



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**“Estudio comparativo de métodos combinados de
inmunización, para obtener anticuerpos en las
mucosas, en un modelo porcino”**

TESIS

Que presenta

MARYFER ROMERO PÉREZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dr. Marco Antonio Vega López

Ciudad de México

2021

Índice General

| | Página |
|--|--------|
| Índice de figuras | i |
| Índice de tablas | ii |
| Abreviaturas | iii |
| Resumen | v |
| Summary | vi |
| Introducción | 1 |
| Importancia de las mucosas | 1 |
| Estructura de las mucosas | 1 |
| Anticuerpos en las mucosas | 2 |
| Inducción y transporte de anticuerpos en las mucosas | 4 |
| Inmunización mucosal | 7 |
| Antecedentes | 10 |
| El cerdo como modelo de estudio y de importancia económica | 12 |
| Justificación | 13 |
| Hipótesis | 13 |
| Objetivo general | 13 |
| Objetivos específicos | 13 |
| Metodología | 15 |
| Animales y esquemas de inmunización | 15 |
| Toma de muestras | 16 |
| Detección de anticuerpos | 16 |
| Análisis estadístico | 19 |
| Resultados | 19 |
| Comparación entre métodos | 19 |
| Suero | 19 |
| Moco nasal | 21 |
| Saliva | 22 |

| | |
|--|----|
| Fluido vaginal | 24 |
| Cinética de producción | 26 |
| Suero | 26 |
| Moco nasal | 27 |
| Saliva | 29 |
| Fluido vaginal | 31 |
| Isotipos predominantes en cada protocolo | 32 |
| Suero | 33 |
| Moco nasal | 34 |
| Saliva | 36 |
| Fluido vaginal | 38 |
| Discusión | 39 |
| Comparación entre protocolos de inmunización | 40 |
| Cinética de producción | 44 |
| Isotipos predominantes en cada protocolo | 49 |
| Conclusiones | 52 |
| Bibliografía | 54 |

Índice de figuras

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Tipos de mucosas | 2 |
| Figura 2. Transporte bidireccional de IgG mediado por FcRn en mucosas | 5 |
| Figura 3. Transporte de inmunoglobulinas poliméricas en mucosas | 7 |
| Figura 4. Diseño experimental | 15 |
| Figura 5. Organización de las placas de ELISA para la detección de anticuerpos por la técnica de ELISA indirecta cuantitativa | 17 |
| Figura 6. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en suero porcino | 20 |
| Figura 7. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en moco nasal porcino | 22 |
| Figura 8. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en saliva porcina | 24 |
| Figura 9. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en fluido vaginal porcino | 25 |
| Figura 10. Cinética de producción. Abs α -OVA en suero porcino | 27 |
| Figura 11. Cinética de producción. Abs α -OVA en moco nasal porcino | 29 |
| Figura 12. Cinética de producción. Abs α -OVA en saliva porcina | 30 |
| Figura 13. Cinética de producción. Abs α -OVA en fluido vaginal porcino | 32 |
| Figura 14. Isotipos predominantes. Abs α -OVA en suero porcino | 34 |
| Figura 15. Isotipos predominantes. Abs α -OVA en moco nasal porcino | 36 |
| Figura 16. Isotipos predominantes. Abs α -OVA en saliva porcina | 37 |
| Figura 17. Isotipos predominantes. Abs α -OVA en fluido vaginal porcino | 39 |

Índice de Tablas

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Concentración de inmunoglobulinas en secreciones humanas | 3 |
| Tabla2. Diluciones de las muestras para ELISA | 18 |

Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| Abs | — Anticuerpos |
| Ags | — Antígenos |
| APC | — Células presentadoras de antígenos |
| APRIL | — Ligando inductor de proliferación |
| ASC | — Células secretoras de anticuerpos |
| BAFF | — Factor activador de células B |
| BSA | — Albúmina sérica bovina |
| CICUAL | — Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio |
| CFA | — Adyuvante completo de Freud |
| CRS | — Recombinación de cambio de clase |
| CS | — Componente secretor |
| FAE | — Epitelio asociado a folículos |
| FcRn | — Receptor Fc neonatal |
| IFA | — Adyuvante incompleto de Freud |
| IN | — Intranasal |
| Ivag | — Intravaginal |
| LP | — Lámina propia |
| M | — Mucosal |
| MALT | — Tejido linfoide asociado a la mucosa |
| OVA | — Ovoalbúmina |
| PBS-T | — PBS-Tween |
| pIg | — Ig polimérica |
| pIgR | — Receptor de pIg |
| SC | — Subcutáneo |
| SIgA | — IgA secretora |
| SIgM | — IgM secretora |
| SISIP | — Sistema Inmune Secretor de Inmunoglobulinas Poliméricas |
| SL | — Sublingual |

| | |
|----------------------|---|
| TA | — Temperatura ambiente |
| T _H | — Linfocito T cooperador |
| T _{FH} | — Linfocito folicular cooperador |
| UPEAL Laboratorio | — Unidad de Producción y Experimentación de Animales del Laboratorio |
| VEA | — Virus de la enfermedad de Aujeszky |

RESUMEN

Más del 70% de los agentes infecciosos utilizan las mucosas como puerta de entrada al organismo, por lo que la protección inmunológica adecuada de estos tejidos es importante para prevenir infecciones. Actualmente, la mayoría de las vacunas se administran por vía parenteral, produciendo una buena respuesta sistémica pero pobre o nula en las mucosas. Las vacunas mucosales, para lograr la respuesta inmunitaria y romper la tolerancia que frecuentemente producen, requieren del uso de adyuvantes tóxicos, repetidas inmunizaciones y altas dosis de antígeno. Nuestro laboratorio ha desarrollado un protocolo combinado de inmunización (subcutáneo/intranasal -SC/IN-), en un modelo porcino traslacional al humano, capaz de inducir una respuesta inmune sistémica y mucosal (integral), sin recurrir a esos extremos.

A efecto de optimizar la respuesta inmunitaria integral, en este trabajo se compararon tres protocolos combinados de inmunización (SC/IN, SC/sublingual -SL- y SC/intravaginal -lvag-), en su capacidad de producir anticuerpos séricos y mucosales (saliva, moco nasal y vaginal), determinando su eficacia, cinética de aparición de la respuesta y el isotipo predominante en cada mucosa, encontrando comportamientos distintos de acuerdo con la mucosa inmunizada.

Respecto al suero, observamos que la respuesta fue superior con las inmunizaciones SC/SL y SC/lvag. En cambio, la respuesta mucosal de tipo IgA fue mejor con el protocolo SC/IN. También observamos patrones diferentes de respuesta anamnésica entre los diferentes protocolos, siendo más prolongada por la ruta SC/IN, mientras que la inmunización SC/lvag favoreció la respuesta local de IgG. Estos resultados confirman la compartimentalización de la respuesta mucosal y señalan la importancia de conocer sus detalles para la administración exitosa de vacunas mucosales polivalentes, además en estado de alerta como la situación actual a nivel global, la pandemia por COVID-19, el conocimiento de diversas estrategias que pueden frenar la transmisión de patógenos y proteger la mayor cantidad de población posible es de gran valor.

Summary

More than 70% of pathogens enter our bodies by mucosas, that's why suitable immune protection in these tissues is important to prevent infections. Currently, the majority of vaccines are parenteral injections and they produce a good systemic response but poorly or null response in mucosas. The mucosal vaccines to knock out the tolerance and produce an immune response usually use toxic adjuvants, repeated immunizations, and high doses of the antigens. Our laboratory developed a combined protocol (subcutaneous/intranasal -SC/IN-), in a porcine model which is translational to human, capable of inducing a systemic and mucosal response (integral), without recourse to that extremes.

To optimize the integral immune response, in this study we compared three combined protocols (SC/IN, SC/sublingual -SL- and SC/lvag -lvag-), in their capacity of producing seric and mucosal antibodies (saliva, nasal mucus, and vaginal fluid), determining their efficacy, apparition kinetic of the response and the predominant isotype in every mucosa, finding distinct behavior in accordance of the immunized mucosa.

In serum, we observed that the response was high with the SC/SL and SC/lvag protocols. However, the IgA mucosal response was better with the SC/IN protocol. Also, we observed different patrons of the anamnestic response between the different protocols, being more lasted by the routes SC/IN, while the SC/lvag immunization favors the local IgG response.

These results confirm the compartmentalization of the mucosal response and point out the importance of understanding their details for the success in administrating polyvalent vaccines, besides in emergency alerts likes the actual global situation, the pandemic of COVID-19, the knowledge of diverse strategies that can stop the transmission of the pathogens and protect the majority of the population is of great value.

INTRODUCCIÓN

Importancia de las mucosas

Las mucosas son un tejido de revestimiento que se localiza en el tracto digestivo, respiratorio y urogenital. Las superficies mucosales tienen la mayor área de contacto con el exterior y es, a través de ellas, que se mantiene comunicación con el medio y son la vía de entrada principal tanto de agentes infecciosos como ambientales; es por ello que existe una dinámica constante entre tolerancia y defensa, coordinada por el sistema inmune mucosal, que permite establecer un ambiente idóneo para la realización de funciones como absorción de nutrientes, intercambio gaseoso y reproducción y al mismo tiempo evitar la infección por patógenos (Brandtzaeg, 2009).

Estructura de las mucosas

Las mucosas están conformadas por epitelio y lámina propia (LP), donde, además de tejido conectivo se encuentran células inmunes organizadas que reaccionan ante las condiciones del ambiente. La organización celular es específica de acuerdo con el tipo de mucosa (Figura 1). Las mucosas de tipo I, como la de intestinos, pulmones, nariz, endocérvix y útero, tienen un epitelio simple y en su LP se forman folículos linfoides llamados MALT (tejido linfóide asociado a la mucosa), los cuales son núcleos de células B (centro germinal), rodeados por células T, macrófagos, células dendríticas y plasmáticas. Por otro lado, las mucosas de tipo II, presentes en boca, esófago, globo ocular, ectocérvix y vagina, se componen de un epitelio estratificado no queratinizado y sin MALT (Woodrow *et al.*, 2012).

El epitelio por encima de los folículos o epitelio asociado a folículos (FAE), se caracteriza por la presencia de células M, éstas transportan los antígenos (Ags) desde el lumen a la LP, donde son tomados y procesados por las células presentadoras de antígeno (APC) para transportarlos hasta los folículos donde son reconocidos por los linfocitos, con lo cual ocurre la activación o *priming* (Holmgren & Czerkinsky, 2005). Debido a que las mucosas de tipo II carecen de MALT, el *priming* se realiza en los ganglios linfáticos regionales.

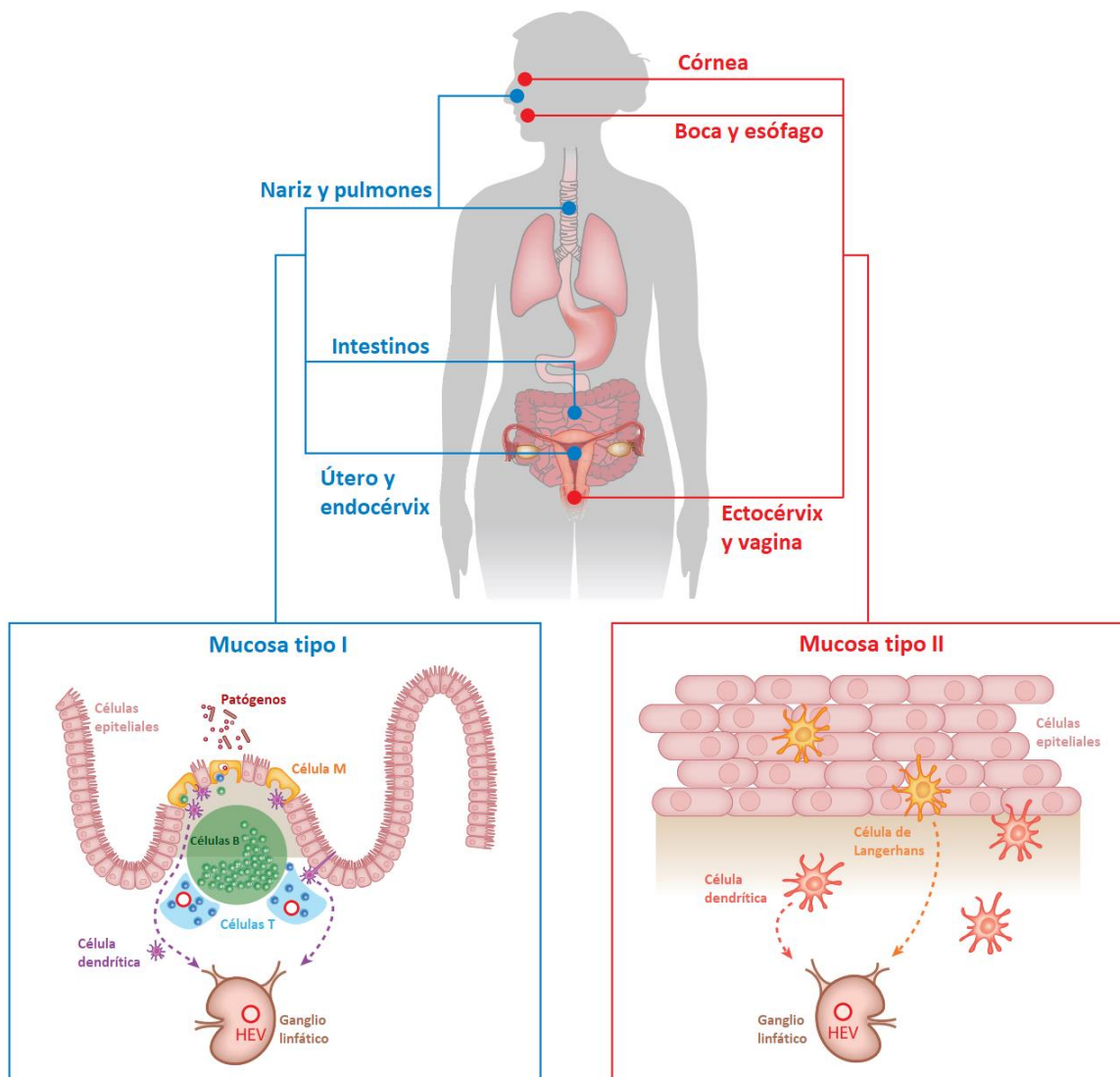


Figura 1. Tipos de mucosas. Las mucosas se clasifican en dos tipos de acuerdo con su localización y organización celular: Tipo I (en azul) y tipo II (en rojo). Modificado de Woodrow *et al.*, 2012.

Anticuerpos en las mucosas

La secreción de anticuerpos (Abs) forma parte de los mecanismos de defensa en las mucosas, es una respuesta de memoria, por lo que es útil en futuras infecciones. Los isotipos presentes en las mucosas son la IgA, IgG e IgM, el porcentaje de cada una de ellas varía según la especie y el compartimento (Tabla 1), lo cual refleja diferentes mecanismos de transporte y origen de las inmunoglobulinas (Woof & Mestecky *et al.*, 2015).

| Tabla 1. Concentración de inmunoglobulinas en secreciones humanas | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|
| Fluido | IgA µg/mL | IgG µg/mL | IgM µg/mL |
| Suero | 500—3500 | 7000—12,000 | 500—1500 |
| Lágrimas | 80—400 | 0-16 | 0—18 |
| Saliva | 15—319 | 0.4—5 | 0.4 |
| Calostro y leche | 470—12,340 | 40—168 | 50—610 |
| Fluido intestinal | 166 | 4 | 8 |
| Orina | 0.1—1 | 0.06—0.6 | Sin dato |
| Semen | 12—23 | 16—33 | 0—8 |
| Fluido vaginal | 3—333 | 1—285 | 5—118 |

Mucosal immunology 4ªEdición Pg 288. (2015, Elsevier)

La IgA es la inmunoglobulina más estudiada en mucosas y su principal función es la exclusión inmune. La exclusión inmune es un mecanismo no inflamatorio que impide la entrada de microorganismos y toxinas al organismo debido a la neutralización en el lumen por parte de IgA, además puede expulsar antígenos atrapados en la LP e intracelulares durante su secreción a las mucosas (Strugnell & Wijburg, 2010), todo ello sin producir inflamación.

La función de la IgG es neutralizar las bacterias extracelulares y virus, este isotipo se considera como la segunda línea de defensa y promueve una respuesta inflamatoria, también puede formar enlaces con el moco y así favorecer su unión con los patógenos (Wang *et al.*, 2014; Palomares *et al.*, 2017).

El papel de la IgM en las mucosas ha sido poco estudiado, recientemente se evaluó su capacidad de activar el complemento, observando que la IgM secretora (SIgM) puede activarlo de forma muy similar a la IgM sérica, ofreciendo protección en las mucosas (Michaelsen *et al.*, 2017). Además, la SIgM realiza funciones similares a

la SIgA, ya que, en individuos deficientes de IgA los niveles de IgM aumentan, por lo que se habla de un papel compensatorio (Catanzaro *et al.*, 2019).

