no permiten el paso de macronutrientes, a lo que se le denomina cierre del intestino. Después de este cierre, la mayoría de las inmunoglobulinas son degradadas por enzimas digestivas, sin embargo, SIgA y SIgM al estar unidas al componente secretor evitan esta degradación, y su absorción se lleva a cabo por medio de receptores FcRn y pIgR en las células epiteliales intestinales (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

En cerdos la absorción es selectiva, la IgG e IgM se absorben en su mayoría mientras que la IgA permanece en el intestino (Tizard, 2018). Incluso algunas inmunoglobulinas absorbidas pueden sufrir trasudación hacia la superficie de la mucosa, donde desempeña un papel importante en la protección contra patógenos entéricos (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

Las células como linfocitos ingeridos también pueden atravesar el epitelio intestinal por migración intracelular, solo durante una semana posterior al nacimiento. Las células absorbidas migran a linfonodos mesentéricos y a diferentes tejidos (hígado, pulmón, bazo y lámina propia) (Poonsuk y Zimmerman, 2018).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que actualmente no existe una vacuna con valores de protección significativos contra el virus de la diarrea epidémica porcina, la investigación enfocada hacia inmunizaciones con virus activo tiene un valor prioritario debido a la situación de la producción porcina en México. Este trabajo pretende brindar a los productores y médicos veterinarios el conocimiento de la inmunidad lactogénica en las infecciones por el DEPV, que es considerado endémico en el país. Generar información valiosa y novedosa sobre la respuesta inmune a esta infección por lo que la información no solo podrá ser usada para entender la patogenia de la infección por el DEPV, sino que además ayudará a guiar la generación de posibles cepas virales que podrían ser usadas como virus activos vacunales, así como, evaluar los efectos que estas inmunizaciones tendrían en las cerdas gestantes y sus camadas. Se considera que la información generada por esta investigación tendrá aplicaciones prácticas a nivel de producción e investigación.

## **3. HIPÓTESIS**

- Las cerdas inoculadas con el DEPV aislado y cuantificado presentaran mayores niveles de IgG, IgA y anticuerpos neutralizantes en comparación con cerdas inoculadas con feedback.
- Los lechones nacidos de cerdas con inoculación directa presentaran mayor concentración de IgG que los lechones nacidos de cerdas inoculadas con feedback.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la inmunidad lactogénica de cerdas inmunizadas con una dosis única del virus de la Diarrea Epidémica Porcina aislado en comparación con cerdas inoculadas con el método de feedback.

##### **4.1. Objetivos específicos**

- Determinar y comparar los niveles de IgG en suero de cerdas inmunizadas con el DEPV utilizando como tratamientos inóculo aislado y feedback.
- Determinar y comparar los niveles de IgG, IgA y anticuerpos neutralizantes en calostro y leche de cerdas inmunizadas con el DEPV utilizando como tratamientos inóculo aislado y feedback.
- Determinar y comparar los niveles de IgG en suero de lechones nacidos de cerdas previamente inmunizadas con el DEPV utilizando como tratamientos inóculo aislado y feedback.
- Evaluar la participación de las interleucinas IL-12 e IL-22 en la respuesta inmune inducida por la inmunización con el DEPV en cerdas utilizando como tratamientos inóculo aislado y feedback.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Lugar**

El proyecto se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en el Km 2 de la carretera Jilotepec-Corrales, en Jilotepec, Estado de México.

Es una granja de ciclo completo, con un inventario de 150 hembras pie de cría con auto reemplazo. La granja tiene un flujo de 8 partos semanales, con destetes de 21 días y alberga a sus lechones durante 5 semanas en las salas de crecimiento, para su posterior paso a la engorda hasta el término del ciclo.

Dicho proyecto fue sometido y aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) con el número de protocolo SICUAE.MC-2020/4-4.

### **5.2. Antecedentes**

El CEIEPP presentó su primer brote de DEP el 24 de marzo del 2014, presentando tasas de morbilidad del 100% y mortalidad del 85-90% en lechones. El diagnóstico de DEP se confirmó mediante pruebas de PCR y como tratamiento se implementó la administración oral de feedback (a razón de un intestino por cada quince cerdas, aproximadamente 80 ml por hembra) por 15 días consecutivos. Esto trajo como consecuencias el aumento de mortalidad y momificaciones en años subsecuentes, con diagnóstico de enfermedades como Parvovirus porcino y Circovirus porcino.

El 15 de enero del 2018 se presentó signología sugerente a un rebrote de DEP, por lo que se realizaron pruebas confirmatorias mediante inmunocromatografía (Anigen Rapid PED TEST KIT/ RG14-01, Bionote) y PCR comercial que permite diferenciar a los coronavirus porcinos (VetMAX™ PEDV/TGEV/SDCoV Kit, Applied Biosystems™ by Thermo Fisher Scientific). Como tratamiento se administró vía oral a las cerdas un inoculó del virus del brote anterior aislado y cuantificado a una concentración de  $1 \times 10^8$  DICC<sub>50%/ml</sub> y feedback el día 26 de enero del 2018.

El día 6 de febrero mediante pruebas serológicas como ELISA, tanto las cerdas y sus camadas presentaron mejoría, observando disminución de la signología clínica de la enfermedad (*Figura 18*).



Figura 18. Línea de tiempo de los antecedentes en CEIEPP respecto a DEP.

### 5.3. Grupos de estudio

Los grupos de estudio se dividieron en 3 (*Cuadro 2*), conformados por cerdas pie de cría de diferente número de parto y lechones nacidos de estas cerdas, organizados de la siguiente manera:

- El grupo control: conformado por cerdas sin inoculación, pero con infección natural.
- El grupo inoculación con “Feedback”: conformado por cerdas inoculadas vía oral con contenido intestinal de lechones infectados con DEPV, el cual fue licuado y utilizado en una única dosis, donde se corroboró la presencia del virus por medio de RT-PCR.
- El grupo inoculación directa (I): conformado por cerdas inoculadas con el virus aislado y en una dosis única a una concentración de  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml.

Cuadro 2. Descripción de los sujetos de estudio que conformaron cada grupo analizado.

GRUPOS DE ESTUDIO			
Especie	Género	Cantidad	Grupo (tratamiento)
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Hembra pie de cría	6	Control
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Hembra pie de cría	14	Feedback
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Hembra pie de cría	12	Inóculo directo
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Lechones	12	Control
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Lechones	48	Feedback
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Lechones	56	Inóculo directo

#### 5.4. Muestras

##### 5.4.1. Hembras

Las muestras de sangre se obtuvieron de hembras gestantes de la vena yugular previo a la inoculación y post-inoculación (*Figura 19*). Se colectaron en tubos Vacutainer® rojos y posteriormente fueron procesados por centrifugación (Eppendorf® Microcentrifuge 5415) a 1500 rpm por 10 min con la finalidad de separar el suero, el cual fue almacenado en tubos criogénicos estériles de 1.5 ml a -20° C.

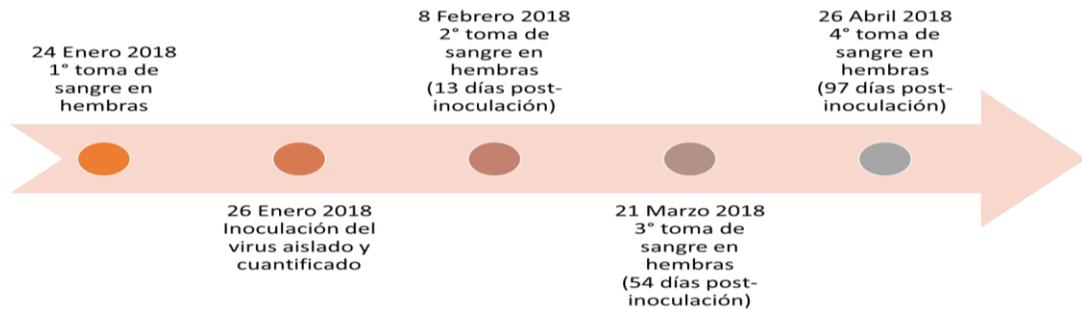


Figura 19. Cronograma de toma de muestras sanguíneas de hembras porcinas pie de cría.

Se colectaron muestras de calostro y leche de cerdas lactantes cada 7 días a partir del parto hasta el destete (calostro= día 0, y leche = día 7, 14 y 21) (Figura 20). Previo a la toma se realizó una limpieza de la glándula mamaria con toallas desechables y cloruro de benzalconio. Se recolectaron en tubos de centrifuga estériles de 15 ml (Falcon™) y se almacenaron en congelación a -20° C, posteriormente se trasladaron al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ para conservarse en ultracongelación -70° C. Previo a su utilización las muestras fueron descongeladas y se obtuvo 1.5 ml en tubos criogénicos estériles (Eppendorf™), se centrifugaron (Eppendorf® Microcentrifuge 5415) a 13,000 g por 15 min a 4°C para eliminar grasa y suciedad, finalmente se almacenaron en tubos criogénicos estériles de 1.5 ml a -20° C (Poonsuk *et al.*, 2016).

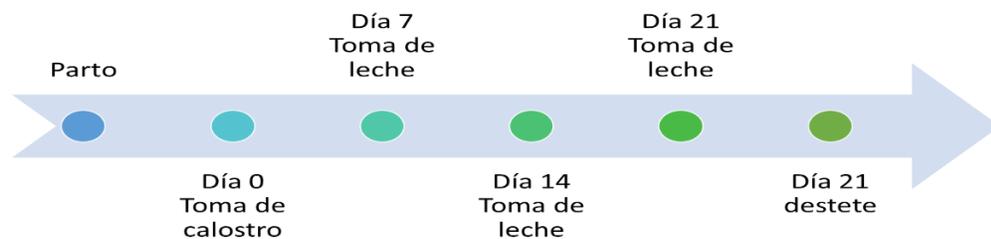


Figura 20. Cronograma de toma muestras de calostro y leche de cerdas.

#### 5.4.2. Lechones

Las muestras de sangre de lechones se obtuvieron de la vena cava anterior el día 7 y 21 de edad (Figura 21). Se colectaron en tubos Vacutainer® rojos y posteriormente fueron procesados por centrifugación con la finalidad de separar el suero, el cual fue almacenado en tubos criogénicos estériles de 1.5 ml a -20° C.

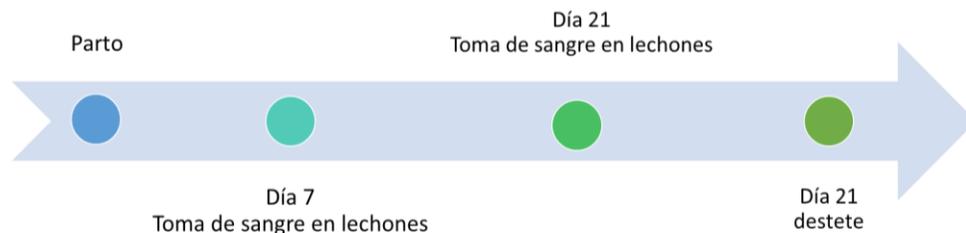


Figura 21. Cronograma tomas de muestra sanguíneas en lechones.

## 5.5. Pruebas

### 5.5.1. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgG

La detección de IgG específicas contra el DEPV en el suero de las cerdas y lechones, así como, del calostro y leche de cerdas lactantes, se realizó por medio de ELISA para IgG mediante el uso de un kit comercial ID Screen® PEDV (Indirect kit ID Screen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El valor muestra/positiva (SP por sus siglas en inglés) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$S/P \% = \frac{DO_{muestra} - DO_{Control\ negativo}}{DO_{Control\ positivo} - DO_{Control\ negativo}} \times 100$$

### 5.5.2. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgA

Para la detección de IgA específica contra el DEPV en calostro y leche de las cerdas lactantes se realizó con el ensayo de ELISA de acuerdo con lo reportado por Bjustrom et al., 2018 y Becerra, 2019, con algunas modificaciones. Se sensibilizó una placa para ELISA (Costar™ EIA/RIA de 96 pocillos) con 100 µl de virus purificado por gradiente de sacarosa (3.03 µg/ml proteína total en buffer de carbonatos) por pozo, se cubrió y se dejó incubar por 16 horas a 4° C, posteriormente, se realizaron tres lavados con solución de lavado (buffer fosfato salino (PBS) con Tween 20 al 0.2%). Con la finalidad de disminuir las uniones no específicas se adicionaron 200 µl de solución de bloqueo (PBS con 2% de leche descremada y 0.02% de Triton X-100) y se dejó incubando 1 hora a 37° C. Al finalizar la incubación, se realizaron tres lavados con solución de lavado. Se agregaron 100 µl del suero del calostro y leche en una dilución 1:10, utilizando como control negativo leche descremada, se dejó incubar 1 hora a 37° C y al finalizar el tiempo de incubación se realizaron tres lavados. En cada pozo se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario Anti-IgA de cerdo hecho en cabra conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés) (Bethyl laboratorios) diluido 1:500, se dejó incubar 1 hora a 37° C y posteriormente se lavó la placa tres veces con solución de lavado. Por último, se agregaron 100 µl de Novex® HRP Chromogenic Substrate TMB (Invitrogen™) y se incubó a 37° C, se

realizaron mediciones de absorbancia a los 15, 30 y 45 minutos con un filtro de 405 nm en el espectrofotómetro Multiskan Ex (Thermo Fisher Scientific) (Bjstrom et al., 2018; Becerra, 2019).

### **5.5.3. Ensayo de neutralización de la infectividad viral**

Preparación de la placa con células para la infección, se colocaron 30,000 células Vero por pozo en placas de 96 pozos para cultivo celular de fondo plano; se propagaron a confluencia al 80% en medio D-MEM high glucosa suplementado con suero fetal bovino (SFB) 8% y glutamina 10 mM (medio de propagación) y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>, por 24 h o hasta el 100% de confluencia.

Los sueros se sometieron a tratamiento para inactivación del complemento a 56°C por 30 min y se conservaron los sueros en alícuotas

El procedimiento para la neutralización se llevó a cabo en una placa de 96 pozos sin células, se colocó 90 µl de medio D-MEM high glucosa suplementado con 15 µg de tripsina y glutamina 10 mM (medio de infección). Se tomaron 10 µl de cada muestra (suero, calostro o leche) y se realizaron diluciones en medio de infección (1:10, por duplicado), se agregaron 100 µl del virus DEP a una multiplicidad de infección de 0.1 a todos los pozos con suero.

Para el control de muestra, se realizaron las diluciones de cada suero/calostro/leche y se agregó 100 µl de medio de infección.

Para el control del virus se colocó 90 µl de medio de infección en dos pozos y se agregó 100 µl del DEPV a una multiplicidad de infección de 0.1.

Y para el control de células se agregó 190 µl de medio de infección en dos pozos.

Las muestras y los controles se incubaron a 37° C por 1 h. Pasado el tiempo se transfirió el contenido de la placa de diluciones a la placa que contenía las células con 100% de confluencia; se incubó a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub>, por 48 o 72 h hasta la observación de efecto citopático (ECP).

Se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS. Se fijó por 24 h con formaldehído al 1% en PBS; posteriormente se retiró el formaldehído y se añadió cristal violeta en formaldehído (37%), se incubó 1 h a temperatura ambiente (TA).

Por último, se lavó a chorro de agua, se añadió ácido acético al 10% en PBS, se incubó 30 min a TA, se leyó la absorbancia a 590 nm y se tomó el título basado en el ECP.

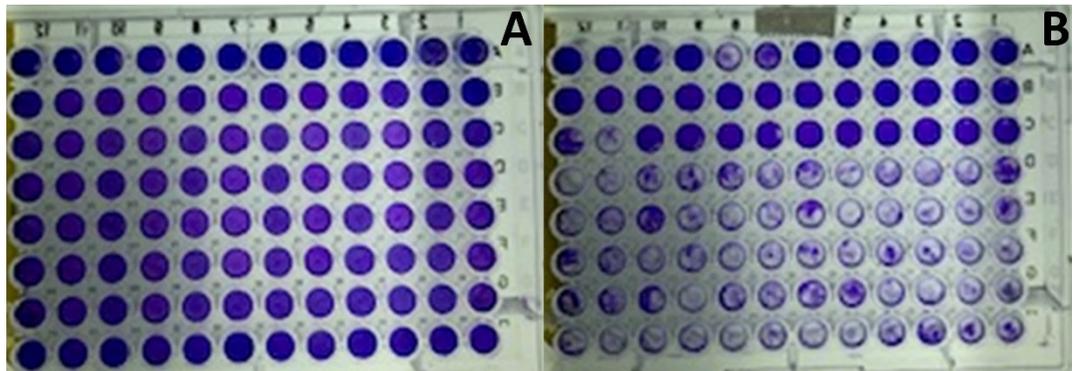


Figura 22. Ejemplos de placas de neutralización. A) Ejemplo de placa con control de células. B) Ejemplo de placa con título bajo de anticuerpos neutralizantes.