Inducción y transporte de anticuerpos en las mucosas

Cuando los mecanismos innatos de defensa (inmunidad innata) son superados, el organismo hace uso de los mecanismos adaptativos, uno de ellos es la producción de anticuerpos para el control y eliminación de infecciones. La generación de la respuesta humoral en mucosas comprende a los sitios inductores y efectores de las mismas (Holmgren & Czerkinsky, 2005). Generalmente los sitios inductores de las mucosas son el MALT, allí se realiza el *priming* de los linfocitos B, dependiente de células T. En primer lugar, los antígenos que se encuentren en la LP son tomados por las células M del FAE y pasados al interior a células dendríticas y APC para ser llevados a las zonas interfoliculares donde se encuentran células T_H para ser activadas. Una vez activadas las células T, éstas propician un ambiente favorable para la activación de las células B inexpertas (*naive*). Las células B activadas por el Ag entran al centro germinal por quimioatracción y sufren un proceso de proliferación e hipermutación, donde se seleccionan únicamente las clonas con alta afinidad al antígeno. Los linfocitos B activados, pueden presentar el Ag a los linfocitos T_{FH} (foliculares cooperadores) con cuya ayuda ocurre una recombinación en los genes de clase (CSR) y por lo tanto se determina el isotipo de inmunoglobulina que producirán las células B diferenciadas (Brandtzaeg, 2009).

Después de la CSR los plasmoblastos y células de memoria, salen del centro germinal y la mayoría migra al sitio efector regional, también pueden entrar a circulación y llegar a sitios efectores distales por medio de la extravasación controlada por el reconocimiento de adhesinas, integrinas y quimiocinas (ecotaxia). Una vez que las células llegan a su sitio efector terminan de diferenciarse, es decir, los plasmoblastos se convierten en células plasmáticas y pueden empezar a producir anticuerpos que serán liberados en la LP (Holmgren & Czerkinsky, 2005).

Un mecanismo por el cual la IgG llega a secreciones mucosales es la trasudación directa desde circulación, también puede ser secretada por células plasmáticas *in*

situ y atravesar el epitelio mediante un receptor; la IgG entra a las células epiteliales por pinocitosis, forma endosomas y dentro de ellos se une al receptor Fc neonatal (FcRn) en un ambiente ácido, este endosoma puede degradarse o atravesar la célula hasta la superficie apical y libera la IgG en las secreciones debido a un cambio en el pH (Figura 2) (Li *et al.*, 2011).

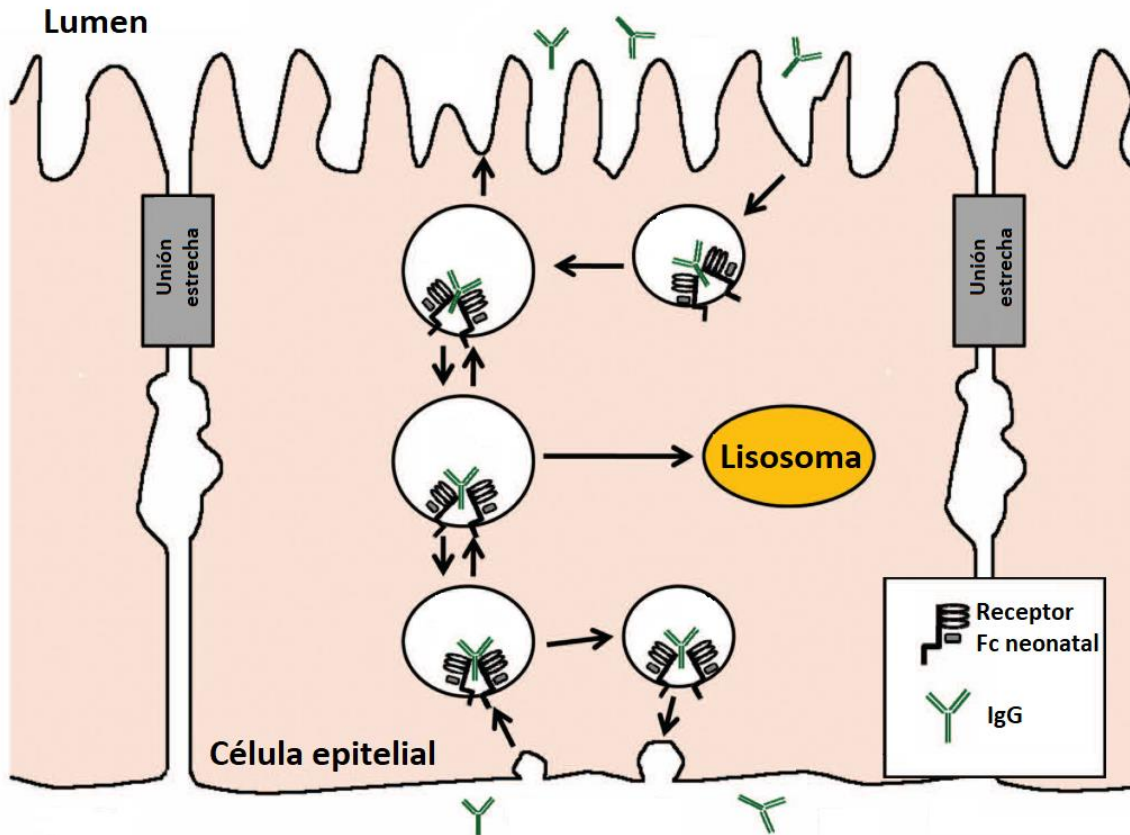


Figura 2. Transporte bidireccional de IgG mediado por FcRn en mucosas. Modificado de Kuo & Aveson, 2011.

Por otra parte, en el transporte de la IgA e IgM, la cadena J es indispensable. Este péptido, descubierto en 1970 por Halpern & Koshland, permite la polimerización de inmunoglobulinas dentro de las células plasmáticas, ya que forma un enlace covalente con la cadena pesada, dando lugar a dímeros y tetrámeros de IgA y pentámeros de IgM, llamados Ig poliméricas (plg) (Krugmann *et al.*, 1997). A la fecha no se ha reportado la trasudación de plgs, su transporte requiere de su

producción *in situ* y liberación en la LP, donde se reconoce la cadena J por parte del receptor de plg (plgR), que es una glicoproteína transmembranal de 5 dominios Ig, ubicada en la cara basolateral de las células epiteliales; posteriormente, el plgR, junto con la plg son endocitados y, por un transporte intracelular mediado por clatrininas (transcitosis), son llevados a la superficie apical para la liberación en las mucosas (Figura 3) (Brandtzaeg, 1985). A finales de los 90's se observó que al liberarse la plg, ésta va acompañada de una porción del receptor llamado ahora componente secretor (CS), es así como las IgA e IgM poliméricas, que se encuentran en las mucosas junto con el CS, son conocidas como SIgA y SIgM (Norderhaug *et al.*, 1999). Recientemente nuestro laboratorio ha propuesto el termino SISIP (sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas) para referirse a los componentes que permiten el transporte de la SIgA y SIgM del interior del organismo hacia la superficie de las mucosas (Guzmán-Bautista *et al.*, 2015).

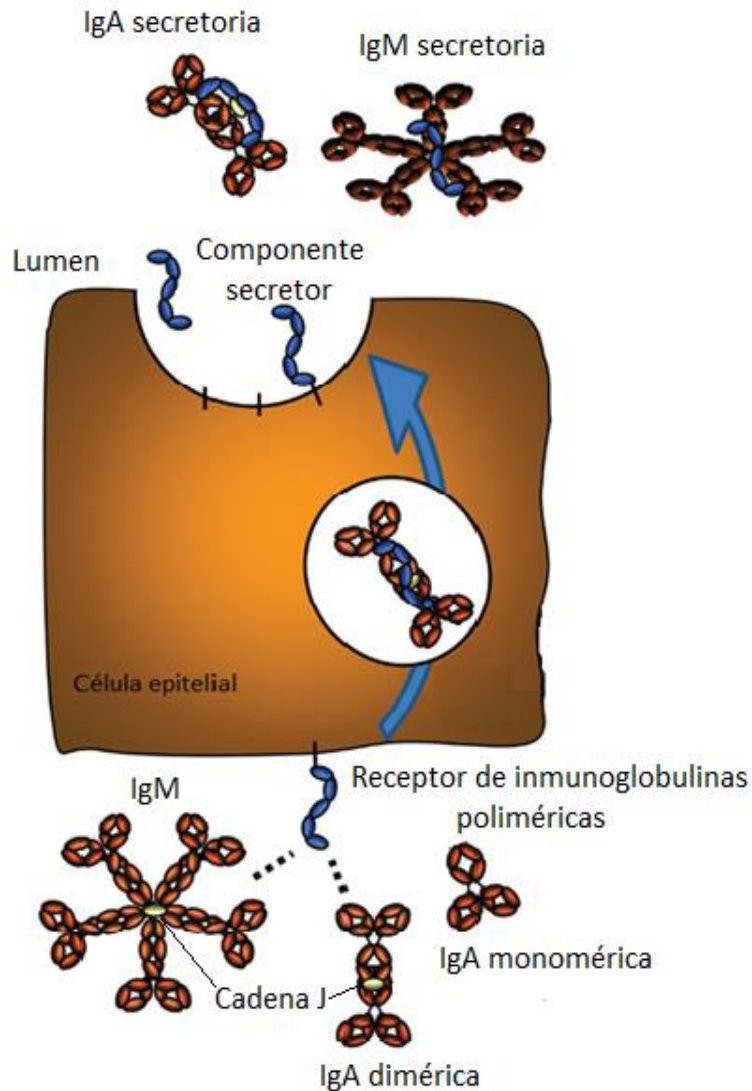


Figura 3. Transporte de inmunoglobulinas poliméricas en mucosas. Modificado de Horton & Vidarsson, 2013.

Inmunización mucosal

Como ya se mencionó, las mucosas son generalmente los primeros tejidos en ser infectados ya que se estima que el 70% de microorganismos entran por vía oral, respiratoria y genital (Woodrow *et al.*, 2012). Aprovechando la capacidad de las mucosas de producir respuesta inmune y de memoria, y de la pobre respuesta en mucosas generada por vacunas parenterales (Li *et al.*, 2020), recientemente se ha trabajado en el diseño de vacunas administradas por diferentes mucosas con el fin

de obtener protección local y sistémica que defienda al organismo contra diversas infecciones (Anjuère *et al.*, 2012). Además, la inmunización mucosal tiene la ventaja de reducir el riesgo de infecciones cruzadas, no requiere de dispositivos especiales ni estériles, no necesita personal especializado para administrarla, su presentación farmacéutica sería más estable y al no ser invasiva ni dolorosa, tendría mejor aceptación entre la población puntos que son determinantes frente a situaciones de emergencia como la pandemia de COVID-19 donde actualmente el diseño de vacunas tiene en su mayoría un enfoque parenteral que buscan prevenir las complicaciones una vez el patógeno ya entro al organismo más no evitar ni reducir los contagios (Mudgal *et al.*, 2020).

La elección de la mucosa a inmunizar requiere considerar factores como especie, tamaño, permeabilidad, accesibilidad y capacidad de montar respuesta local y distante ya que, a pesar de la similitud entre la estructura de las mucosas, existe evidencia de una compartimentalización dentro de ellas. Es decir, la respuesta inmune que observamos está relacionada con patrones de migración de las células activadas de acuerdo con el sitio inductor (Czerkinsky & Holmgren, 2012). La migración selectiva de los linfocitos (ecotaxia) se rige por receptores localizados en la célula (integrinas), el endotelio (selectinas) y quimiocinas secretadas por el epitelio en los diferentes tejidos efectores. Con lo cual, la compartimentalización limita la selección de vías de inmunización ya que la circulación de linfocitos mucosos obedece a patrones ya establecidos (Kunkel & Butcher 2003) y eso explica en parte, lo limitado de la respuesta mucosal ante la inmunización sistémica.

La mucosa intestinal ha sido la más estudiada y es la de mayor superficie del cuerpo. Para estimular la respuesta inmunitaria se recurre a la inmunización oral que debe superar el proceso de digestión, por lo que, a pesar de que la mucosa tiene una gran extensión y contar con sitios inductores (placas de Peyer), no se recomienda como mucosa de inmunización (Pavot *et al.*, 2012). Por otro lado, sabemos que la estimulación de las placas de Peyer genera una respuesta restringida a intestinos y glándula mamaria (Brandtzaeg, 2011).

La segunda mucosa más estudiada es la respiratoria, la nariz es el sitio inductor y es una cavidad de fácil acceso, presenta microvellosidades que aumentan su superficie de contacto, se encuentra cerca de ganglios linfáticos cervicales y tiene MALT, compuesto por el anillo de Waldeyer que incluye adenoides y tonsilas, por lo que captura agentes inhalados e ingeridos (Brandtzaeg *et al.*, 2011). Por lo anterior, la inmunización intranasal (IN) es empleada en muchas vacunas en desarrollo y en la vacuna comercial FluMist, contra el virus de la influenza estacional, mostrando producción de anticuerpos protectores neutralizantes, tanto en suero como en lavado nasal (Hoft *et al.*, 2017). Otros estudios, donde se ha evaluado la respuesta inducida por la vía IN en secreciones como fluido vaginal, fecal y saliva, ha mostrado resultados favorables para estimular la respuesta celular y humoral confirmando la existencia del sistema inmune mucosal común (Wu *et al.*, 2000; Gallichan *et al.*, 2001; Guerrero *et al.*, 2001).

No obstante, se ha reportado que los antígenos y adyuvantes administrados por vía IN logran alcanzar al sistema nervioso central por las terminaciones sensoriales en la nariz que llegan al cerebro, pudiendo causar inflamación y parálisis facial (Crowe *et al.*, 2018), por ello se han buscado alternativas para la inmunización IN, evitando el contacto con el sistema nervioso. Una opción es la vía sublingual (SL), que se ha empleado en la aplicación de fármacos y tratamientos desensibilizadores en alergias (Passalacqua *et al.*, 2019). El área bajo la lengua está formada por un epitelio vascularizado, estratificado, que permite la absorción del Ag a la circulación y, por proximidad, activar los linfocitos de ganglios cervicales y el anillo de Waldeyer (Kweon, 2011). Existen varios artículos donde se comparan éstas dos vías: IN y SL y se ha observado un comportamiento similar en la producción de anticuerpos tanto en suero como en moco nasal y fluido vaginal (Çuburu *et al.*, 2009; Maseda *et al.*, 2018).

Otra mucosa en estudio para ser inmunizada es la vaginal, para la protección contra infecciones de transmisión sexual que predominan en la mujer (Anjuére *et al.* 2012). Actualmente se administran fármacos para tratamientos ginecológicos por vía intravaginal (Ivag), por ejemplo, para padecimientos como la endometriosis, incontinencia urinaria, infecciones parasitarias, micóticas y virales e inducción de

parto (Alexander *et al.*, 2004). Como ya se mencionó, la mucosa vaginal no tiene MALT y tampoco se han descrito sitios inductores, sin embargo, puede montar respuesta humoral local y sistémica gracias a que la vagina drena en los ganglios inguinales (Liu *et al.*, 2017). Sin embargo, lograr una respuesta protectora en la vagina es difícil, ya que su ambiente es muy hostil y está bajo la regulación hormonal (Wira *et al.*, 2015), entre otras cosas, es por esto que en los trabajos actuales, donde se evalúa la respuesta Ivag, se emplean geles para prolongar el tiempo de vida del antígeno, vehículos como nanopartículas o vectores que aumentan la antigenicidad y estrategias que se dirigen a las células mediante la aplicación de quimiocinas (Curran *et al.*, 2009; Iwasaki *et al.*, 2010; Weggman *et al.*, 2011).

A pesar de las ventajas de la inmunización mucosal, administrar el Ag directamente en las mucosas requiere superar las barreras físicas y químicas como el moco y enzimas presentes, lo que dificulta asegurar la dosis administrada, además, se debe evitar la respuesta natural de tolerancia, por lo que, experimentalmente, se han empleado adyuvantes generalmente tóxicos y altas dosis del Ag, lo cual no es permitido en medicina humana o veterinaria (Lycke, 2012). Por lo anterior, se requieren nuevas estrategias que sean seguras y eficaces y que consigan una buena respuesta inmune tanto a nivel sistémico como local; una propuesta son los esquemas combinados de inmunización, donde se emplean varias vías para depositar el antígeno (Ogra *et al.*, 2001; Anjuère *et al.*, 2012).

Antecedentes

La inmunización combinada es una estrategia que implica el uso de varias vías y representa un reto para el diseño de protocolos, desde la elección de los sitios de aplicación, del modelo animal, el antígeno y la dosis a aplicar, hasta el establecimiento de tiempos de inmunización y refuerzos.

Nuestro grupo de investigación ha evaluado, en el modelo porcino, diferentes protocolos de inmunización combinada, parenteral y mucosal. A causa de la tolerancia que normalmente se induce en las mucosas y que dificulta la inmunización directa, se diseñaron protocolos combinados de inmunización siendo el primer estímulo sistémico (Alcón *et al.*, 2005a, 2005b, Guzmán-Bautista *et al.*,

2015; Salinas *et al.*, 2020), seguido por refuerzos mucosales, basado en la idea de generar, en primer lugar, clonas activas inducidas por vía parenteral, mismas que, en desafíos mucosales posteriores, migrarán por ecotaxia a los sitios efectores, produciendo una inmunidad sistémica y local más eficiente para proteger al organismo, evitando la reproducción y propagación de patógenos en las mucosas, previniendo la generación de “portadores sanos”.

En esos trabajos, se compararon las rutas muscular y subcutánea, observando mayor cantidad de anticuerpos específicos con la vía subcutánea (SC), tanto en suero como en moco nasal, contra antígenos modelo como la albúmina sérica bovina (BSA) y complejos como el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) (Salinas tesis, 2011; Salinas *et al.*, 2020).