#### **5.5.4. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-12**

La determinación de IL-12 en el suero de las cerdas gestantes se llevó a cabo por medio del kit comercial Porcine IL-12 (IL12A) (Thermofisher®, número de catálogo ESIL12A) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, diluyendo la muestra 1:2. La concentración expresada en ng/ml se obtuvo al correlacionar los valores en una curva estándar, a partir de parámetros estándares.

#### **5.5.5. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-22**

La determinación de IL-22 en el suero de las cerdas gestantes se llevó a cabo por medio del kit comercial Porcine IL-22 (Thermofisher®, número de catálogo ES13RB) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, diluyendo la muestra 1:2. La concentración expresada en pg/ml se obtuvo al correlacionar los valores en una curva estándar, a partir de parámetros estándares.

## **5.6. Análisis estadístico**

Para determinar el efecto de los tratamientos en la respuesta inmune en cerdas, medida por la concentración de IgG, así como en los resultados de neutralización, se utilizó una prueba de U Mann-Withney (Higgins, 2004).

Para determinar los efectos por tratamiento, así como el tiempo medido por los resultados de IgG en suero de lechones, IgG e IgA en calostro y leche, IL12 y IL22, se utilizó un modelo de medidas repetidas (Park *et al.*, 2009). Se comprobó la diferencia de la concentración a lo largo del tiempo, se fijó la mejor estructura de covarianza y se usó una prueba de Tukey ajustada (Kramer, 1956).

Para determinar la estadística descriptiva se realizaron las gráficas por medio de Box Plot un programa en línea (<https://chart-studio.plotly.com/create/box-plot/#/>) para ordenar y resumir los resultados de los tratamientos.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgG**

#### **6.1.1. Suero**

De acuerdo con el análisis estadístico realizado para los resultados obtenidos de IgG en suero de hembras, indico que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos inóculo directo y feedback ( $P>0.5$ ).

En el caso de los resultados obtenidos de IgG en suero de lechones, existe evidencia estadística suficiente que indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos o sexo del lechón ( $P>0.5$ ), sin embargo, hay diferencias significativas en la edad del lechón para el tratamiento de feedback y control ( $P<0.05$ ) (*Cuadro 3*).

Cuadro 3. Resultados estadísticos obtenidos de la determinación por ELISA de IgG contra el DEPV en suero de lechones de diferentes edades.

<b>Tratamiento</b>	<b>Edad del lechón</b>			
	<b>7</b>		<b>21</b>	
	<b>M</b>	<b>EE</b>	<b>M</b>	<b>EE</b>
<b>Inóculo directo</b>	38.25 <sup>a</sup>	6.21	29.37 <sup>a</sup>	6.21
<b>Feedback</b>	46.01 <sup>a</sup>	8.46	31.91 <sup>b</sup>	8.46
<b>Control</b>	36.50 <sup>a</sup>	13.89	7.99 <sup>b</sup>	13.89

Literales diferentes en filas representan diferencia de ( $P < 0.05$ ).

En la Gráfica 1A, observamos el comportamiento de la IgG contra el DEPV en el suero de las hembras, donde el tratamiento de inóculo directo presenta mayores valores de SP respecto al del tratamiento por feedback, sin embargo, esta no es una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.5$ ); en esta gráfica no se muestran resultados del tratamiento control debido a la falta de muestras para su evaluación. En la Gráfica 1B describe el comportamiento de la IgG contra el DEPV en suero de lechones en los diferentes tratamientos, donde el feedback es ligeramente superior al inóculo y control, sin embargo, estadísticamente no hay diferencia significativa ( $P > 0.5$ ). De igual manera que en la Gráfica 1C que representa los valores de IgG en suero de lechones en diferentes tratamientos y diferente sexo del lechón, donde no se observan diferencias significativas ( $P > 0.5$ ). En cuanto a la Gráfica 1D sobre el comportamiento de IgG contra el DEPV en suero de lechones por tratamientos y por edad del lechón, observamos que a los 7 días de edad los lechones presentan mayores valores SP de IgG a diferencia del día 21 de edad en cada uno de los grupos, sin embargo, solo es estadísticamente significativa en feedback y control ( $P < 0.5$ ).

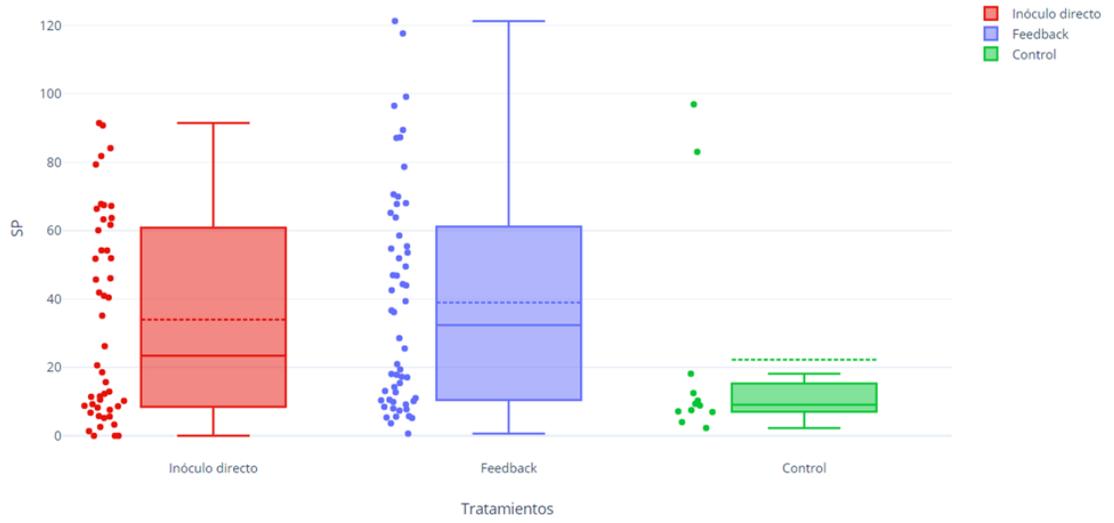
### IgG en suero de cerdas

**A**



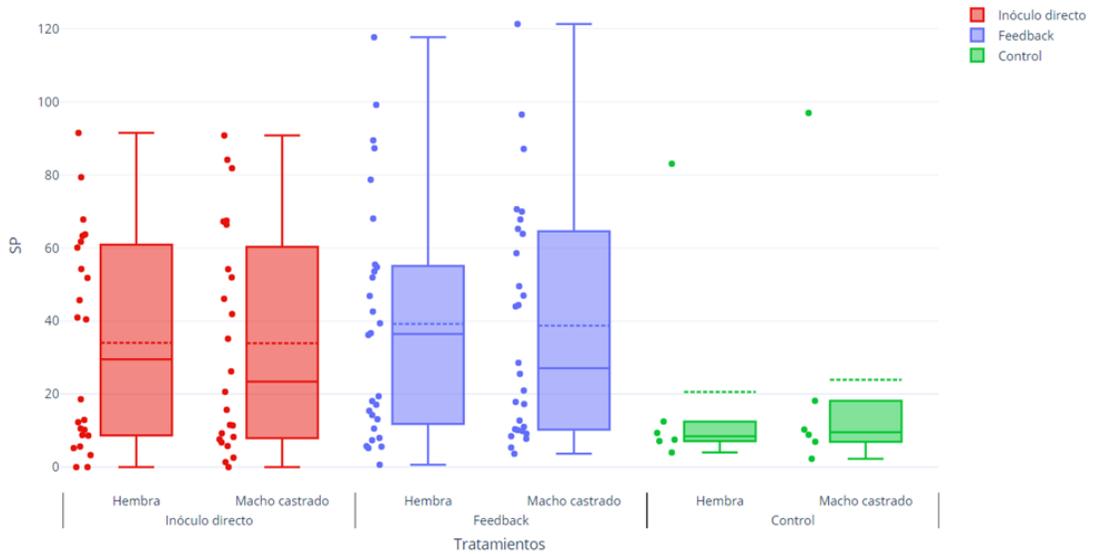
### IgG en suero de lechones

**B**



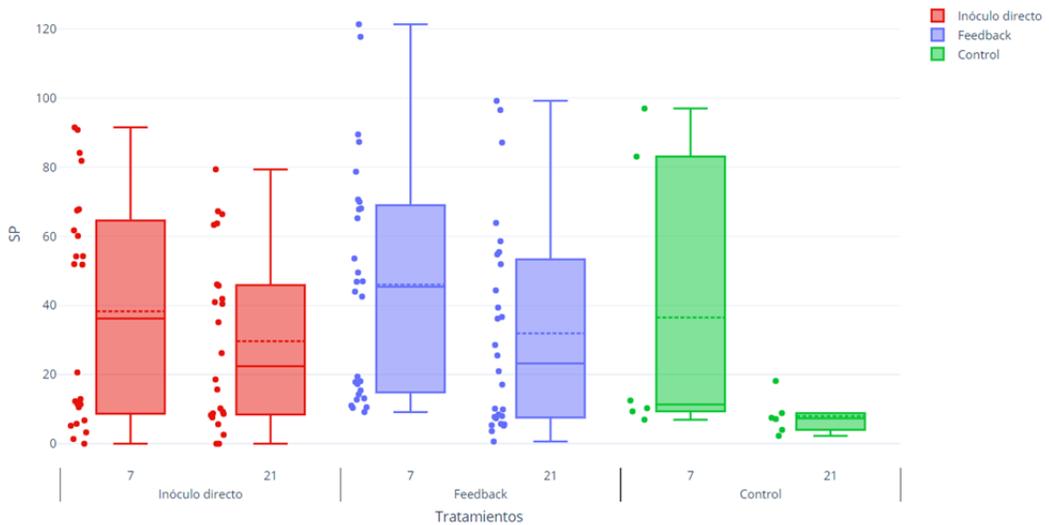
### IgG en suero de lechones

C



### IgG en suero de lechones

D



Gráfica 1. Valores SP de IgG contra el DEPV. A) En suero de hembras tratadas inóculo directo o feedback. B) En suero de lechones de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control. C) En suero de lechones de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por sexo del lechón. D) En suero de lechones de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por edad del lechón 7= 7 días de edad y 21= 21 días de edad.

### 6.1.2. Calostro y leche

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de IgG contra el DEPV en calostro y leche nos indicaron que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $P>0.5$ ). Con respecto al día de muestreo, en el día 0 hay diferencias estadísticas significativas en el tratamiento feedback con los tratamientos inóculo directo y control ( $P<0.5$ ). Además, en el día 0 hay diferencia estadística significativa con el día 7, 14 y 21; respecto a los demás días (7, 14 y 21) no se observa diferencia significativa ( $P>0.5$ ) (*Cuadro 4*).

Cuadro 4. Resultados estadísticos de IgG en calostro y leche.

Tratamiento	Días							
	0		7		14		21	
	M	EE	M	EE	M	EE	M	EE
<b>Inóculo directo</b>	47.19 <sup>a1</sup>	6.23	12.56 <sup>b</sup>	6.23	6.55 <sup>b</sup>	6.23	4.09 <sup>b</sup>	6.23
<b>Feedback</b>	76.86 <sup>a2</sup>	8.49	20.25 <sup>b</sup>	8.49	4.41 <sup>b</sup>	8.49	9.34 <sup>b</sup>	8.49
<b>Control</b>	55.07 <sup>a1</sup>	11.47	13.19 <sup>b</sup>	11.47	27.91 <sup>ab</sup>	12.41	NA	NA

Literales diferentes en la misma línea P ( $<0.05$ )

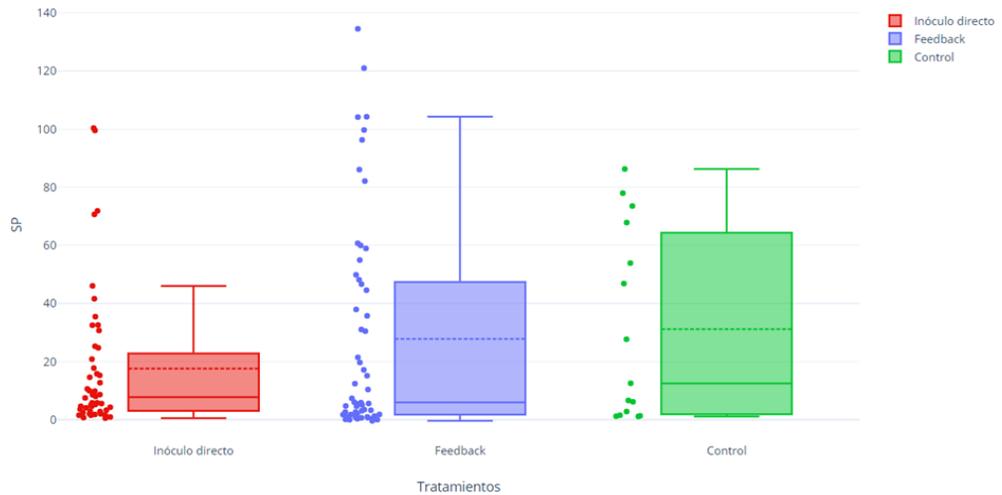
Numerales diferentes en la misma columna P ( $<0.05$ )

Los resultados de los valores SP de IgG contra el DEPV en calostro y leche de cerdas lo observamos en la *Gráfica 2*. Respecto a los resultados por tratamiento (*Gráfica 2A*) nos muestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, aunque el grupo inóculo directo es el que menor valor S/P presentó ( $P>0.5$ ). En la *Gráfica 2B*, observando el comportamiento de la IgG por tratamiento y por día de lactancia o muestreo, los valores SP del día 0 en el tratamiento feedback son mayores que en los tratamientos inóculo directo y control. Particularmente el día 0, es donde se presenta valores SP mayores con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás días de muestreo en cada uno de los grupos de tratamientos ( $P<0.5$ ), entre los días 7, 14 y 21 no se muestra diferencia significativa ( $P>0.5$ ); en general podemos observar que los valores

disminuyen conforme avanza la lactancia. La ausencia de muestras del día 21 se debe al manejo de las cerdas dentro de granja que no permitió que estas fueran tomadas.

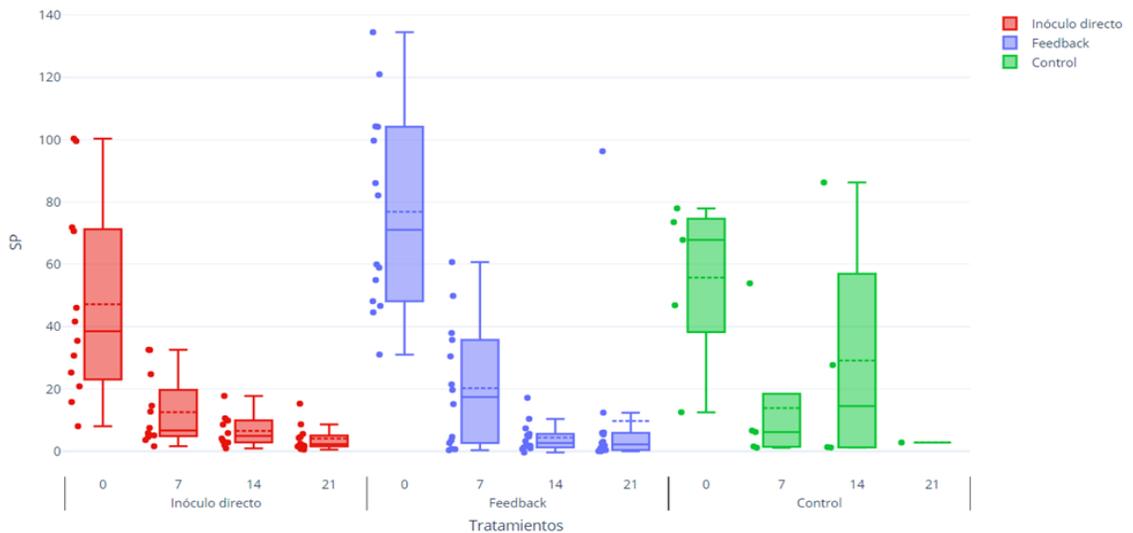
**IgG en calostro y leche de cerdas**

**A**



**IgG en calostro y leche de cerdas**

**B**



Gráfica 2. Valores SP de IgG contra el DEPV en calostro y leche de cerdas A) Tratadas con inóculo directo, feedback o control, B) de madres tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por días de muestreo T=0 calostro, T=7, 14y 21 leche.

## 6.2. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IgA

En los resultados estadístico de IgA en calostro y leche, se identificó diferencias significativas en el tratamiento feedback con respecto al día de muestreo en el día 0 y a los 21 días  $P (<0.05)$ , con valores de 0.51 y 0.43, respectivamente.