Posteriormente se decidió complementar la inmunización SC con un refuerzo IN, con el fin de dirigir las clonas Ag específicas generadas hacia las vías respiratorias, las cuales son la principal mucosa afectada por infecciones agudas (DGE, 2019). En estudios preliminares, utilizando ovoalbúmina (OVA), se confirmó el papel de añadir un refuerzo IN para elevar la producción de anticuerpos en mucosas y la obtención de respuestas de memoria (Alcón *et al.*, 2005a, 2005b; Guzmán-Bautista *et al.*, 2014; Salinas *et al.*, 2020). Posteriormente, para evaluar la eficacia y valor del protocolo combinado, se empleó al VEA inactivado por calor, comparando la respuesta de un grupo inmunizado únicamente por vía parenteral y otro con un protocolo SC/IN, observándose que ambos grupos produjeron una respuesta similar de anticuerpos en suero, pero el segundo fue más eficiente en la respuesta en saliva y moco nasal. Además, cuando se desafiaron los animales con el VEA, para analizar la protección, se encontró que los órganos de animales inmunizados con el protocolo SC/IN tuvieron una cantidad significativamente menor de virus, en comparación con los órganos de animales inmunizados por vía parenteral (Salinas, tesis 2012). Adicionalmente, se observó que el protocolo SC/IN fue capaz de estimular respuestas de tipo Th₁ y Th₂ con la secreción de IFN- γ e interleucinas IL-4 y IL-10, lo que indicó su potencial contra infecciones virales (Salinas *et al.*, 2020).

También hemos evaluado la producción de Abs Ag específicos en mucosas distantes a las de estimulación, en este caso, nuestro protocolo SC/IN es relevante por la cantidad de anticuerpos inducidos en la vagina, lo que justifica la comparación de distintos protocolos combinados para mejorar la respuesta humoral en mucosas distales.

En relación con lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo fue comparar el protocolo de inmunización mucosal ya establecido (SC/IN) con los de las rutas sublingual e intravaginal, empleando al cerdo como modelo de estudio, para analizar si es posible reducir los tiempos de reacción, conocer el tipo de anticuerpos generados, así como la cobertura en otras mucosas, para el posible uso más eficiente de inmunógenos polivalentes, en la medicina pecuaria y humana.

El cerdo como modelo de estudio y de importancia económica

El cerdo posee similitudes importantes con el humano en genética, anatomía, respuesta inmune y tamaño, por lo que es un modelo traslacional reconocido (Yuan *et al.*, 2000; Meurens *et al.*, 2012; Wilson & Obradovic, 2014). Además, gracias a su corto tiempo de gestación, rápido desarrollo y número de crías, representa un buen modelo experimental (Swindle 2007). La existencia de variantes genéticas pequeñas de esta especie facilita su uso en procedimientos técnicos, por los menores requerimientos de espacio, alimento, costos y manejo, comparados con el uso de animales de tamaño convencional (Stricker-Krongrad *et al.*, 2016). Además, los resultados obtenidos en este modelo son de aplicación directa en el campo veterinario/agropecuario, ya que la carne de cerdo es de las más consumidas; debido a su demanda alimentaria la protección contra enfermedades porcinas es de relevancia (Pozzi & Alborali, 2012). Asimismo, la importancia del cerdo en nuestro país es alta, México, en el 2018, se posicionó en el octavo lugar mundial con 1321 toneladas métricas de producción anual (*World Watch Institute*).

JUSTIFICACIÓN

La inmunización parenteral ha mostrado inducir una pobre respuesta inmunitaria en las mucosas, que son la vía de entrada de la mayoría de los patógenos, por lo que es necesario proteger estos sitios para evitar infecciones.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un protocolo combinado de inmunización subcutáneo/intranasal, el cual induce la producción de Abs en suero y mucosas, sin requerir de adyuvantes tóxicos, ni cantidades altas del Ag.

Para optimizar la respuesta inmunitaria mucosal, reducir los tiempos de generación de anticuerpos, conocer la cobertura de las distintas vías de administración y así dirigir mejor la respuesta a mucosas específicas, se compararon las vías SC/IN, SC/sublingual y SC/intravaginal, para la obtención de Abs contra OVA en el modelo traslacional porcino.

HIPÓTESIS

La inmunización sistémico-mucosal, usando diferentes mucosas, induce distintas respuestas de anticuerpos en cantidad, isotipo y velocidad de generación en las mucosas y el suero.

OBJETIVO GENERAL

- Comparar los protocolos de inmunización SC/IN, SC/SL y SC/lvag, para producir anticuerpos en suero, moco nasal, saliva y fluido vaginal, contra OVA, en un modelo experimental de minicerdo vietnamita.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los niveles de la respuesta de IgM, IgG e IgA en suero, saliva, moco nasal y fluido vaginal de tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales en el modelo de minicerdo vietnamita.

- Analizar la dinámica de producción de IgM, IgG e IgA en suero, saliva, moco nasal y fluido vaginal de tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales.
- Determinar el isotipo predominante en suero, moco nasal, saliva y fluido vaginal inducido por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales.

METODOLOGIA

Animales y esquema de inmunización

Se usaron muestras obtenidas de 16 minicerdas vietnamita (*Sus scrofa*), destetadas, de un mes de edad, criadas en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), bajo procedimientos aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) y la NOM-062-ZOO-1999. Los animales se dividieron en 3 grupos de acuerdo con el esquema de inmunización (Figura 4), que consistió en 4 dosis: Dos inoculaciones por vía SC, empleando como antígeno OVA (1 mg/kg) y adyuvante completo de Freund (CFA) el día 0 y con adyuvante incompleto (IFA) el día 7; seguido de dos administraciones mucosales (M) de OVA (2 mg/kg) sin adyuvante, en los días 14 y 42 (Salinas *et al.*, 2020).

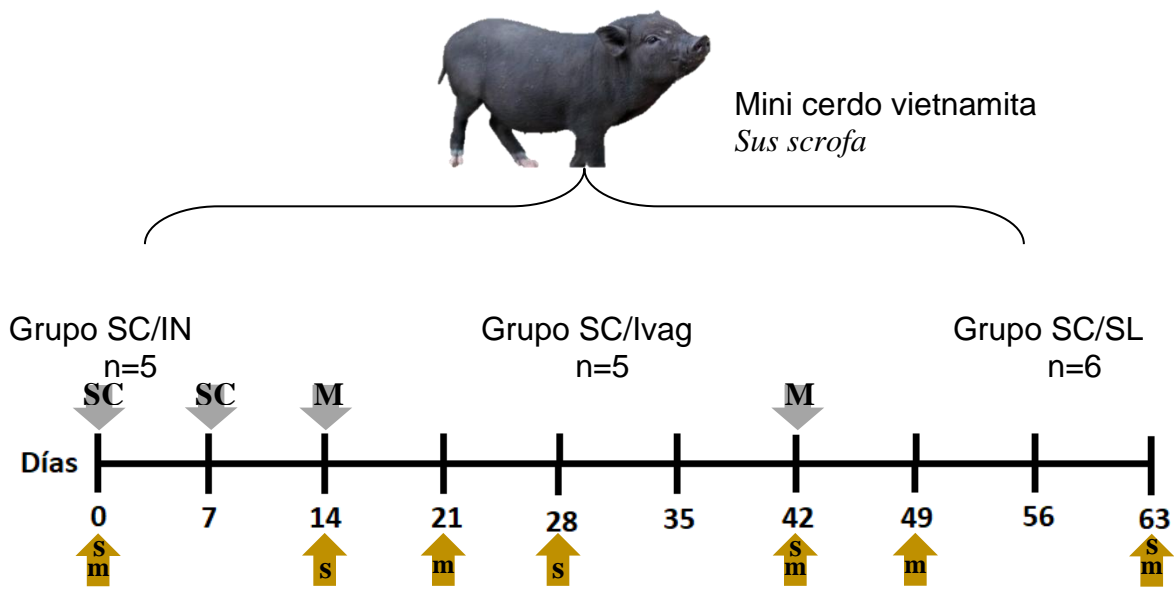


Figura 4. Diseño experimental. Se muestra la distribución de animales, esquema de inmunización y toma de muestras. Se emplearon 16 cerdas que se dividieron en 3 grupos, de acuerdo con la mucosa de inoculación: IN, Ivag o SL. Todos los animales se sometieron a dos inmunizaciones por vía subcutánea (SC), los días 0 y 7 y dos por vía mucosal (M) los días 14 y 42 (flechas grises) de acuerdo con el grupo. La toma de muestras para suero (s) y/o mucosas (m) fueron en los días 0, 14, 21, 28, 42, 49 y 63 (flechas amarillas).

Toma de muestras

La sangre se obtuvo por punción yugular, se centrifugó a 2500 x g durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y se separó el suero que se almacenó en microtubos de 1.5 mL a -20°C hasta su uso.

Las muestras de fluido vaginal, moco nasal y saliva se obtuvieron con hisopados. La vulva se limpió externamente con agua y jabón, después se introdujeron dos hisopos húmedos con PBS estéril a la vagina y se frotaron por el interior. Para las muestras de saliva y moco nasal se emplearon hisopos secos, para absorber los fluidos. Los hisopos se centrifugaron a 6500 x g durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se separó en tubos de 1.5 mL; para evitar la degradación de los anticuerpos se les adicionó 5 µL de inhibidores de proteasas (TPCK 50 µg/mL, TLCK 25 µg/mL y PMSF 174 µg/mL) y finalmente se almacenaron a -20°C.

Detección de anticuerpos

Se cuantificaron los anticuerpos específicos presentes en las muestras obtenidas mediante la técnica de ELISA indirecta.

La IgA fue detectada haciendo uso de una técnica de ELISA desarrollada en nuestro laboratorio (Patente No. 355566), mientras que los isotipos IgM e IgG fueron identificados usando los kits comerciales E-100-100 y E100-104 (Bethyl, EE. UU.) (Guzmán-Bautista *et al.*, 2015).

Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo redondo, organizadas como se muestra en la figura 5. Los pozos correspondientes a las muestras y sus blancos se sensibilizaron con 100 µL/pozo de OVA (2 µg/mL) en *buffer* de carbonatos pH 9.6 durante una noche a 4°C. Al día siguiente se sensibilizaron los pozos para la curva estándar y sus blancos con el Ab de captura antiisotipo correspondiente, diluido en *buffer* de carbonatos pH 9.6: cabra anti-IgG porcino 1/1500, cabra anti-IgM porcino 1/1500, cabra anti-IgA porcino 1/500, durante una hora a TA, en placas separadas.

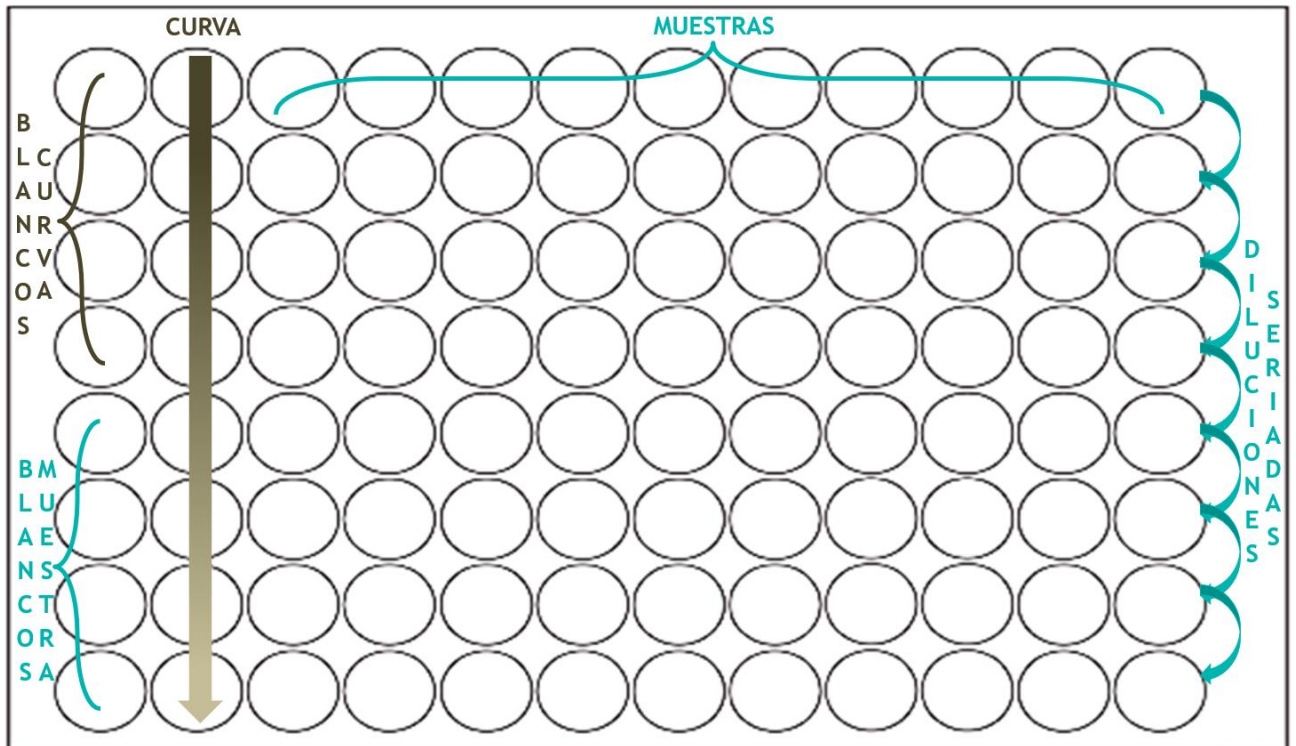


Figura 5. Organización de las placas de ELISA para la detección de anticuerpos por la técnica de ELISA indirecta cuantitativa.

Posteriormente, las placas de IgA se lavaron con PBS-Tween 20, al 0.075% (PBS-T), después se bloquearon con la misma solución de lavado durante 1 hora en agitación a TA. Las placas de IgG e IgM se lavaron con solución general (NaCl 0.14M y Tris-Base 50mM pH 8)-Tween 20, 0.075% y se bloquearon con solución general-BSA al 1% durante hora y media, en agitación a TA.

Se realizó una segunda serie de lavados, y se colocaron diluciones dobles seriadas de un suero de referencia (RS10-107, Bethyl, EE. UU) en los pozos de la curva, iniciando con una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la detección de IgA en suero y mucosas, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IgG en suero y 50 ng/mL para IgG en mucosas, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para IgM en suero y 50 ng/mL para IgM en mucosas.

Los pozos de las muestras problema se llenaron con las diluciones iniciales mostradas en la tabla 2 y se incubaron durante una noche a 4°C.

| Tabla 2. Diluciones de las muestras para ELISA | | | | |
|---|--------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Muestra | Ab | Día de muestreo | Dilución inicial | Dilución seriada |
| Suero | IgG | 0 | 1:50 | Doble |
| | | 14 | 1:200 | |
| | | 28, 42 y 63 | 1:2000 | |
| | IgA | 0 y 14 | 1:50 | |
| | | 28 y 42 | 1:125 | |
| | | 63 | 1:250 | |
| IgM | 0, 14, 28, 42 y 63 | 1:25 | Triple | |
| Moco nasal, saliva y fluido vaginal | IgA, IgG e IgM | 0, 21, 42, 49 y 63 | 1:5 | Doble |

Al día siguiente, se lavaron las placas y se agregó, en todos los pozos, el anticuerpo secundario correspondiente: MAb anti-IgA porcino, clona F9, 1/800 (U. Bristol, RU), anti-IgG porcino HRP, 1/200 000 (kit E100-104, Bethyl, EE. UU), anti-IgM porcino HRP, 1/50 000 (kit E100-100, Bethyl, EE. UU), y se incubó 1 hora en agitación a TA. De nuevo se lavaron las placas y, para detectar la IgA, se adicionó el anticuerpo secundario cabra anti-ratón biotinilado 1/4000 (B2763, Invitrogen, EE. UU) y, posteriormente, la estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina, 1/5000 (Zymed, EE.UU). Para el revelado de IgA se adicionó para-nitro fenil-fosfato (PnPP) (Sigma, EE.UU) en *buffer* de dietanolamina pH 9.8 y se midió la densidad óptica a 405 nm y 492 nm para reducir el fondo de la placa, tomando como resultado la absorbancia obtenida de 405-492 nm.

Para la IgM e IgG se empleó TMB 9 µg/mL más 2 µL de H₂O₂ al 6% (Alta Pureza, México), posteriormente se adicionó H₂SO₄ para detener la reacción y se evaluó la densidad óptica a 450 nm.

A partir de las absorbancias obtenidas en las lecturas de la curva estándar de cada placa, se interpolaron los valores de las muestras y se calculó la concentración de inmunoglobulina.

Análisis estadístico

Se empleó el software GraphPad Prism 8.02 para calcular el error estándar y el promedio de cada medición y así generar un punto en las gráficas. Para evaluar si existe diferencia significativa en la concentración de Abs entre protocolos, se realizó una prueba de t-Student no pareada, en los diferentes tiempos analizados, mientras que para el análisis cinético de cada método se empleó la prueba t-Student pareada.

RESULTADOS

Comparación entre vías de inmunización

Se analizó la producción de los isotipos de Ab (IgM, IgG e IgA), de cada muestra colectada (suero, moco nasal, saliva y fluido vaginal), a lo largo del experimento, para comparar, en un análisis transversal, cada método combinado de inmunización.