En la *Gráfica 3*, se muestran los valores de densidades ópticas (DO) de la IgA contra el DEPV en calostro y leche en cada uno de los tratamientos (*Gráfica 3A*), en donde podemos observar que tanto el tratamiento inóculo directo, control y feedback presentaron DO similares y no hay diferencia estadística significativa entre ellos ( $P>0.5$ ). En la *Gráfica 3B* se observa la DO de IgA contra el DEPV en calostro y leche por los diferentes tratamientos y días de muestreo, en el día 0 se presenta mayor DO teniendo diferencia estadística significativa solo en el tratamiento feedback con respecto al día 21 ( $P<0.5$ ), y sin diferencia estadísticamente significativa con el resto de los días ( $P>0.5$ ); además se puede observar que siguen el mismo comportamiento que con la IgG que disminuye conforme avanza la lactancia, con la diferencia que no es tan rápida la disminución en el transcurso de los días.

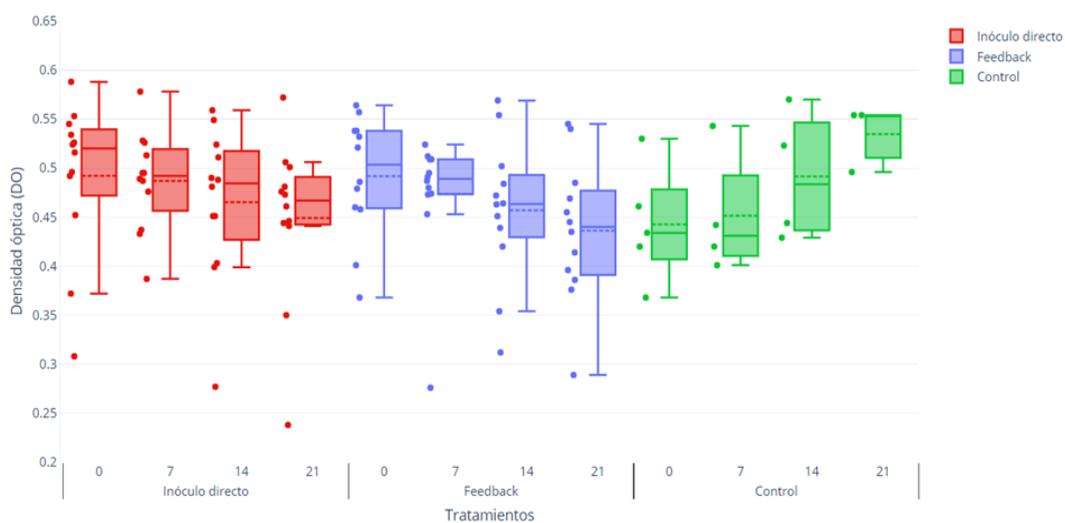
### IgA en calostro y leche de cerdas

**A**



### IgA en calostro y leche de cerdas

**B**

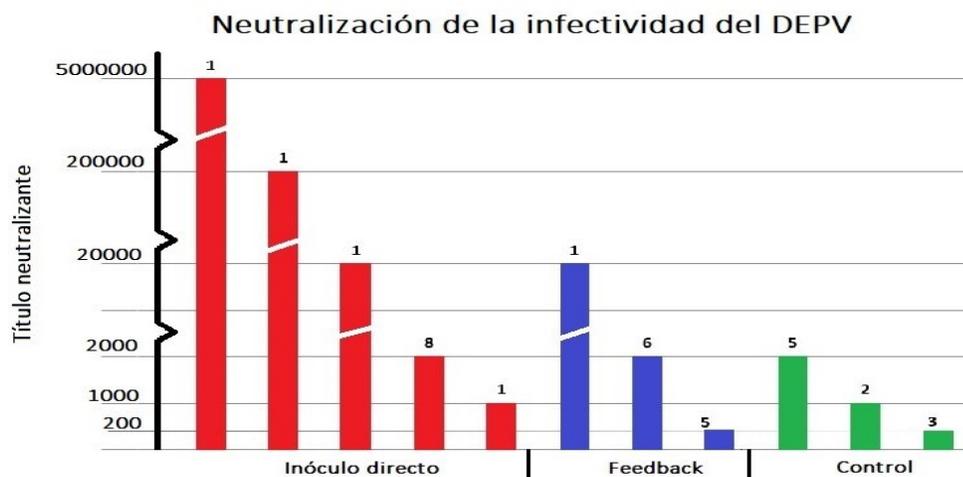


Gráfica 3. Densidad óptica de IgA contra el DEPV en calostro y leche de cerdas A) Tratadas con inóculo directo, feedback o control. B) Tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por días de muestreo T=0 calostro, T=7, 14y 21 leche.

### 6.3. Neutralización de la infectividad viral

Para la neutralización de la infectividad, hay evidencia estadística suficiente que los tratamientos tienen diferencias en la distribución ( $P < 0.5$ ). Con valores medios del tratamiento con inóculo directo 23.04, feedback 15.0 y control 13.85.

En la *Gráfica 4* se observa los resultados de los títulos neutralizantes en cada uno de los tratamientos. En el tratamiento con inóculo directo (color rojo) el individuo con menor título fue de  $1 \times 10^3$  y 66% presentaron títulos de  $2 \times 10^3$ , sin embargo, en este grupo alcanzaron mayores títulos como  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$ . En los resultados del feedback (color azul) de igual manera el 50% presentó títulos neutralizantes de  $2 \times 10^3$  y el resto de  $2 \times 10^2$ , con la excepción de un individuo que presentó  $2 \times 10^4$ . Por último, los títulos neutralizantes del tratamiento control (color verde), en donde el 50% de los individuos presentaron títulos de  $2 \times 10^3$ , un 20% presentaron títulos de  $2 \times 10^3$  mientras que el otro 30% fueron  $2 \times 10^2$ . Por lo tanto, los resultados indican que hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos ( $P < 0.5$ ), siendo el uso de inóculo directo quien presentó mayores títulos neutralizantes, entre el grupo feedback y el grupo control no hubo diferencia significativa ( $P > 0.5$ ).

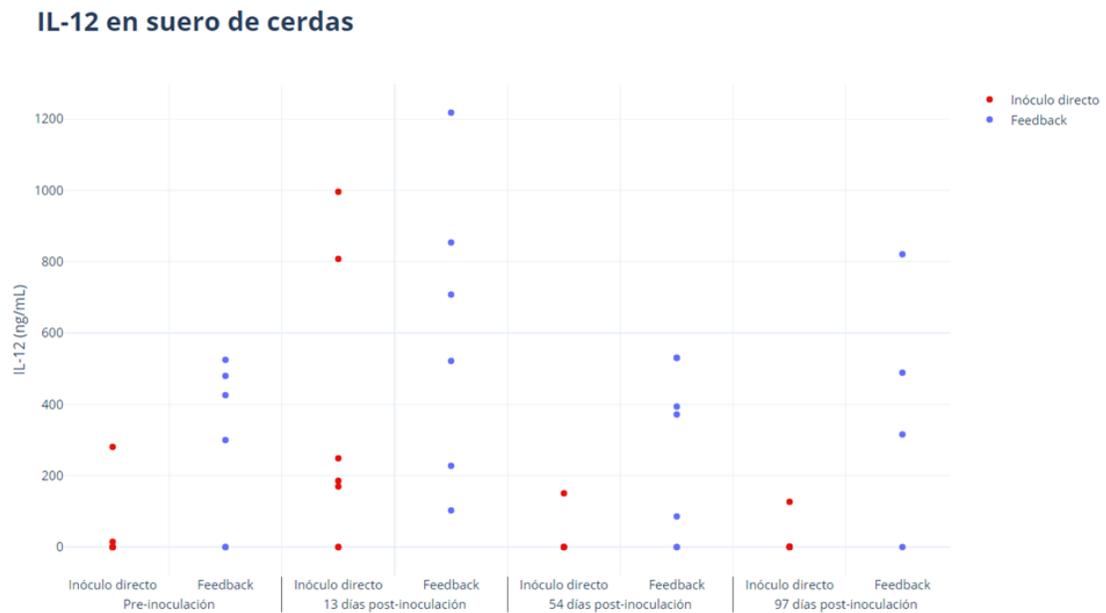


Gráfica 4. Ensayo de neutralización de la infectividad del DEPV en calostro y leche de cerdas tratadas con inóculo directo, feedback o control. Color rojo= grupo inóculo directo, color azul= grupo feedback y color verde= grupo control. El número de animales está representado en la parte superior de cada barra.