Suero

Como se muestra en la Figura 6, los niveles de producción de IgM, IgG e IgA en suero inducidos por el protocolo SC/IN fueron menores que los niveles inducidos por los métodos SC/SL y SC/lvag. La producción de IgM con el método SC/IN fue significativamente menor que los demás grupos en los días 28 y 42 (figura 6A).

El nivel de producción de IgG fue mayor al día 14 en el grupo SC/IN, pero después de la primera inmunización vía mucosal, es decir a los 28 días, los métodos SC/SL y SC/lvag indujeron una mayor cantidad, y particularmente a los 42 días el grupo SC/lvag alcanzó la mayor producción, sin embargo, en las semanas posteriores se detectaron menores concentraciones de IgG en los tres grupos con una disminución mayor en el grupo SC/SL (figura 6B).

La cantidad de IgA en suero inducida por el protocolo SC/lvag alcanzó la mayor producción respecto a los protocolos SC/IN y SC/SL en los días 28 y 63, por el contrario, en los días 42 y 63, el grupo SC/IN presentó menores concentraciones (figura 6C).

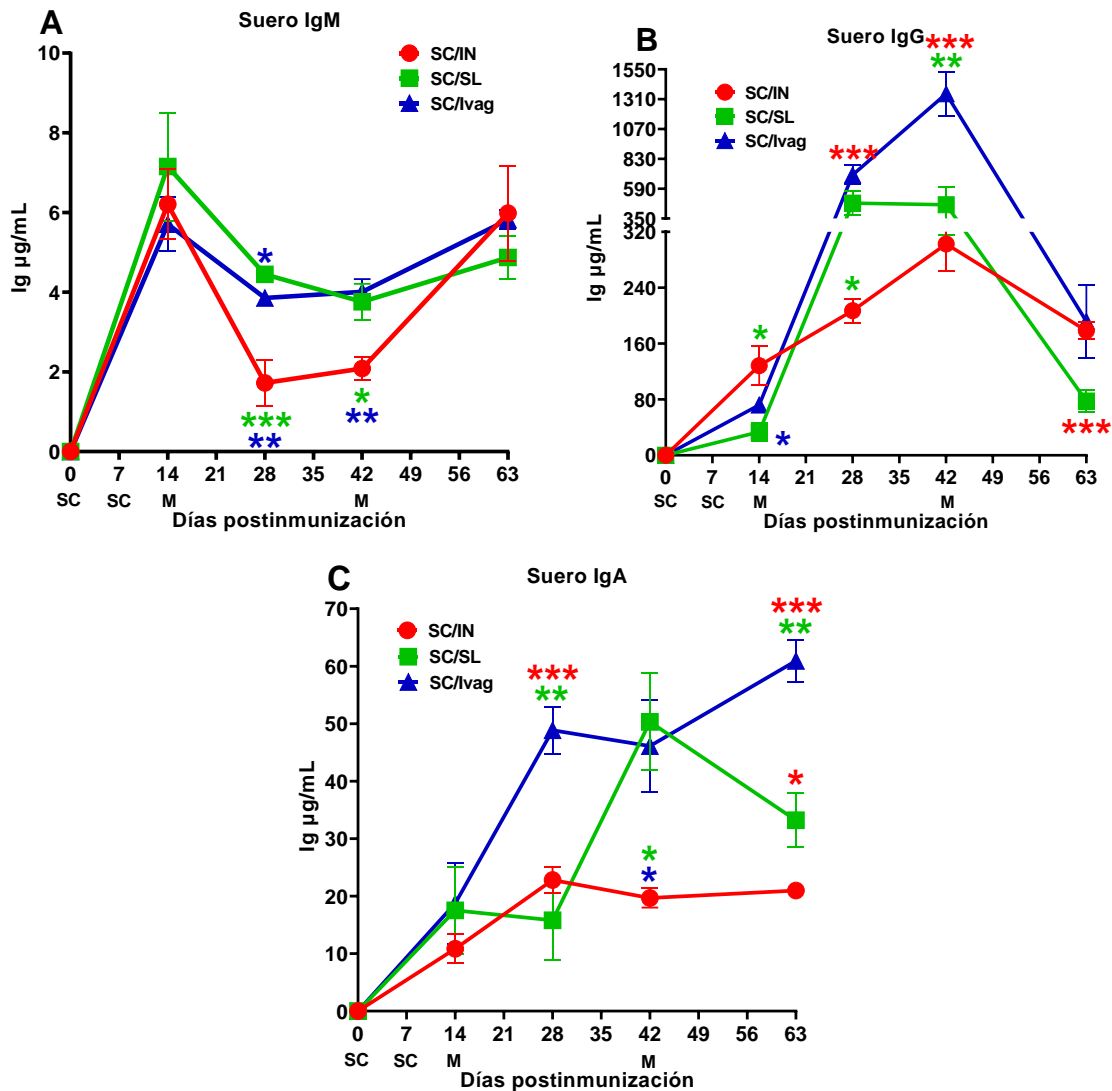


Figura 6. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en suero porcino, inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/lvag triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes cada una. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Moco nasal

La producción de IgM en moco nasal tuvo un comportamiento muy similar entre métodos y no hubo una diferencia clara entre protocolos (figura 7A).

Por su parte, la concentración de IgG en el grupo SC/IN tuvo una alta variación individual y se detectó una mayor producción de IgG en el grupo SC/SL respecto al SC/lvag el día 14 y, en el día 42 la concentración del método SC/IN fue mayor al grupo SC/SL (figura 7B).

Finalmente, la producción de IgA fue mayor con el protocolo SC/IN, especialmente en las semanas posteriores al refuerzo del día 42; mientras que los protocolos SC/SL y SC/lvag estimularon de forma muy baja la producción de IgA (figura 7C).

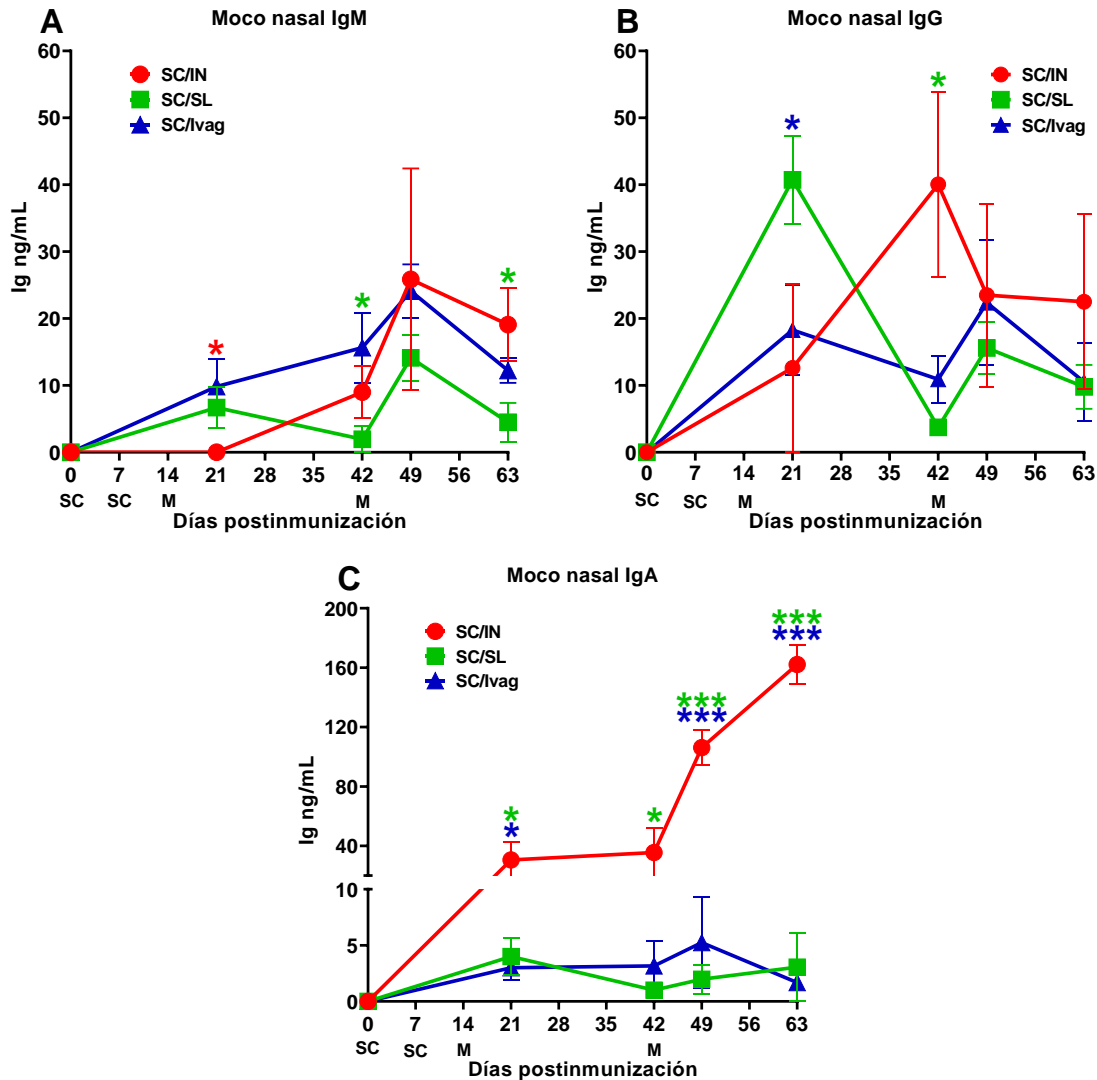


Figura 7. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en moco nasal porcino, inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/lvag triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Saliva

Los tres protocolos produjeron una respuesta primaria de IgM, siendo el grupo SC/SL significativamente más efectivo que el SC/IN al día 14; después del refuerzo

mucosal, al día 42 los tres métodos mostraron aumento de respuesta, sin diferencias significativas entre ellos (figura 8A).

Las concentraciones de IgG fueron significativamente mayores con el protocolo SC/IN en los días 21, 42 y 49, disminuyendo paulatinamente con el tiempo, hasta igualarse al día 63 a los protocolos SC/SL y SC/lvag (figura 8B).

En la figura 8C se observó que después del refuerzo, a partir del día 42, el protocolo con mayor producción fue el SC/IN y mantuvo una tendencia a seguir aumentando.

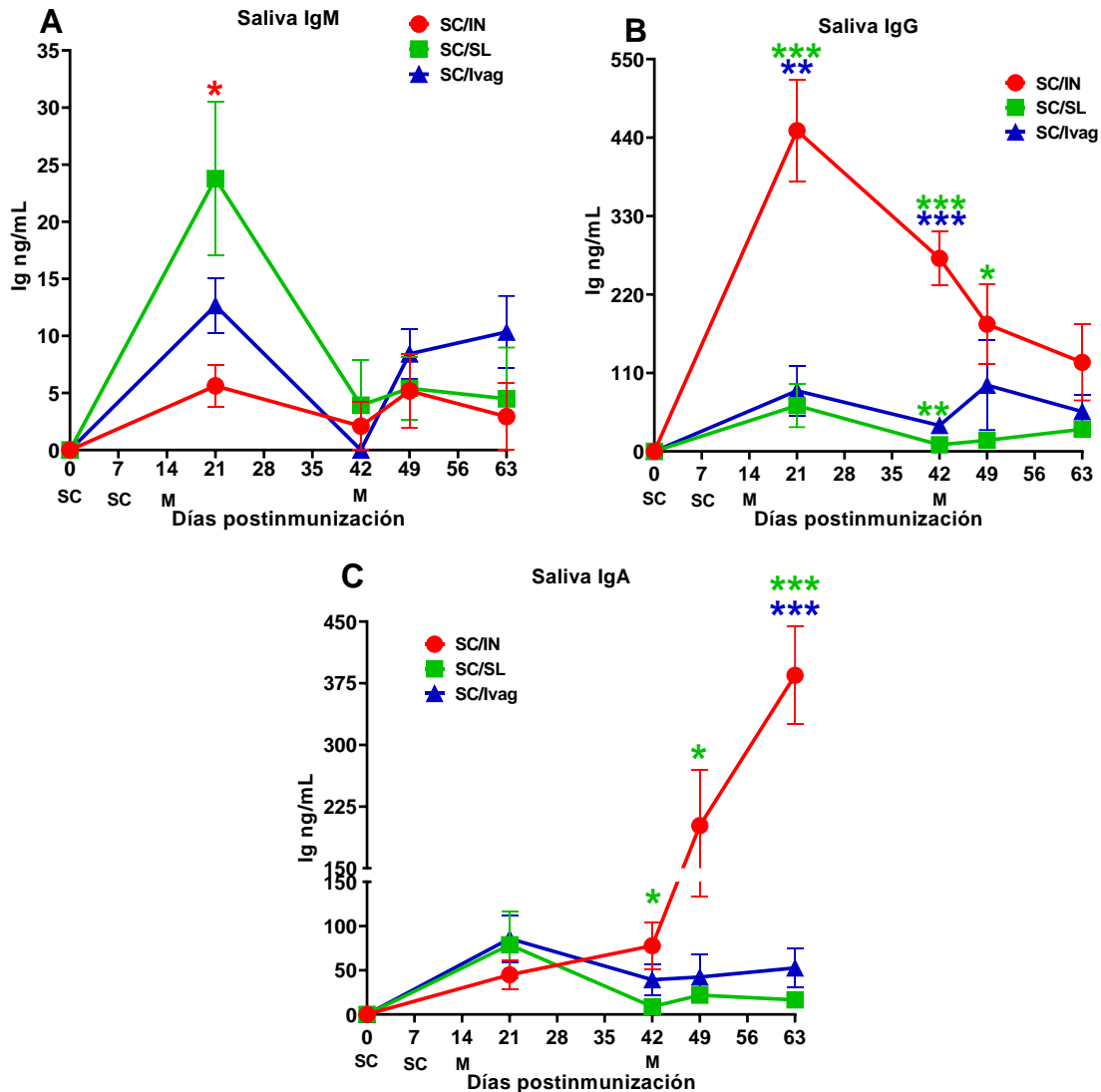


Figura 8. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en saliva porcina, inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/lvag triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes cada una. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fluido vaginal

El protocolo SC/lvag fue el único con un aumento significativo de IgM al día 21, mientras que en las mediciones posteriores los tres grupos se comportaron de forma similar (figura 9A).

La producción de IgG fue parecida entre los tres métodos, siendo el SC/SL el que presentó menor producción significativa los días 21 y 63 (figura 9B).

Por último, la secreción de IgA con el protocolo SC/SL fue la de menores concentraciones a lo largo del experimento, a los 21, 42 y 49 días con el grupo SC/lvag y a los 49 y 63 con el protocolo SC/IN (figura 9C).

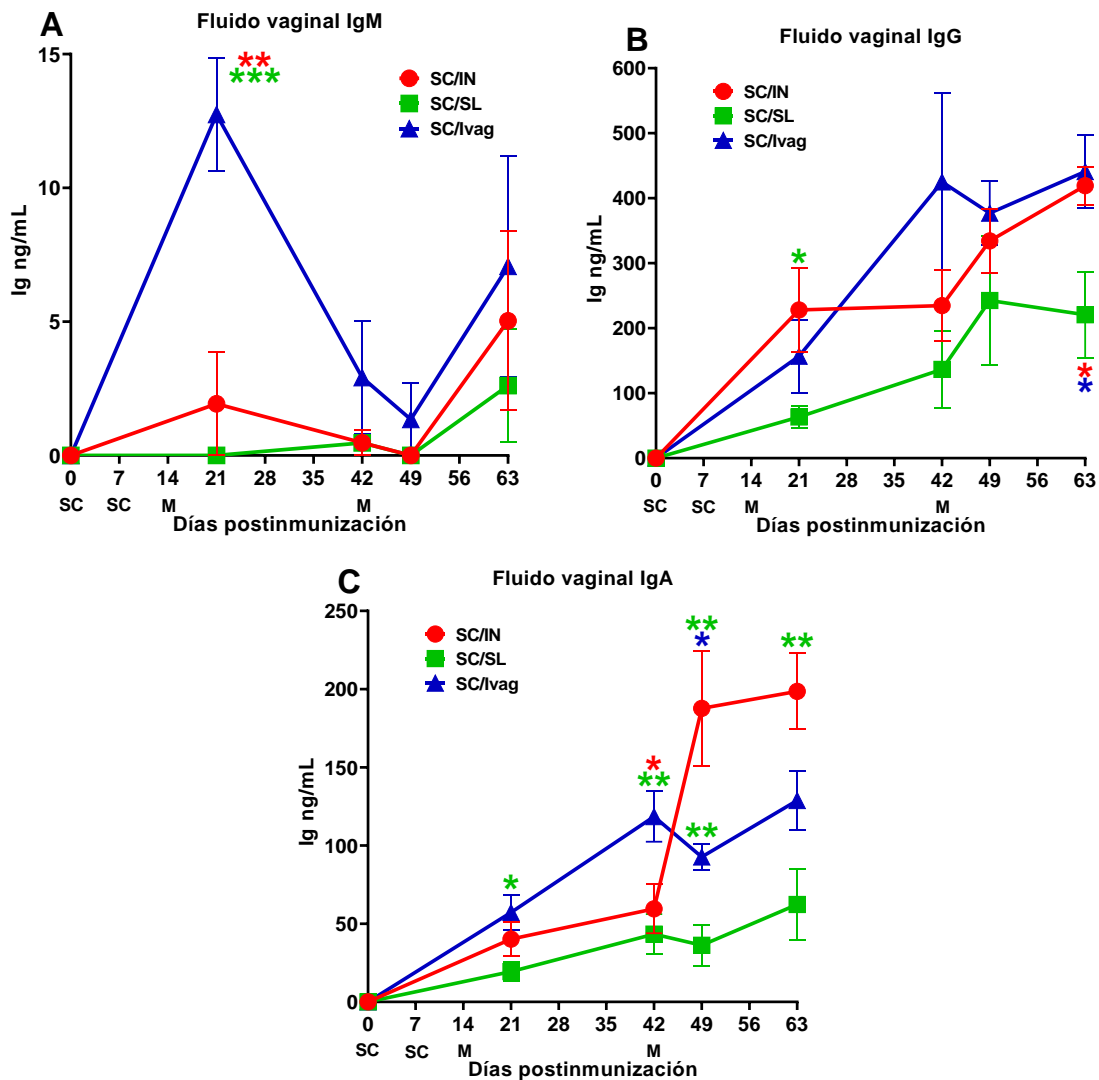


Figura 9. Comparación entre métodos. Abs α -OVA en fluido vaginal porcino, inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/lvag triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía

mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes cada una. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Cinética de producción (análisis en el tiempo)

Con los datos obtenidos de las gráficas anteriores, ahora se analizó, para cada protocolo, el cambio de concentración en el tiempo de cada isotipo (IgM, IgG e IgA) en cada muestra (suero, moco nasal, saliva y fluido vaginal), es decir, se hizo un análisis longitudinal.