#### 6.4. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-12

En el estadístico de la concentración de IL-12, indica que las variables presentan la misma distribución, por lo tanto, no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos ni entre los muestreos ( $P>0.5$ ), con la excepción del muestreo 2 y muestreo 4 ( $P<0.5$ ).

La IL-12 en suero de las hembras con los tratamientos de inóculo directo y feedback, representada en la *Gráfica 5*, nos indica que el tratamiento feedback presentó mayores concentraciones que el grupo de inóculo directo, pero estos no son estadísticamente significativos ( $P>0.5$ ). En cuanto a los muestreos, el muestreo de 13 días post-inoculación fue en donde se presentó mayor concentración en comparación con el muestreo de 97 días post-inoculación, donde si hay una diferencia estadística ( $P<0.5$ ). Con respecto a los demás muestreos no se identificaron diferencias estadísticas significativas entre sí ( $P>0.5$ ).



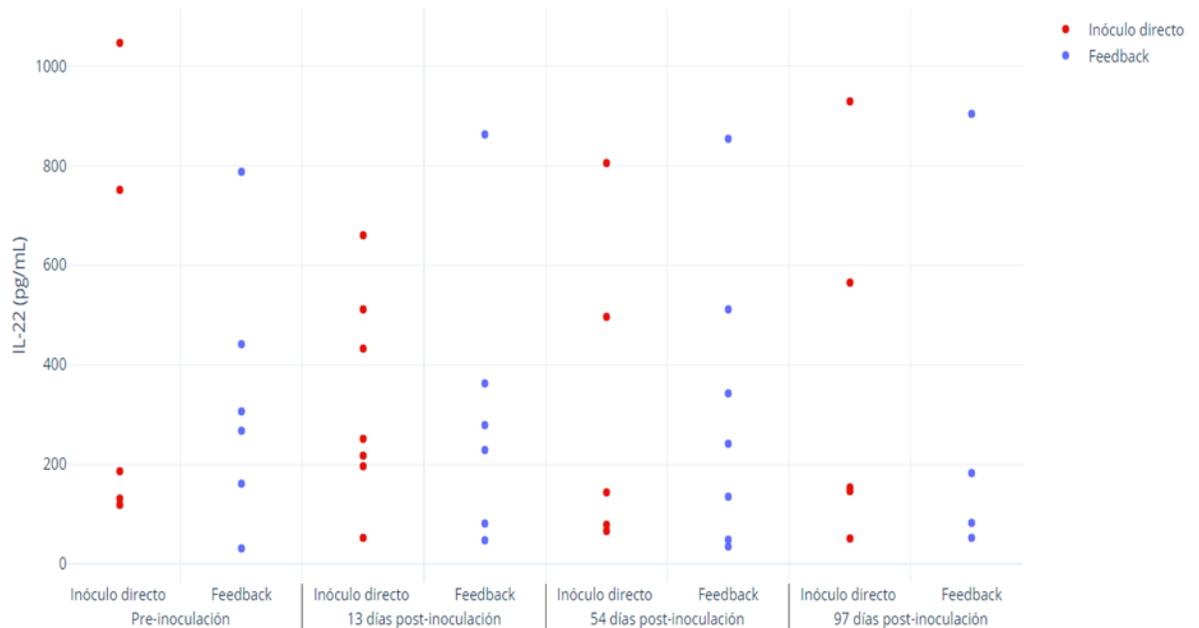
Gráfica 5. Concentración de IL-12 en sueros de cerdas tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por muestreos.

### 6.5. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para IL-22

Estadísticamente para IL-22 no se presentaron diferencias estadísticas significativas por tratamiento ni por muestreo ( $P < 0.05$ ).

La concentración de IL-22 en suero de las hembras con los tratamientos de inóculo directo y feedback, representada en la *Gráfica 6*, nos indica que el comportamiento entre los grupos de estudio y entre los muestreos son muy similares, por lo que no se muestra diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.5$ ).

#### IL-22 en suero de cerdas



Gráfica 6. Concentración de IL-22 en sueros de cerdas tratadas con inóculo directo, feedback o control, analizados por muestreos.

## 7. DISCUSIÓN

En los brotes iniciales de DEP, ante la falta de una vacuna disponible se recurrió a la inoculación del virus a través de un mecanismo denominado como Feedback, un método documentado por primera vez por Bay *et al.* (1953) utilizado contra GETV. Sin embargo, este método tiene varios inconvenientes al transmitir y perpetuar otros agentes dentro de la piara (Poonsuk y Zimmerman, 2018). Posteriormente, se encontraron disponibles vacunas comerciales para proteger al lechón por medio de la estimulación de la inmunidad materna, pero la baja eficacia mostrada por estas relacionado principalmente con el sitio de infección, naturaleza de la vacuna y vía de administración, hicieron patente la necesidad de buscar nuevas estrategias vacunales. Se ha demostrado que la vía de administración afecta el isotipo de anticuerpos secretados en leche, por lo tanto, una administración por vía parenteral en infecciones que involucran las mucosas no desencadena una buena inmunidad local para inducir IgA. Por lo tanto, es importante considerar la vía de entrada para generar una vacuna eficaz, en este caso la vía oral es fundamental para generar anticuerpos IgG e IgA y puedan ser protectoras en la mayoría de las infecciones digestivas (Poonsuk y Zimmerman, 2018; Jung *et al.*, 2020; Langel *et al.*, 2020).

En este estudio se compararon diferentes tipos de inoculación: inoculación directa con un virus aislado y cuantificado, inoculación por Feedback y una infección natural sin inoculación como control. La evaluación de anticuerpos IgG séricos en hembras y lechones no mostraron diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Estudios realizados por Wang *et al.*, (2019) en ratones y por Krishna *et al.*, (2020) en cerdos, en los cuales se inocularon los animales con DEPV, mostraron que los grupos inmunizados y sus grupos control correspondientes no presentaron diferencias significativas en los días iniciales post-infección, pero al transcurso de más días el grupo inmunizado tuvo mayores títulos que el control. Langel *et al.*, (2020) por su parte demostraron la transferencia pasiva de anticuerpos en leche, al detectar IgG en suero de lechones nacidos de cerdas inmunizadas. Los análisis realizados en lechones por sexo (hembra y macho castrado) no mostró diferencia

significativa, en contraste con el análisis realizado por edad (7 y 21 día de edad) se pudo identificar diferencia significativa con mayores niveles al día 7. Estos hallazgos se asocian con lo descrito por Poonsuk y Zimmerman, (2018) respecto a la absorción limitada por cierto tiempo de los anticuerpos IgG en el intestino, la cual se reduce al cabo de unos días después del nacimiento. Langel *et al.*, (2020) identificaron correlación con los niveles de anticuerpos en suero de la cerda con los secretados en calostro y leche, y con los anticuerpos séricos en lechones; situación similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio, al concordar los niveles de anticuerpos en suero y secreciones mamarias de cerdas como en suero de lechones.

Respecto a los resultados de las inmunoglobulinas IgG e IgA evaluadas en secreciones mamarias en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Esto contrasta con los estudios de Joshi *et al.*, (2018) y Jung *et al.*, (2020) donde sus grupos de cerdas inmunizadas si presentaron niveles más altos a diferencia del grupo control, el cual presentó pocos o nulos niveles, esta diferencia es aceptable ya que nuestro control no fue un grupo control negativo dado que presentaba una infección natural.