Suero

Se observó un aumento significativo de la respuesta primaria de IgM con las inmunizaciones SC (día 7) en todos los grupos, el método SC/IN presentó una caída al día 28 y una posterior recuperación significativa hasta el final del experimento (figura 10A).

Para IgG, los tres métodos mostraron aumentos significativos al día 28 y con mayor producción hasta el día 42 con el protocolo SC/Ivag, que posteriormente disminuyó a los 63 días de manera significativa en los métodos SC/SL y SC/Ivag (figura 10B).

Para la IgA, los protocolos SC/IN y SC/Ivag aumentaron significativamente el día 28 mientras que el SC/SL lo hizo hasta el día 42, posteriormente las respuestas de los tres métodos se mantuvieron hasta el final (figura 10C).

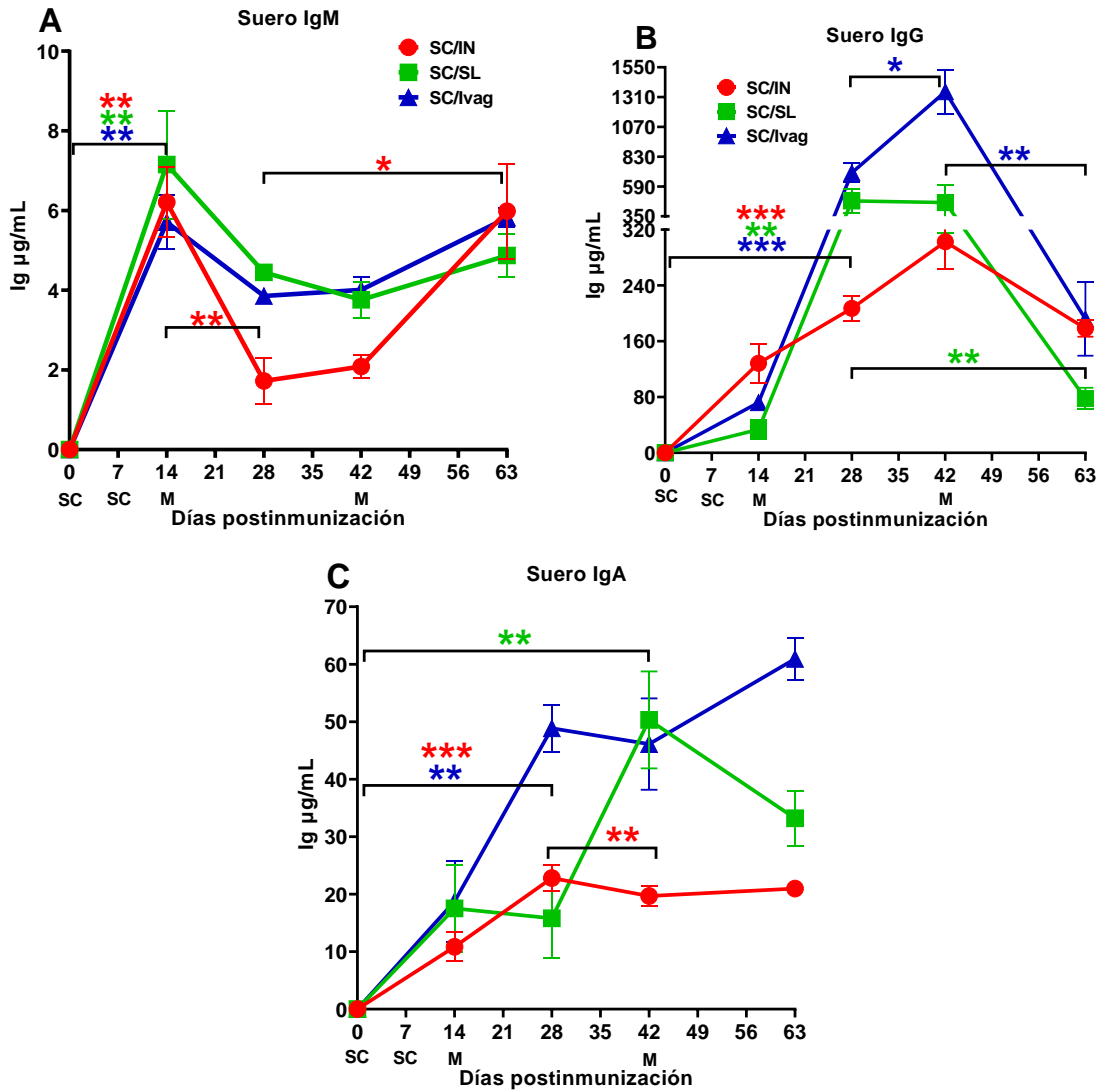


Figura 10. Cinética de producción. Abs α -OVA en suero porcino inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/lvag triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes cada una. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Moco nasal

En moco nasal la IgM tuvo aumento significativo hasta el día 49 solo en los grupos SC/SL y SC/lvag; mientras que en el grupo SC/IN no hubo respuesta significativa (figura 11A).

En la respuesta de IgG, el grupo SC/SL mostró un incremento al día 21, que se abatió significativamente al día 42, para volver a incrementarse ligeramente después del refuerzo mucosal. En el grupo SC/lvag el aumento significativo de IgG ocurrió hasta el día 42 y se sostuvo hasta el final del experimento. Y el grupo SC/IN mostró desviaciones altas de IgG en todas las mediciones, la concentración aumentó al día 42 pero sin significancia estadística durante el experimento (figura 11B).

Para la IgA, solo el método SC/IN mostró aumento significativo hasta después del refuerzo al día 42 y continuó aumentando hasta el día 63 (figura 11C).

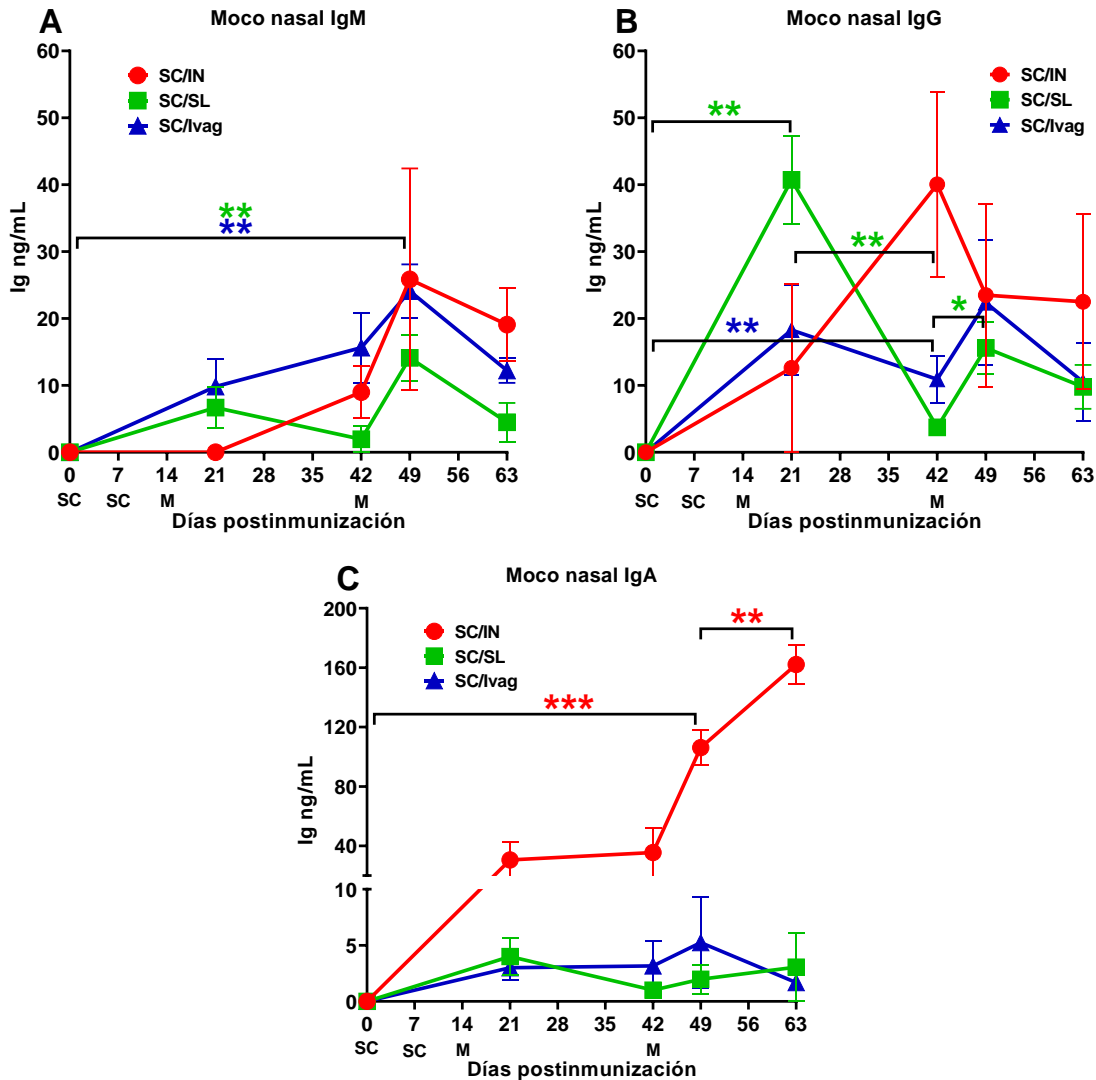


Figura 11. Cinética de producción. Abs α -OVA en moco nasal porcino inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/IVAG triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes cada una. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Saliva

La IgM en saliva aumentó significativamente al día 21 en los tres protocolos, declinando en todos los casos para el día 42, y únicamente el protocolo SC/IVAG mostró una respuesta significativa de memoria al día 49 (figura 12A).

Los protocolos SC/SL y SC/lvag mostraron una pobre y lenta respuesta de IgG hasta el día 42, que no repuntó después del refuerzo, mientras que el SC/IN tuvo una buena y rápida producción de IgG al día 21 que fue disminuyendo a lo largo del experimento (figura 12B).

La IgA se incrementó significativamente al día 21 con los métodos SC/lvag y SC/IN, con el primer método se mantuvieron los niveles, pero con el SC/IN hubo un aumento significativo desde el día 49 hasta el día 63 y el método SC/SL mostro la producción más lenta y baja, incrementando hasta el día 42 (figura 12C).

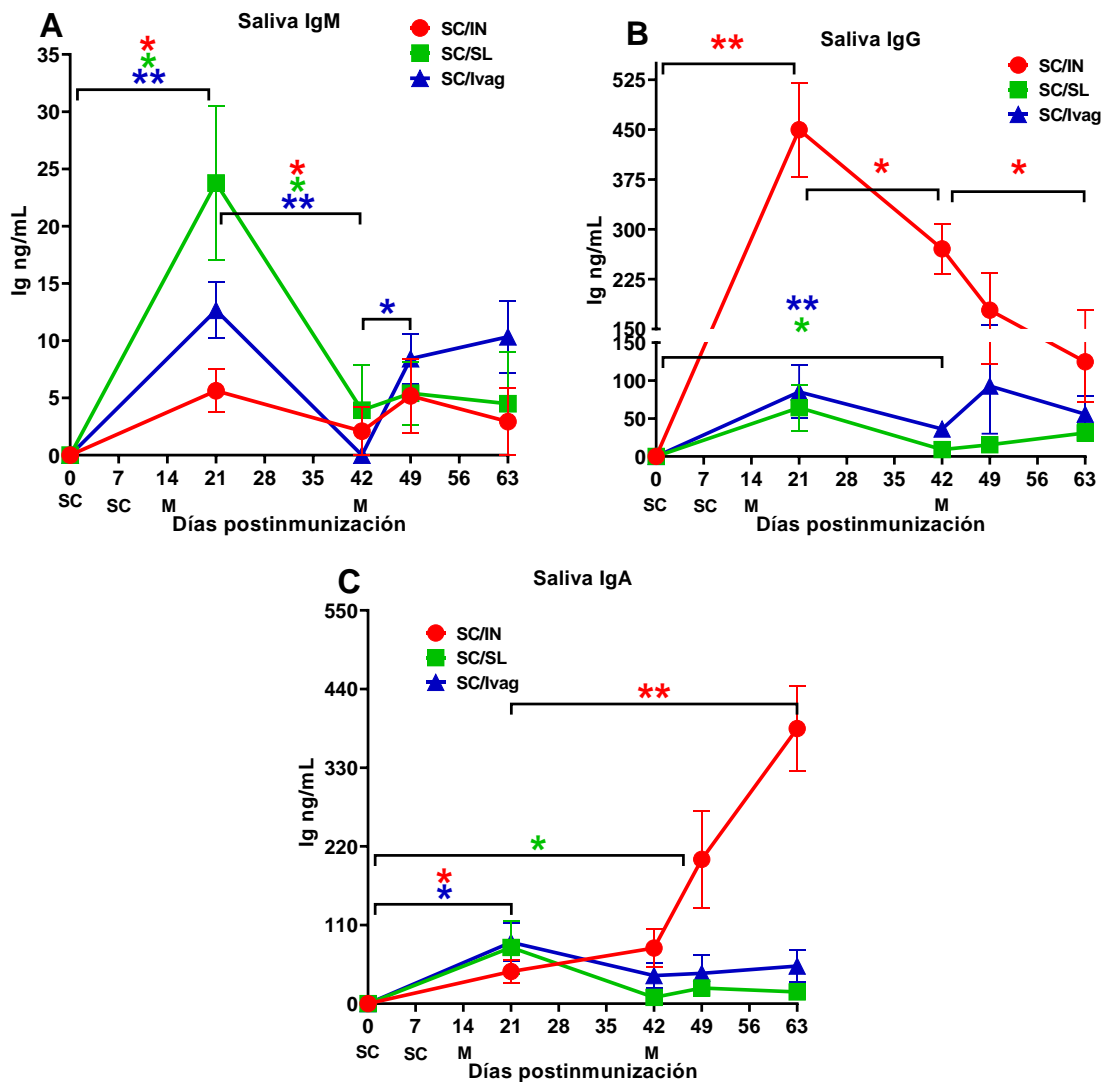


Figura 12. Cinética de producción. Abs α -OVA en saliva porcina inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN

círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/lvag triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes cada una. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fluido vaginal

El protocolo SC/lvag fue el único con un aumento significativo para IgM al día 21, seguido de una rápida disminución al día 42. Los demás grupos, SC/IN y SC/SL, no mostraron cambios significativos respecto al día 0 en ningún tiempo (figura 13A).

Para la IgG, los tres métodos mostraron respuesta desde el día 21, sin embargo, solo los grupos SC/IN y SC/lvag mostraron aumentos significativos posteriormente (figura 13B).

Finalmente, en la producción de IgA se mostró una respuesta rápida en todos los grupos al día 21, pero solo los grupos SC/lvag y SC/IN mostraron respuesta significativa de memoria con el refuerzo al día 42 (figura 13C).

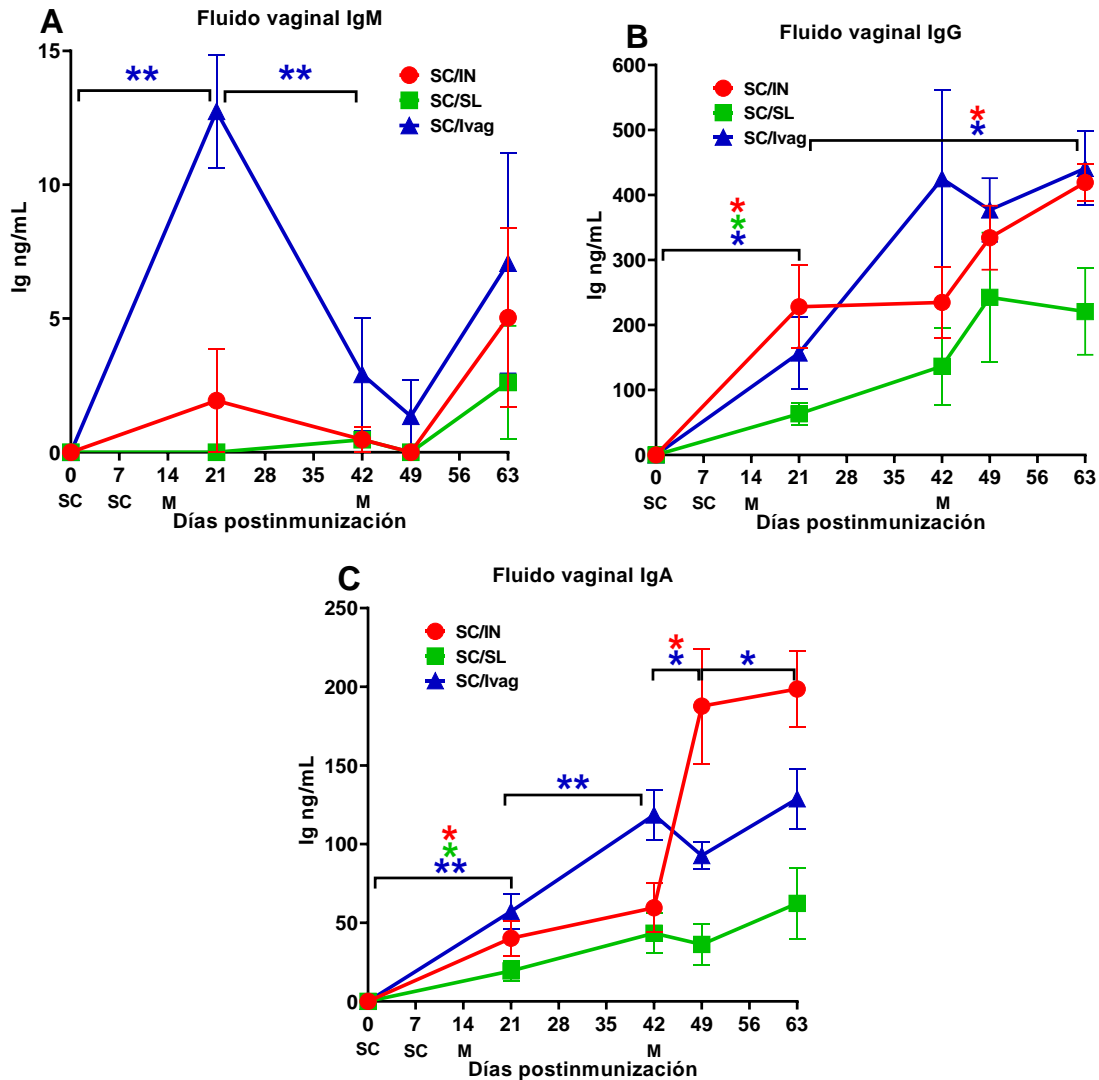


Figura 13. Cinética de producción. Abs α -OVA en fluido vaginal porcino inducidos por tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: Subcutáneo/intranasal (SC/IN círculos rojos), subcutáneo/sublingual (SC/SL cuadrados verdes) y subcutáneo/intravaginal (SC/ivag triángulos azules). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. IgM (A), IgG (B) e IgA (C) con escalas diferentes cada una. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Isotipos predominantes en cada protocolo

Con los mismos datos obtenidos de las ELISA, esta vez se analizaron las concentraciones de cada isotipo (IgM, IgG e IgA) Ag específico, por muestra y se evaluó la predominancia del isotipo con el tiempo.

Suero

Desde el inicio hasta el final de experimento la IgG fue el isotipo predominante en todos los protocolos; al día 14 las cantidades de IgA e IgM fueron similares, pero a partir del día 28 la IgM fue la de menor concentración (figura 14A, C).

El protocolo SC/SL indujo todos los isotipos de forma similar en el día 14, fue a partir del día 28 donde la IgG predominó, mientras que IgA superó a la IgM hasta el día 42 (figura 14B).

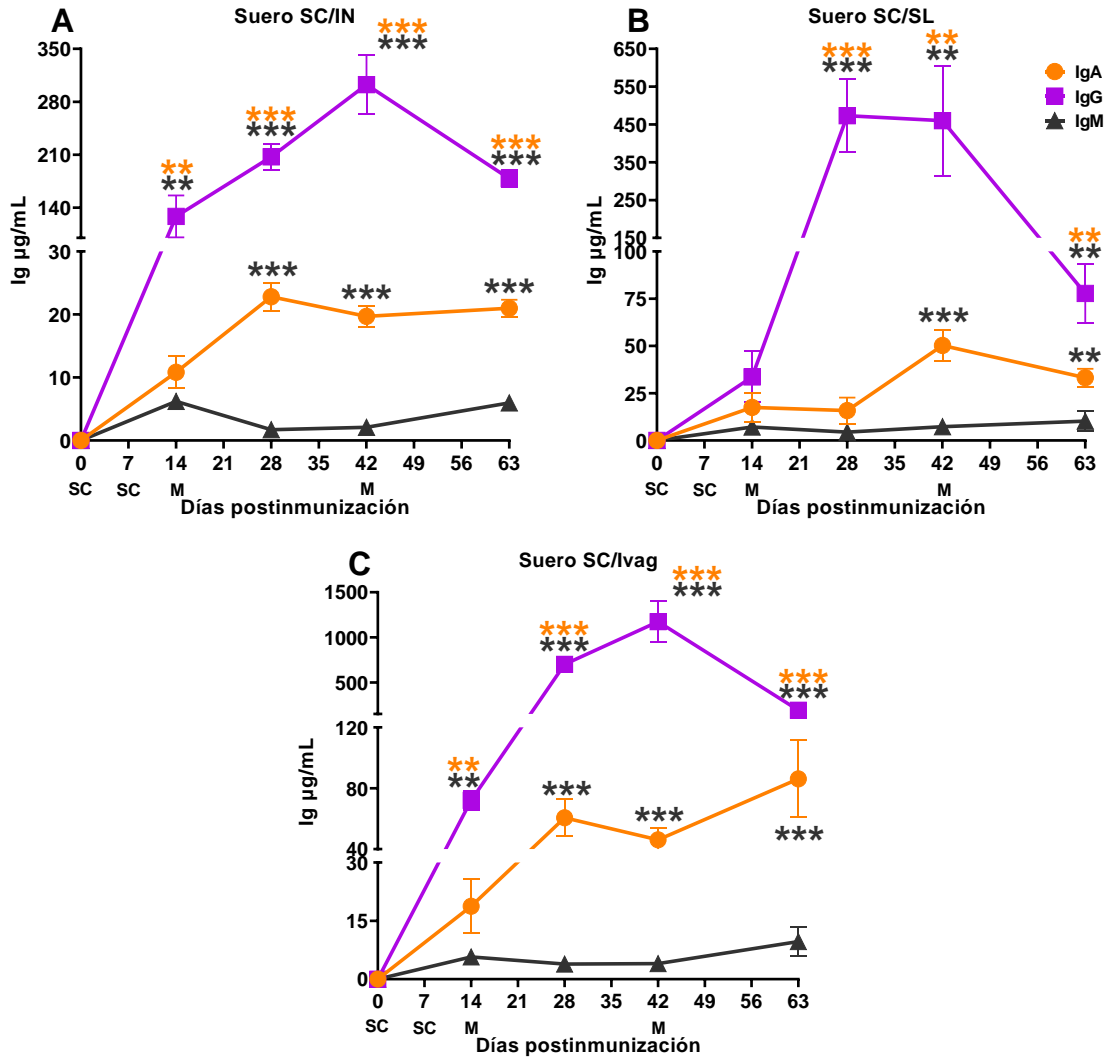


Figura 14. Isotipos predominantes. Isotipos de Abs α -OVA en suero porcino: IgM (triángulos negros), IgG (cuadrados morados) e IgA (círculos naranjas), inducidos a través de tres protocolos de inmunización sistémico-mucosales: A) subcutáneo/intranasal (SC/IN), B) subcutáneo/sublingual (SC/SL) y C) subcutáneo/intravaginal (SC/lvag). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. Las escalas son diferentes en cada gráfico. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Moco nasal

El protocolo SC/IN en moco nasal mostró una concentración significativa mayor al día 21 de IgA respecto a IgM, y fue a partir del refuerzo, al día 49, que la IgA disparó su producción sobre los demás isotipos (figura 15A).

El método SC/SL favoreció en un inicio la IgG, que luego disminuyó su concentración hasta igualar a los otros isotipos y, después del refuerzo, al día 49, tanto IgG e IgM rebasaron a IgA, aunque al día 63 los tres isotipos tuvieron concentraciones similares (figura 15B).

Por otro lado, en el protocolo SC/lvag no predominó ningún isotipo en ningún punto y las concentraciones fueron muy bajas especialmente de IgA, mientras que IgG e IgM mostraron una alta dispersión de datos (figura 15C).

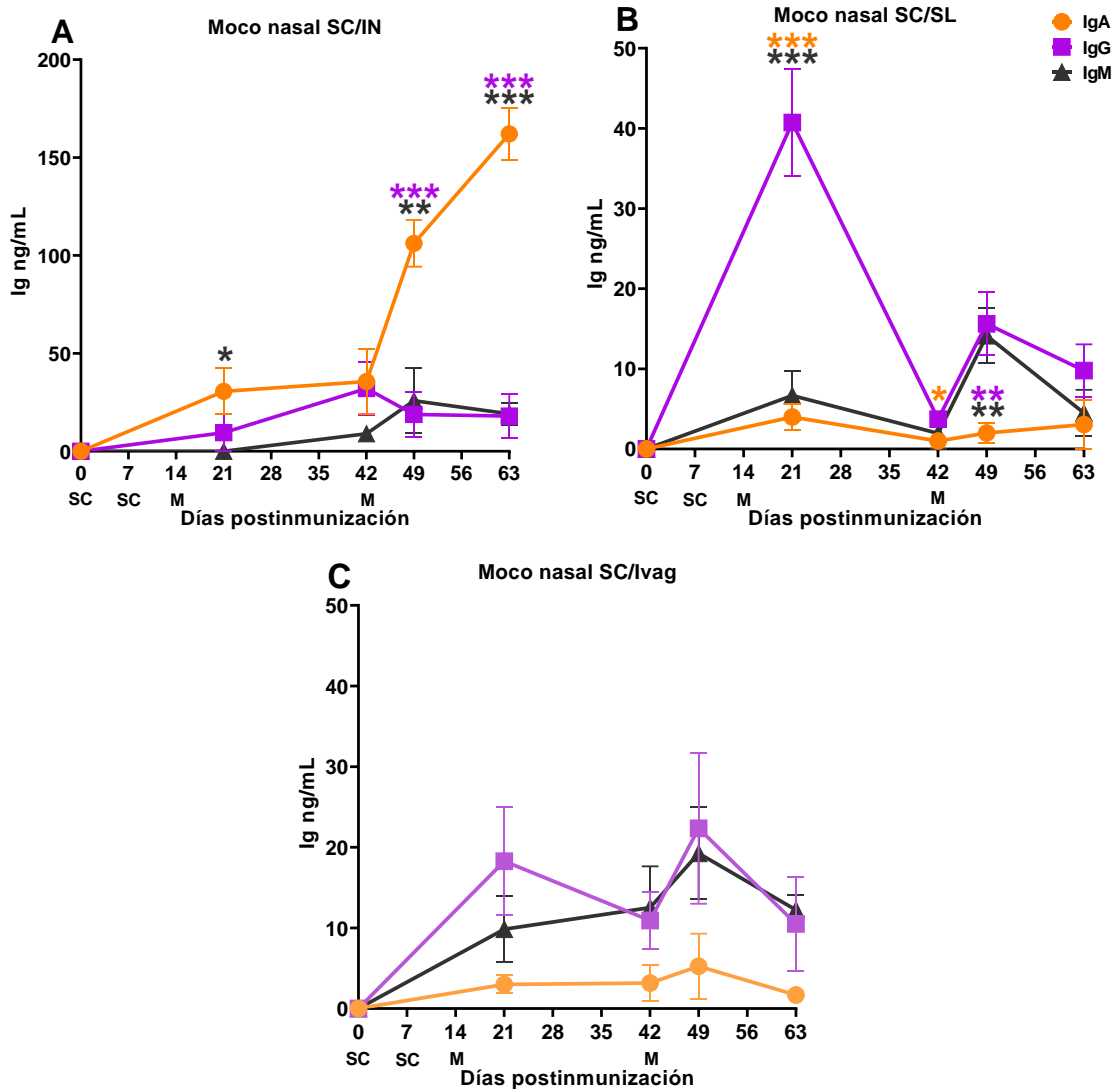


Figura 15. Isotipos predominantes. Isotipos de Abs α -OVA en moco nasal porcino, IgM (triángulos negros), IgG (cuadrados morados) e IgA (círculos naranjas), inducidos a través de tres protocolos sistémico-mucosales: subcutáneo/intranasal (SC/IN, A), subcutáneo/sublingual (SC/SL, B) y subcutáneo/intravaginal (SC/IVAG, C). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. Las escalas son diferentes en cada gráfico. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Saliva

En la saliva, el protocolo SC/IN mostró con las primeras inmunizaciones una predominancia de IgG que mantuvo hasta el día 42 pero, después del refuerzo, la

respuesta secundaria IgA predominó, por su parte las concentraciones de IgM siempre fueron muy bajas (figura 16A).

En el protocolo SC/SL se observó una baja concentración de Abs sin predominio de algún isotipo en todo momento (figura 16B).

En el protocolo SC/Ivag, la IgM fue la de menor concentración respecto a IgA e IgG en los 21 y 42 días respectivamente, mientras que ambos isotipos, IgA e IgG, mantuvieron una producción semejante durante todo el experimento (figura 16C).

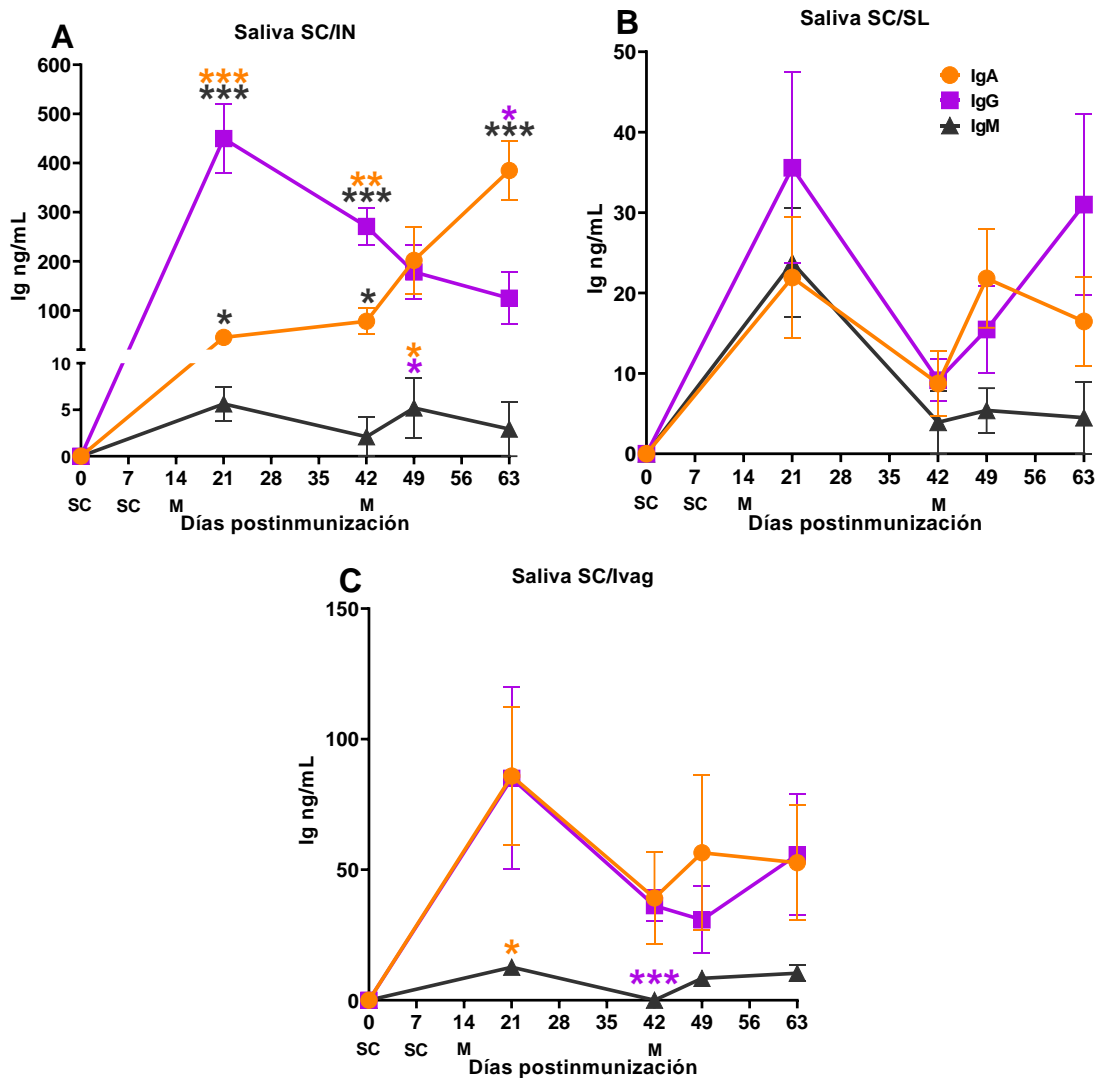


Figura 16. Isotipos predominantes. Isotipos de Abs α -OVA en saliva porcina IgM (triángulos negros), IgG (cuadrados morados) e IgA (círculos naranjas), inducidos a través de tres protocolos sistémico-mucosales: subcutáneo/intranasal (SC/IN, A), subcutáneo/sublingual (SC/SL, B) y subcutáneo/intravaginal (SC/Ivag, C). Los

animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. Las escalas son diferentes en cada gráfico. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fluido vaginal

Los isotipos predominantes, generados por los tres protocolos de inmunización en fluido vaginal, fueron IgG, seguido de IgA durante todo el experimento, siendo el SC/SL el que indujo menores concentraciones (figura 17B), y el SC/lvag con predominio evidente de IgG (figura 17C). Ninguno de los protocolos indujo cantidades apreciables de IgM.