De acuerdo con el comportamiento de la fase 2 en la lactogénesis en sus diferentes fases, la composición de anticuerpos varia, posterior al parto comienza su fase calostrada caracterizada por una mayor concentración de IgG, continua la ascendente de 24 a 48 h después del parto y se caracteriza por el cambio de calostro a leche en donde la IgA se encuentra en mayor proporción; así mismo, la cantidad de inmunoglobulinas secretadas permanecen por 6 horas post parto y disminuyen entre un 30% a 45% a las 12 horas y continúan disminuyendo en los próximos días (Theil y Hurley, 2016; Poonsuk y Zimmerman, 2018). Respecto a esto, en nuestro estudio se presentaron diferencias significativas en los diferentes días de lactancia o muestreo, siendo el día 0 donde se identificaron mayores niveles y estos disminuyeron gradualmente con el paso de los días. Estos resultados coinciden con diferentes estudios (Carney-Hinkle *et al.*, 2013, Srijangwad *et al.*, 2017, Joshi *et al.*,

2018 y Jung *et al.*, 2020) donde los primeros días alcanzaron su punto máximo de inmunoglobulinas y días posteriores disminuyeron. Pero discrepan de los resultados de IgA obtenidos por Langel *et al.*, (2019) donde aumentan del día 0 al día 8-14 y descienden para los días 15-22 en cerdas inoculadas en primer y segundo tercio de la gestación mientras que en el tercer tercio de la gestación es opuesto a nuestros resultados siendo menores los niveles en día 0 y aumentan hasta su mayor valor en los días 15-22. Por lo que se puede asociar que el comportamiento o la cantidad de inmunoglobulinas secretadas durante la lactancia está determinada por el momento de la inoculación durante la gestación. Según lo informado por Langel *et al.*, (2019), las vacunas maternas atenuadas por DEPV orales tienen implicaciones para el momento gestacional, por lo que la infección intestinal por DEPV en el segundo trimestre estimuló de manera óptima el eje intestino-MG-sIgA, lo que resultó en una protección inmunitaria lactogénica del 100 % en lechones lactantes (Langel *et al.*, 2019).

A pesar de que se secreten anticuerpos en calostro y leche eso no indica que sean capaces de neutralizar al virus y proteger al lechón por un largo periodo de hasta 6 meses (Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól, 2021). Nuestros resultados indicaron que los anticuerpos neutralizantes presentes en el inóculo directo fueron significativamente mayores que los identificados en los grupos inoculados por Feedback y control. Comparado con otros estudios en ratones inmunizados demostraron que, si hay diferencia entre los diferentes inóculos, mostrando una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes en los grupos inoculados con virus inactivado comparado con el grupo control (Wang *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021). En los estudios de Krishna *et al.*, (2020) y Langel *et al.*, (2020), los grupos infectados mostraron anticuerpos neutralizantes mayores en comparación a grupos no infectados sin tratamiento previo, y de acuerdo con Turlewicz-Podbielska y Pomorska-Mól (2021) incluso comparando una inmunización con cepas patógenas y atenuadas, aquellas inmunizadas con cepa patógena presentaron mayor protección.

Por último, en nuestro estudio la citocina IL-12 en suero de hembras no mostró diferencia significativa entre los tratamientos, no obstante, se identificó diferencia entre los muestreos, ya que en el muestreo 13 días post-inoculación resultó diferente estadísticamente, siendo mayor con respecto al muestreo 97 días post-inoculación. Considerando que en algunos estudios su punto máximo se consiguió después de la infección o inoculación, y esto debido a que se lleva a cabo una infección aguda en el epitelio intestinal y un mayor daño en el tejido que lleva al aumento de respuesta de citocinas como IL-12, una citocina proinflamatoria esencial para la activación de células NK, T citotóxicas y diferenciación de células T que permiten eliminar células infectadas (Jung *et al.*, 2020; Langel *et al.*, 2019). Así mismo, la evaluación de la IL-22 en suero de hembras tampoco nos arrojó diferencias significativas entre los tratamientos o muestreos. Resultados similares a los obtenidos por Langel *et al.*, (2019) en donde sus diferentes medidas en el tiempo tampoco presentaron diferencias significativas, a pesar de las diferencias por trimestre de gestación. De igual manera que Xue, *et al.*, (2017) que utilizaron cultivo celular epitelial de intestino porcino J2 (IPEC-J2) infectado con diversos coronavirus, entre ellos PEDV cepa CV777 y posteriormente estimularon con pIL-22 recombinante madura (mpIL-22), tampoco su estudio mostró diferencias en el nivel de IL-22 con el tiempo en un periodo de 6-48 hrs con excepción de 12 y 36 donde fueron ligeramente menor. Incluso encontraron que mpIL-22 fue capaz de inhibir la infección viral, donde a mayor concentración la infección disminuía y aumentaba otras citocinas. La IL-22 podría ser clave en el control de la enfermedad debido a su función en contra de infecciones y el mantenimiento de la integridad en la mucosa, pero es muy poco el conocimiento que se ha obtenido hasta ahora.

Es fundamental para el control de la DEP, generar una protección pasiva a través de la estimulación de la inmunidad lactogénica, sin embargo, diversos factores pueden influir en la cantidad y calidad de anticuerpos secretados como: etapa de gestación, edad de la cerda (paridad), hormonas, condición corporal, momento y vía de inoculación. Ante la poca eficiencia de las vacunas disponibles se ha utilizado el feedback, pero esta estrategia debe ser reemplazada por una inmunización oral con

vacunas activas que solo contengan al DEPV, que sean inmunogénicas sobre todo a nivel del intestino y más importante que no disemine otras enfermedades generando más pérdidas productivas y económicas.

## **8. CONCLUSIÓN**

En este estudio: 1) no se observó diferencia en la presencia de inmunoglobulinas séricas en hembras pie de cría y en sus lechones, así como en el calostro y la leche al administrar feedback o un inóculo directo; 2) sin embargo, si se genera una diferencia conforme transcurre la lactancia, las inmunoglobulinas disminuyen tanto para la hembra como para lechón; 3) los títulos de anticuerpos neutralizantes más altos en calostro y leche se obtuvieron al administrar inóculo directo, mientras que administrar feedback o una infección natural generan títulos similares; 4) no se identificaron diferencias en la detección de IL-12 o IL-22 entre los diferentes tratamientos, pero si entre los diferentes tiempos post inoculación para el caso de IL-12.

## 9. REFERENCIAS

1. Alluwaimi AM, Alshubaith IH, Al-Ali AM, Abohelaika S. The Coronaviruses of Animals and Birds: Their Zoonosis, Vaccines, and Models for SARS-CoV and SARS-CoV2. *Front Vet Sci.* 2020; 7:582287. doi:10.3389/fvets.2020.582287
2. Barranco I, Gómez-Laguna J, Rodríguez-Gómez IM, et al. Immunohistochemical expression of IL-12, IL-10, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in lymphoid organs of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;149(3-4):262-271. doi:10.1016/j.vetimm.2012.07.011
3. Becerra J. Estandarización de la Técnica de ELISA indirecta para el diagnóstico del virus de la Diarrea Epidémica Porcina usando como antígenos el virus completo o mimótopos obtenidos mediante la técnica de Despliegue de Fagos [tesis de maestría] Ciudad de México (Mx): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; 2019
4. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. IL-12 Family Cytokines: General Characteristics, Pathogenic Microorganisms, Receptors, and Signalling Pathways. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2016;63(1):1-25. doi:10.1556/030.63.2016.1.1
5. Bjustrom-Kraft J, Woodard K, Giménez-Lirola L, Setness B, Ji J, Lasley P, Nelson E, Zhang J, Baum D, Gauger P, Main R, Zimmerman J. Serum and mammary secretion antibody responses in porcine epidemic diarrhea-immune gilts following porcine epidemic diarrhea vaccination. *J Swine Health Prod.* 2018;26(1):34–40. <https://www.aasv.org/shap/issues/v26n1/v26n1p34.html>
6. Bolaños D, Trujillo-Ortega M, Hernández E, Beltrán R. El Virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDV). *Los Porcicultores y su entorno.* 2016 No. 114: 8-20 ISSN 2395-8545

7. Carney-Hinkle EE, Tran H, Bundy JW, Moreno R, Miller PS, Burkey TE. Effect of dam parity on litter performance, transfer of passive immunity, and progeny microbial ecology. *J Anim Sci.* 2013; 91(6):2885-2893. doi:10.2527/jas.2011-4874
8. Clement T, Singrey A, Lawson S, Okda F, Nelson J, Diel D, Nelson E, Christopher-Hennings J. Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback. *J Swine Health Prod.* 2016; 24(3):147–153. <https://www.aasv.org/shap/issues/v24n3/v24n3p147.pdf>
9. Du J, Luo J, Yu J, et al. Manipulation of Intestinal Antiviral Innate Immunity and Immune Evasion Strategies of Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Biomed Res Int.* 2019; 2019:1862531. doi:10.1155/2019/1862531
10. Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J Gen Virol.* 1994; 75 (Pt 5):1195-1200. doi:10.1099/0022-1317-75-5-1195
11. Fraile L.J. Inmunidad lactogénica en la cerda: Enfoque práctico. Zaragoza (España): Servet - Grupo Asís Biomedica; 2018.
12. Gong L, Lin Y, Qin J, Li Q, Xue C, Cao Y. Neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus block virus attachment and internalization. *Virol J.* 2018;15(1):133. doi:10.1186/s12985-018-1042-3
13. Hernández E. Estandarización de la técnica de RT-PCR Para el Diagnostico del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina y su Evaluación en Muestras Clínicas Obtenidas en un Brote de Diarrea en una Granja Porcina de Ciclo Completo [tesis de licenciatura]. Ciudad de México (Mx): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; 2016.
14. Higgins, J.J. Introduction to Modern Nonparametric Statistics, Pacific Grove, CA: Brooks/Cole, Thomson Learning. 2004.
15. Hill C, Raizman E, Snider T, Goyal S, Torremorell M, Perez A. Emergence of porcine epidemic diarrhoea in North America. *FOCUS ON*, No. 9, July 2014. Rome. Original source: FAO report. [www.fao.org/3/a-i3967e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i3967e.pdf).