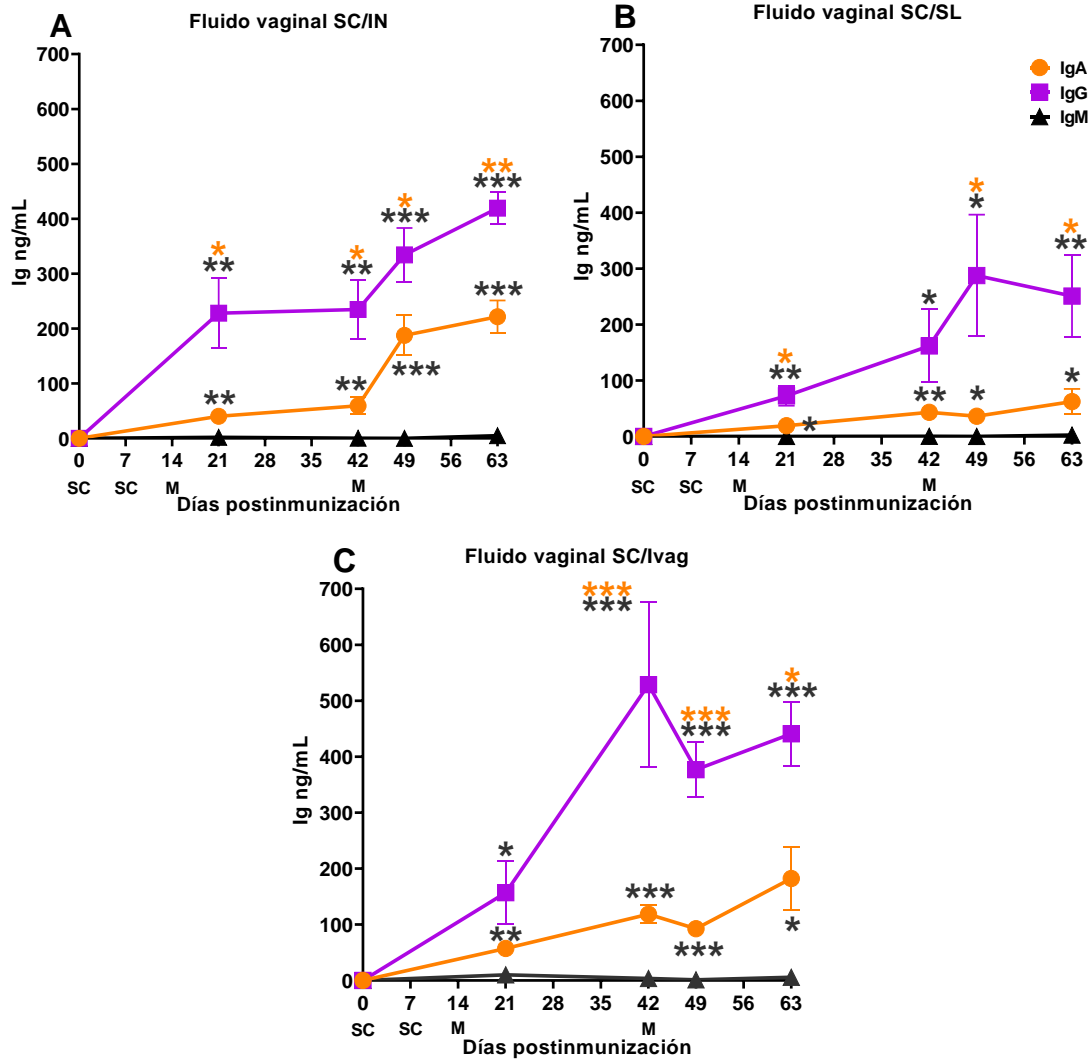


Figura 17. Isotipos predominantes. Isotipos de Abs α -OVA en fluido vaginal porcino IgM (triángulos negros), IgG (cuadrados morados) e IgA (círculos naranjas), inducidos a través de tres protocolos sistémico-mucosales: subcutáneo/intranasal (SC/IN, A), subcutáneo/sublingual (SC/SL, B) y subcutáneo/intravaginal (SC/Ivag, C). Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea (SC) los días 0 y 7 y por vía mucosal (M) en los días 14 y 42. Las escalas son diferentes en cada gráfico. Cada punto representa el promedio y el error estándar de al menos 5 animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

Las vacunas son la principal herramienta para prevenir las enfermedades, su desarrollo es clave para controlar y erradicar brotes infecciosos capaces de provocar pandemias (Rauch *et al.*, 2018). Hasta la fecha se han elaborado cientos

de vacunas, que, en su mayoría, son aplicadas de forma parenteral, lo cual implica el ingreso del Ag y su procesamiento en órganos linfoides secundarios y producen una buena respuesta sistémica, pero muy baja en mucosas (Kiyono & Azegami, 2015). Por su parte, las vacunas mucosales son capaces de generar respuesta protectora tanto en suero como en mucosas, sin embargo, para superar la tolerancia que normalmente inducen, requieren de adyuvantes tóxicos, altas concentraciones del Ag o múltiples inoculaciones. Para evitar esos métodos se recurre a protocolos de inmunización combinados sistémico-mucosales que inducen inmunidad integral, sistémica y mucosal (Ogra *et al.*, 2001; Mestecky, 2007; Anjuère *et al.*, 2012, Guzmán-Bautista *et al.*, 2014) que pueden ser de gran utilidad en pandemias como la actual provocada por el SARS-CoV-2 donde la gran cantidad de portadores sanos siguen propagando al virus por lo que se busca interrumpir la cadena de contagios al inducir protección en vías respiratorias y con ello evitar la infección (Mudgal *et al.*, 2020).

En el presente trabajo se comparó la respuesta humoral obtenida a través de tres protocolos de inmunización sistémico/mucosales: SC/IN, SC/SL y SC/lvag, evaluando la producción de Abs (IgM, IgG e IgA) en suero, moco nasal, saliva y fluido vaginal, para conocer las posibles diferencias en la producción, alcance y distribución de Abs en las mucosas, la velocidad de respuesta sistémica y mucosal y los isotipos producidos a lo largo del protocolo de acuerdo con la vía de administración mucosal.

Comparación entre protocolos de inmunización

Suero (figura 6)

En los estudios realizados por Kraan *et al.*, 2017, utilizando una vacuna inactivada del polio y de Çuburu *et al.*, 2007, con OVA como antígeno, se observó que en ratones tanto la vía IN y SL individualmente responden de forma muy similar en suero, incluso igualando a la inmunización intramuscular, siempre y cuando se administren junto con toxina del cólera como adyuvante. En nuestro caso, usando la inmunización combinada, los resultados mostraron que las rutas SC/SL y la

SC/lvag tuvieron una mejor respuesta en todos los isotipos que la SC/IN, sugiriendo que la ruta mucosal tuvo un efecto determinante en la respuesta sistémica por esas vías, lo que se podría explicar por los sitios inductores que son estimulados, ya que por la vascularización de la mucosa SL, el Ag puede llegar a circulación directamente, procesándose en órganos linfoides secundarios, ganglios cervicales y submandibulares. Del mismo modo, los Ags en vagina serían procesados en ganglios inguinales, ilíacos y sacros y por consiguiente, las células plasmáticas producidas en estos sitios podrían presentar una menor ecotaxia hacia las mucosas y vierten los Abs en la sangre dando como resultado una mayor concentración de Abs en suero (Minges Wols, 2005; Kweon, 2011; Kaushic & Nguyen 2016). Asimismo, la mayor producción de IgG con el protocolo SC/lvag (figura 6B), principalmente después del estímulo lvag podría relacionarse con que la zona caudal tiene una mayor red de ganglios y el número de clonas activadas sería mayor, tal como Çuburu *et al.*, 2009 demostró con la medición de células secretoras de Abs en los ganglios ileosacrales. Por su parte la producción de Abs en el protocolo SC/IN, podría responder principalmente a las inmunizaciones SC, ya que la vía IN suele producir una baja, más no nula respuesta sistémica (Kiyono *et al.*, 1996). Sin embargo, de acuerdo con lo observado por Salinas *et al.*, 2020, donde se incluyó un control de inmunización SC/SC, usando VEA inactivado, se observó que la producción de IgG e IgA en suero fue similar a la del protocolo SC/IN. Con lo anterior concluimos que la fuerte respuesta sistémica podría deberse a un mejor procesamiento y activación de linfocitos en los ganglios linfáticos periféricos.

Moco nasal (figura 7)

La importancia de la protección en la mucosa nasal radica en que las infecciones en vías respiratorias son las más frecuentes, y por ello, estudiar las estrategias que puedan favorecer la producción de Abs en ese sitio es clave para reducir esas infecciones. Un ejemplo claro es el SARS-CoV-2, agente de la pandemia actual por COVID-19 que es una enfermedad que inicia en las vías respiratorias altas y su tasa

de transmisión es rápida por lo que la protección del nicho respiratorio es clave para frenar la cadena de contagios.

La producción ligeramente menor de IgM con el método SC/SL habla de un transporte lento hacia nariz y probablemente las clonas de IgM en su mayoría se queden en glándulas salivales (figura 8A).

Nuestros resultados mostraron una alta variación individual en la producción de IgG con el protocolo SC/IN, posiblemente atribuible a la falta de respuesta en tres de los cinco animales del grupo, por ello sería importante confirmar esos resultados. Kono *et al.*, 1994, también observaron una alta variación en la respuesta IgG en secreción nasal con cerdos ante la infección a *Bordetella*, además, de forma natural la cantidad de IgG es 3 veces menor que la de IgA en ese sitio por lo que es posible que la producción de IgG no sea tan relevante en esta mucosa (Morgan *et al.*, 1980).

La respuesta IgA produjo resultados que fueron más consistentes, independientemente de la ruta. Notablemente el protocolo con mayor producción de IgA fue el SC/IN, sobrepasando en gran medida al SC/SL y SC/Ivag. La literatura señala (Song *et al.*, 2009) que la mucosa SL no tiene células M, lo cual reduciría el paso de Ags por el epitelio, en cambio la cavidad nasal presenta un sitio inductor (anillo de Waldeyer), con FAE en las tonsilas lo que facilitaría la producción de Abs de forma local, es decir hacia la nariz y cavidad oral, debido a la presencia de la quimiocina CCR10 e integrina $\alpha_4\beta_1$ (Pedersen & Cox, 2012). Además, Fiorino *et al.*, 2013 observó que la ruta IN tiene mayor tendencia hacia la respuesta de tipo Th1 en ratones, lo cual favorece la producción de IgA usando OVA como Ag.

Saliva (figura 8)

Recientemente se ha propuesto el uso de la inmunización SL dado que esta vía, al contrario de la IN, evita el paso de los antígenos y adyuvantes al sistema nervioso, ya que se ha visto que la toxina lábil al calor de *Escherichia coli* puede causar en humanos problemas de parálisis facial, es por ello por lo que la inmunización SL es más segura, además ambas vías ofrecen resultados equiparables en mucosa respiratoria y saliva (Çuburu *et al.*, 2007; 2009; Maseda *et al.*, 2018). Es así como

nosotros comparamos los protocolos combinados SC/mucosal tomando en cuenta que al inmunizar primero por vía SC se crean las clonas específicas y después, con el estímulo mucosal, libre de adyuvante, son reclutadas a las mucosas donde se encuentra el antígeno, reduciendo la probabilidad de que los Ags o adyuvantes lleguen directamente al sistema nervioso.

El protocolo SC/IN mostró mejor producción de IgG y de IgA, comparado con el SC/SL y el SC/lvag, debido, probablemente, a que las mucosas SL y vaginal tienen un epitelio estratificado que disminuye la absorción, ya que este tipo de epitelio tiene funciones de barrera y no es fácilmente permeable a Ags (Woodrow *et al.*, 2012), lo que explicaría los bajos resultados en saliva usando esos protocolos. Del mismo modo consideramos que existen diferencias en la forma de procesamiento del Ag entre sitios inductores, que afectarían la producción local de Abs; probablemente la proporción de los centros germinales varíe de acuerdo a la mucosa ya que se sabe que el tráfico de linfocitos tanto del MALT en nariz como en la mucosa SL son regulados por CCR7-CCL19/21 (Song *et al.*, 2009; Brandtzaeg, 2011); también Pedersen *et al.*, 2011, habla de la probable deglución y/o degradación enzimática del Ag administrado por vía SL que puede disminuir la dosis, sin embargo, consideramos que en su mayoría el Ag fue absorbido directamente a circulación y por ello se detectó una buena respuesta sistémica pero baja en mucosas; por su parte, es importante destacar nuestro modelo animal, ya que en investigaciones de Çuburu *et al.*, 2007 y Maseda *et al.*, 2018 empleando tres inmunizaciones mucosales de Ag proteicos se han detectado títulos finales de Abs en saliva similares entre la vía IN y SL. Sin embargo, a diferencia nuestra, en estos trabajos, se anestesiaron a los animales para inmunizarlos, con lo que se facilita el depósito y es posible mantener al animal en reposo para permitir una mejor toma del Ag y además emplearon al ratón, el cual, a diferencia del cerdo y humano tiene una mucosa sublingual queratinizada que podría reducir la absorción a circulación y facilitar el procesamiento del Ag en los ganglios submandibulares, los cuales son los sitios inductores (Hervout *et al.*, 2014). Las mayores semejanzas del cerdo con el humano confirman su uso como modelo traslacional (Wilson *et al.*, 2014; Johansen *et al.*, 2020).

Fluido vaginal (figura 9)

La inmunización Ivag es una vía poco estudiada, pero con capacidad de montar una respuesta inmune. En nuestra comparación de métodos, observamos buenos resultados con todos ellos en fluido vaginal.

La producción de IgM inicial fue ligeramente mayor con el SC/Ivag lo cual podría deberse a que la inmunización local estimula a más células *naive* presentes en la vagina, esto sería un tema de estudio ya que después del *priming* y la maduración de células B a plasmáticas se igualan las concentraciones al día 42, es así como para IgG e IgA los tres métodos mostraron ser eficientes para producir respuesta vaginal, lo que habla de la estimulación de receptores similares de migración celular tanto por vía IN y SL hacia la vagina (Johansson *et al.*, 2001). Tampoco podemos descartar que posiblemente la respuesta sea por la estimulación parenteral (SC), como en la vacuna Gardasil para papiloma humano (Zhai & Tumban 2016). Los resultados similares entre SC/IN y SC/Ivag concuerdan con el estudio de De Bernadis *et al.*, 2002, donde se realizó una comparación entre las vías IN e Ivag, usando Ag de *Candida albicans* con CT como adyuvante, donde se observó que tanto la cantidad como funcionalidad de IgM, IgG e IgA producidas por ambas vías fueron equiparables. En nuestro caso, con el protocolo combinado y sin utilizar adyuvante, obtuvimos respuestas similares, sin embargo, sería interesante realizar la comparación con Ag patógenicos. También es importante mencionar que la respuesta en vagina depende de la fase del ciclo reproductivo, ya que la progesterona favorece la activación de células CD4, lo cual puede afectar la respuesta de anticuerpos (Marks *et al.*, 2011). En nuestro caso, ese problema se eliminó al usar cerdas prepúberes, donde el componente hormonal no jugó un papel relevante.

Cinética de producción

Como segundo objetivo se realizó un análisis longitudinal de cada protocolo para conocer la velocidad de activación de la respuesta inmune y como afectan los

refuerzos mucosales, en sitios determinados, de acuerdo con el lugar de inmunización.

Suero (figura 10)

Como se esperaba, se observó que las dos inmunizaciones SC indujeron una respuesta primaria de IgM, sin embargo, observamos que el protocolo SC/IN presento una caída significativa de IgM a los 28 días, mismo tiempo donde se observó el aumento de IgG e IgA, lo que podría sugerir que la recombinación de genes y cambio de isotipo ocurre más rápido, también este protocolo fue el único en aumentar la producción con el refuerzo mucosal (d42), que es lo que se esperaría ante una infección natural.

El aumento de IgG en suero fue evidente después de las inmunizaciones mucosales, lo que demuestra que también estimulan la respuesta sistémica, sería interesante comparar la expansión de clonas específicas en órganos linfoides con un grupo de inmunización únicamente SC, como Fiorino *et al.* (2013), realizaron en ratones después de dos inmunizaciones SC o IN de OVA y observaron que en la primera semana la proliferación de células fue mayor en el grupo SC pero después de 3 semanas el título de IgG fue igual entre grupos lo que habla de la capacidad de las vía IN de mantener la respuesta sistémica ya que fue el único grupo en no presentar disminución.