16. Joshi LR, Okda FA, Singrey A, et al. Passive immunity to porcine epidemic diarrhea virus following immunization of pregnant gilts with a recombinant orf virus vector expressing the spike protein. *Arch Virol.* 2018; 163(9):2327-2335. doi:10.1007/s00705-018-3855-1
17. Jung K, Saif LJ, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Res.* 2020; 286:198045. doi:10.1016/j.virusres.2020.198045
18. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J.* 2015; 204(2):134-143. doi:10.1016/j.tvjl.2015.02.017
19. Keir M, Yi Y, Lu T, Ghilardi N. The role of IL-22 in intestinal health and disease. *J Exp Med.* 2020; 217(3): e20192195. doi:10.1084/jem.20192195
20. Khamassi Khbou M, Daaloul Jedidi M, Bouaicha Zaafouri F, Benzarti M. Coronaviruses in farm animals: Epidemiology and public health implications. *Vet Med Sci.* 2021; 7(2):322-347. doi:10.1002/vms3.359
21. Kim J, Yoon J, Park JE. Construction of Porcine Epidemic Diarrhea Virus-Like Particles and Its Immunogenicity in Mice. *Vaccines (Basel).* 2021;9(4):370. doi:10.3390/vaccines9040370
22. Koonpaew S, Teeravechyan S, Frantz PN, Chailangkarn T, Jongkaewwattana A. PEDV and PDCoV Pathogenesis: The Interplay Between Host Innate Immune Responses and Porcine Enteric Coronaviruses. *Front Vet Sci.* 2019; 6:34. doi:10.3389/fvets.2019.00034
23. Kramer CY. Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications. *Biometrics* 1956; 12: 307-310.
24. Krishna VD, Kim Y, Yang M, et al. Immune responses to porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in swine and protection against subsequent infection. *PLoS One.* 2020;15(4): e0231723. Published 2020 Apr 28. doi: 10.1371/journal.pone.0231723
25. Langel SN, Paim FC, Alhamo MA, et al. Stage of Gestation at Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection of Pregnant Swine Impacts Maternal

Immunity and Lactogenic Immune Protection of Neonatal Suckling Piglets. *Front Immunol.* 2019; 10:727. doi:10.3389/fimmu.2019.00727

26. Langel SN, Paim FC, Lager KM, Vlasova AN, Saif LJ. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Res.* 2016; 226:93-107. doi:10.1016/j.virusres.2016.05.016
27. Langel SN, Wang Q, Vlasova AN, Saif LJ. Host Factors Affecting Generation of Immunity Against Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Pregnant and Lactating Swine and Passive Protection of Neonates. *Pathogens.* 2020; 9(2):130. doi:10.3390/pathogens9020130
28. Lara-Romero R, Gómez-Núñez L, Cerriteño-Sánchez JL, et al. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013-2016. *Virus Genes.* 2018; 54(2):215-224. doi:10.1007/s11262-017-1528-x
29. Lv C, Xiao Y, Li X, tian K. Porcine epidemic diarrhea virus: current insights. *Virus Adaptation and Treatment.* 2016; 8:1-12 <https://doi.org/10.2147/VAAT.S107275>
30. Mora-Díaz JC, Piñeyro PE, Houston E, Zimmerman J, Giménez-Lirola LG. Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus: A Review. *Front Vet Sci.* 2019; 6:53. doi:10.3389/fvets.2019.00053
31. Morilla A, Estrada A, Gastroenteritis transmisible de los cerdos. *Ciencia Vet.* 1981. <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c01.pdf>
32. MSD SALUD ANIMAL. Ficha técnica de MSD vacuna contra la diarrea epidémica porcina, 2022 (Online) Ciudad de México. [https://www.msd-salud-animal.mx/productos/ped-rp-diarrea-epidemica/#:~:text=Vacuna%20recombinante%20RNA%20producida%20en,part%C3%ADculas%20de%20replic%C3%B3n%20\(PR\).](https://www.msd-salud-animal.mx/productos/ped-rp-diarrea-epidemica/#:~:text=Vacuna%20recombinante%20RNA%20producida%20en,part%C3%ADculas%20de%20replic%C3%B3n%20(PR).)
33. OIE. Ficha técnica de la OIE; infección por el virus de la diarrea epidémica porcina.2014 (Online) <https://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF>

34. Park E, Cho M, Ki CS. Correct use of repeated measures analysis of variance. *Korean Journal of Laboratory Medicine*. 2009. 29(1): 1–9. 10.3343/kjlm.2009.29.1.1.
35. Pérez-Rivera C, Ramírez-Mendoza H, Mendoza-Elvira S, Segura-Velázquez R, Sánchez-Betancourt JI. First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2019; 66(4):1436-1441. doi:10.1111/tbed.13193
36. Piñeros R, Mogollón Galvis JD. Coronavirus en porcinos: importancia y presentación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en Colombia. *Rev Med Vet*. 2015; (29):73-89. doi: 10.19052/mv.3448
37. Poonsuk K, Zhang J, Chen Q, et al. Quantifying the effect of lactogenic antibody on porcine epidemic diarrhea virus infection in neonatal piglets. *Vet Microbiol*. 2016; 197:83-92. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.002
38. Poonsuk K, Zimmerman J. Historical and contemporary aspects of maternal immunity in swine. *Anim Health Res Rev*. 2018;19(1):31-45. doi:10.1017/S1466252317000123
39. Poudel U, Subedi D, Pantha S, Dhakal S. Animal coronaviruses and coronavirus disease 2019: Lesson for One Health approach. *Open Vet J*. 2020; 10(3):239-251. doi:10.4314/ovj.v10i3.1
40. Rodríguez E, Barrera M, Betancourt A. Gastroenteritis Transmisible del Cerdo: un reto de la industria porcina REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. VI, núm. 7, julio, 2005, pp. 1-11; <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612652003.pdf>
41. Srijangwad A, Stott CJ, Temeeyasen G, et al. Immune response of gilts to single and double infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Arch Virol*. 2017;162(7):2029-2034. doi:10.1007/s00705-017-3307-3
42. Suzuki T, Shibahara T, Yamaguchi R, et al. Pig epidemic diarrhoea virus S gene variant with a large deletion non-lethal to colostrum-deprived newborn piglets. *J Gen Virol*. 2016;97(8):1823-1828. doi:10.1099/jgv.0.000513

43. Theil PK, Hurley WL. The Protein Component of Sow Colostrum and Milk. I Gigli I, red., Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects. InTechOpen. 2016. s. 183-198 <https://doi.org/10.5772/62841>
44. Tizard I., Inmunología Veterinaria. 10th edición. Barcelona (España): Elsevier España; 2018.
45. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(2):133-146. doi:10.1038/nri1001
46. Turlewicz-Podbielska H, Pomorska-Mól M. Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Virol Sin.* 2021; 1-19. doi:10.1007/s12250-021-00364-0
47. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13(8):722-728. doi:10.1038/ni.2366
48. Wang Q, Vlasova AN, Kenney SP, Saif LJ. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Curr Opin Virol.* 2019; 34:39-49. doi:10.1016/j.coviro.2018.12.001
49. Xue M, Zhao J, Ying L, et al. IL-22 suppresses the infection of porcine enteric coronaviruses and rotavirus by activating STAT3 signal pathway. *Antiviral Res.* 2017; 142:68-75. doi:10.1016/j.antiviral.2017.03.006
50. Yang YL, Yu JQ, Huang YW. Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery. *Virus Res.* 2020; 285:198024. doi:10.1016/j.virusres.2020.198024
51. Zoetis, Ficha técnica vacuna contra la diarrea epidémica porcina virus inactivo. 2022 (Online). <https://www.zoetis.mx/products/porcino/pedv.aspx>.