Por su parte, el protocolo SC/SL presentó el aumento de IgA hasta los 42 días, esto podría estar relacionado con el factor activador de células B (BAFF), el cual participa en la producción de IgA y se ha observado que disminuye después de la terapia SL para alergias en niños, lo que podría explicar la producción lenta que observamos (Luo *et al.*, 2014).

Moco nasal (figura 11)

Se observó que la secreción de IgM se elevó tardíamente (d49), después del estímulo anamnésico, lo cual podría deberse a que por ser una Ig pentamérica y de mayor tamaño, el transporte a través de SISIP fue lento y el pIgR podría estar

monopolizado por la IgA; además la IgM es más susceptible a la degradación proteolítica ya que no se une covalentemente al componente secretor a diferencia de IgA (Brandtzaeg, 2007). Asimismo, sería interesante estudiar la afinidad de estos anticuerpos ya que se ha observado que la IgM de respuesta secundaria tienen una menor afinidad a los producidos en las primeras semanas, pero mayor capacidad de activar la cascada del complemento (Murakami *et al.*, 2014).

En general la respuesta de IgG mostró variaciones muy marcadas, sobre todo en el protocolo IN, donde tres de los cinco animales no respondieron, así mismo, en los grupos (SL e Ivag), donde hubo un aumento rápido significativo, las concentraciones declinaron posteriormente, lo que podría sugerir que las clonas productoras de IgG en nariz no mantienen ese idiotipo y dan lugar al cambio a IgA (figura 11C). También la IgG podría sufrir una rápida degradación en el ambiente mucosal, por lo que su concentración no sería tan estable (Morgan *et al.*, 1980; Kirkeby *et al.*, 2000), además de que la IgG puede quedar atrapada en el moco mediante la unión de Fcγ (Kobayashi *et al.*, 2002). Finalmente, su paso a la mucosa estaría condicionado por la presencia del FcRn, que en el epitelio nasal porcino está presente y funcional para el paso de IgG (Samson *et al.*, 2012).

La producción de IgA solo fue evidente en el protocolo SC/IN y, sobre todo, después del segundo refuerzo, lo que demuestra que las clonas producidas por la inmunización sistémica e IN de las primeras semanas, generaron en su mayoría células de memoria que se dirigieron y activaron en ese segundo estímulo IN (Fiorino *et al.*, 2013). Esto sugiere que la inmunización SC/IN sería ideal para infecciones respiratorias, ya que genera respuesta amnésica, por lo que cuando el Ag se presente de forma natural se evitaría o disminuiría la infección y sintomatología, además la ruta IN es fácil de aplicar (Hoft *et al.*, 2017). En contraste, los protocolos SC/SL y SC/Ivag parecen más efectivos produciendo respuesta sistémica (figura 6) (Hussain & Ahsan, 2005; Kweon, 2011; Czerkinsky & Holmgren 2012).

Saliva (figura 12)

El aumento significativo de IgM en saliva, en los tres protocolos al día 21, fue muy similar a lo encontrado en la respuesta primaria de suero, las concentraciones en suero fueron mucho mayores pero ambos sitios coincidieron, por lo que se podría utilizar a la saliva como indicador de perfil de respuestas tempranas, tal como Hettegger *et al.*, 2019 observó con la medición de IgG contra antígenos de superficie de hepatitis B. Sabemos que la IgM puede permanecer en bajas concentraciones hasta dos meses después a la exposición del Ag (Isho *et al.*, 2020); nosotros encontramos la disminución al día 42, ya que los linfocitos activados entran a un proceso de recombinación y selección de isotipo que puede ocurrir a partir de los 10 días (Stavnezer *et al.*, 2008). De forma interesante, el refuerzo Ivag fue el único en repuntar la producción lo cual podría deberse a la gran respuesta de IgM en vagina (figura 13) que llegó a saliva tardíamente, lo cual tendríamos que confirmar mediante un estudio de hipermutación somática para ver si se trata de respuesta primaria o secundaria.

El protocolo SC/IN mostró una rápida y fuerte respuesta de IgG que se redujo con el tiempo y no repuntó con el refuerzo mucosal, lo que sugiere que las clonas de memoria alojadas en la mucosa sufren el cambio de isotipo a IgA, como lo muestra la figura 12C, lo cual es posible ya que en humanos se observó que las glándulas salivales son de los órganos mucosales con más secuencias de cambio de la cadena pesada, donde finalmente producen IgA, por lo que durante la maduración y selección de clonas puede haber clonas de IgG (Lin *et al.*, 2014). También se habla que la inmunización IN estimula la secreción de BAFF de las células dendríticas del MALT y del ligando inductor de proliferación (APRIL) que favorecen la producción de IgA, mientras que las mucosas SL y vaginal no cuentan con MALT, lo que explicaría que los protocolos SC/SL y SC/Ivag tuvieran una respuesta menor. En Cho *et al.*, 2010, al duplicar la dosis SL de un antígeno proteico para papiloma en ratones, observaron un aumento en los títulos de saliva para IgA, además del aumento en la concentración de IL-4 que está involucrada en la expresión del pIgR (Schjerven *et al.*, 2000) por lo que se sugiere incrementar nuestra dosis SL para favorecer la secreción de IgA en saliva.

Fluido vaginal (figura 13)

El análisis del fluido vaginal permitió estudiar el alcance y comunicación entre mucosas distantes.

Encontramos que la IgM rápidamente se elevó con el protocolo SC/Ivag, sugiriendo una activación temprana en la mucosa, aun en ausencia de sitios inductores (Wang *et al.*, 2015). Una posible explicación es que las células plasmáticas IgM⁺ al salir de los sitios inductores de la mucosa nasal y SL expresen menos integrinas CCL28 o CCR10 las cuales dirigen las células a la vagina por ecotaxia (Kunkel *et al.*, 2003) y entonces las células que salieron de ganglios caudales, con el protocolo SC/Ivag, por proximidad lleguen mejor, lo cual sería tema de estudio.

En cambio, probablemente las células productoras de IgG e IgA fueron dirigidas más eficientemente a la mucosa vaginal, independientemente del sitio de inmunización y por eso en los tres métodos se detectó el aumento de esos Abs, lo cual nos sugiere la existencia de receptores de ecotaxia específicos para vagina en la ruta IN, SL e Ivag (Marks *et al.*, 2011). Únicamente se observó una respuesta al refuerzo con los protocolos SC/IN y SC/Ivag; aún no se conocen exactamente los factores que permiten en la vagina el establecimiento de células residentes de memoria, las cuales actuarían como centinelas y se activarían rápidamente ante la presencia de un patógeno, se sabe que la inmunización parenteral puede hacerlo hasta por 10 años, como ocurre con las vacunas para papilomavirus, mientras que en estudios con la vía SL (Pedersen *et al.*, 2011) únicamente se ha realizado el análisis a un mes postinmunización; también se ha observado que en las inmunizaciones Ivag e IN se requiere de adyuvante y al menos dos inmunizaciones para aumentar la cantidad de células T CD8⁺ intraepiteliales que participan para dar una respuesta inmediata a los virus (Çuburu *et al.*, 201; Tan *et al.*, 2018).

Por otro lado, hay que considerar que la respuesta en el tracto genital femenino humano y posiblemente del cerdo, esta compartimentalizada, la inmunización Ivag estimularía preferentemente IgA en cérvix, mientras que la IN en vagina, un estudio siguiendo esta línea en cerdos podría aclarar por qué la respuesta al refuerzo fue más rápida en el protocolo SC/IN (Johansson *et al.*, 2001).

Isotipos predominantes en cada protocolo

Las diferencias anatómicas, principalmente el tipo de epitelio en las mucosas, la presencia de sitios inductores y efectores, la integración del SISIP en la exportación de Abs y la estimulación antigénica en esos sitios, juegan un papel en el predominio del isotipo de Abs en cada cavidad (Woodrow *et al.*, 2012). Nosotros analizamos la cantidad e isotipo de Abs secretados en las mucosas inducidos por los tres protocolos de inmunización.

Suero (figura 14)

Fue evidente que la producción sérica de IgG fue la predominante en los tres protocolos empleados, siendo el protocolo Ivag el de concentraciones más altas, posiblemente por la abundancia de ganglios pélvicos que drenan la zona. Cabe recalcar que las inmunizaciones SC inducen una respuesta sistémica que evitaría que los Ags penetren al organismo cuando se da la inmunización o infección local, haciendo la inmunización combinada más segura (Ogra *et al.*, 2001). Además, después de las inmunizaciones mucosales los perfiles de Abs demostraron la capacidad de esas rutas para mantener la respuesta sistémica (Kiyono *et al.*, 1996).

Respecto a la respuesta de IgA, los tres protocolos fueron efectivos en inducirla, manteniendo sus niveles hasta el final del experimento. En los tres protocolos se mantuvo la relación IgG/IgA en sangre, lo cual es importante ya que la IgG responde de manera más agresiva ante infecciones.

En cuanto a la IgM, la producción fue relativamente baja en suero, como esperado en una respuesta que se empezó a medir hasta el día 14 postinmunización, cuando ya debió establecerse la respuesta secundaria al Ag (Stavnezer *et al.*, 2008).

Moco nasal (figura 15)

Las vías respiratorias altas se caracterizan por una abundante respuesta de tipo IgA que se considera el principal isotipo presente en esta mucosa (Brandtzaeg 2007), en nuestro caso, encontramos que la predominancia del isotipo generado dependió de la ruta de inmunización aplicada.

El protocolo SC/IN favoreció la formación de IgA desde el d21 y con mucha claridad después del refuerzo al d42, como respuesta de memoria porque, como ya se ha estudiado, el estímulo en el anillo de Waldeyer y en las tonsilas favorece la expresión de las integrinas CCR10 y $\alpha_4\beta_1$ en las células secretoras de IgA de memoria y son reclutadas hacia la nariz (Kunkel & Butcher 2003).

En el protocolo SC/SL se observó un aumento de IgG en moco nasal al inicio del protocolo, que no se ha reportado en otros estudios hechos por esta vía y coincidente con la fuerte respuesta sérica (figura 6). Pensamos que esa IgG está asociada a la transudación desde circulación o paso a la mucosa mediante el FcRn. (Hervouet *et al.*, 2014). Este efecto se repitió, aunque en menor escala, al d49, después del refuerzo mucosal, lo que sugiere la generación de células de memoria de isotipo IgG en el epitelio nasal como Shimoda *et al.*, 2001 observó en ratones, pero con la inmunización IN.

Por su parte se observó que el protocolo SC/lvag indujo una pobre producción de Igs en nariz, sobre todo de IgA, lo que habla de que los mecanismos de ecotaxia entre mucosas porcinas serían unidireccionales, positivo de nariz a vagina y negativo de vagina a nariz, muy similar a humano y ratones (Gerdts *et al.*, 2006). El NALT y anillo de Waldeyer estimulan la expresión de CCR10 en las ASC y la del receptor CCL28 en el epitelio vaginal (Cha *et al.*, 2011), mientras que la inmunización lvag no promueve en gran medida la migración hacia órganos distales (Pettini *et al.*, 2013).

Saliva (figura 16)

La respuesta generada en saliva fue particularmente interesante. Con el protocolo SC/IN la respuesta IgG con el tiempo declinó, mientras que la de IgA fue en aumento, especialmente después del refuerzo IN al d42, llegando a ser la predominante en la saliva. El cambio de isotipo es un indicativo de la maduración en la respuesta inmune lo cual aumenta la afinidad, en las mucosas es importante el cambio hacia IgA ya que es una Ig no inflamatoria y permite la homeostasis en las mucosas (Puga *et al.*, 2010) facilitando la exclusión inmune.

En contraste, la inoculación SC/SL mostró una baja respuesta de Abs en la saliva, lo que podría relacionarse a la absorción directa del Ag a la circulación por esa vía, lo que favorecería una respuesta sistémica que no tendría demasiada repercusión en la mucosa (Ponzio & Sanders 2017).

Por último, el protocolo SC/lvag indujo niveles similares de IgA e IgG a lo largo del experimento, lo que sugiere que las ASC de ambos isotipos podrían compartir las mismas señales de ecotaxia hacia glándula salival o también podrían ser producto de la transudación sanguínea por la alta respuesta en suero. Del mismo modo podemos deducir que el alcance de la inmunización lvag es reducido, no llega hasta ganglios cervicales (Pettini *et al.*, 2013) y moco nasal, pero consigue alcanzar a la saliva (Kozlowki *et al* 1997) lo que habla de los patrones mucosales en la respuesta compartimentalizada, ya que la inmunización lvag si alcanza para saliva pero no es suficiente para dar respuesta en nariz lo cual evidencia las diferencias entre nicho nasal y bucal.

Fluido vaginal (figura 17)

En la cavidad vaginal, se confirmó el predominio de la IgG, independientemente de la vía de inmunización. Se cree que en las mucosas de tipo 2, como la vaginal, el transporte de IgA es menor ya que no se ha identificado el SISIP y hay baja expresión del pIgR, el cual se encarga del transporte de este isotipo (Woodrow *et al.*, 2012; Horton & Vidarsson, 2013; Armitage *et al.*, 2017), es por ello que sería interesante realizar un estudio histológico para conocer el origen de los Abs, ya sea local, sintetizado por células plasmáticas *in situ* o desde circulación; otra posible explicación es la de Fahrbach *et al.*, 2013, que observaron mayor estabilidad de IgG en el moco cervicovaginal comparada con la de IgA, por lo que esta última podría degradarse con mayor facilidad, quizás por el pH vaginal; al igual que la IgG puede derivarse de la transudación sistémica ya que en humano y ratón, tanto en útero como en vagina, se encuentra el FcRn (Li *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

La relevancia de este trabajo radica en la comparación de distintos protocolos combinados de inmunización, que parten de la generación común de clones de células productoras de Abs, específicas de Ag, a través de la inoculación SC y su posterior reclutamiento selectivo en las mucosas de interés con reestímulos (refuerzos) antigénicos administrados por vía mucosal, generando primero una respuesta sistémica y, posteriormente una mucosal para, en conjunto, inducir una respuesta inmunitaria integral que proteja al individuo internamente (inmunidad sistémica) y en las vías de entrada de patógenos (mucosas del organismo), para evitar su implantación, proliferación y paso al interior del organismo.

Como primer objetivo se compararon los tres protocolos sistémico-mucosales, los cuales fueron capaces de estimular la respuesta inmune de forma integral, es decir tanto en suero como en mucosas y sin el uso de adyuvantes tóxicos, ni cantidades altas de Ag. Se observó que, de acuerdo con la ruta de inoculación, existieron diferencias en la cantidad de Abs presentes en cada fluido.

En el suero todos los protocolos estimularon la respuesta sistémica, y además las inmunizaciones mucosales mantuvieron esos niveles, con lo que se confirma que estos protocolos son una buena opción para inducir la respuesta sistémica y que, para producir respuestas altas, es importante estimular los ganglios linfáticos ya que la mejor respuesta fue mediante el protocolo SC/lvag.

Por su parte, en mucosas la mejor estrategia fue la estimulación del MALT, como lo hace la inmunización IN, este método induce particularmente la IgA en moco nasal y saliva y además alcanza a la vagina, por lo que representaría una opción atractiva para el diseño de vacunas polivalentes contra patógenos que entren y afecten esas mucosas. Al mismo tiempo, el protocolo SC/lvag parece idóneo cuando se busca una abundante respuesta humoral en suero y vagina, ya que produjo las más altas cantidades de IgG e IgA en esos sitios

A pesar de que se reporta en la bibliografía que la ruta SL produce una respuesta muy similar a la IN en ratones, en nuestro estudio en cerdos no existió reciprocidad de respuestas entre esos protocolos, por lo que se confirma que existen

particularidades inmunológicas entre especies, lo que conlleva al uso de mejores modelos animales traslacionales para humanos.

Por su parte, la respuesta en vagina de IgA e IgG con los tres protocolos habla de la comunicación entre la mucosa nasal, SL y vaginal y su posible uso para tratamientos terapéuticos, sin embargo, solo los protocolos SC/IN y SC/lvag pudieron montar respuesta anamnésica, que es lo que se busca para prevenir infecciones de transmisión sexual.

De estos métodos el SC/lvag solo protegería al sector femenino pero podría emplearse también para infecciones postparto que, en la producción animal generan grandes pérdidas; por su parte el SC/IN sería para toda la población y además, las inmunizaciones son sencillas de aplicar.

Con el estudio de la cinética de producción, concluimos que la rapidez con que se producen los Ab depende de la mucosa inmunizada; con el protocolo SC/IN se favorece la respuesta secundaria de IgA, mientras que con el SC/SL la respuesta es sérica y lenta en mucosas, siendo la más evidente la local de tipo primaria IgM.

Finalmente se caracterizaron los perfiles de Abs generados en los tejidos mucosales para analizar si las vías de inmunización favorecen perfiles particulares.

Tanto en nariz como en saliva se presentaron variaciones en el isotipo del Ab predominante y al parecer los sitios inductores regulan la predominancia y relación IgA/IgG, mientras que la vagina mantiene el mismo perfil con predominancia de IgG independientemente de la vía de inmunización.

En general concluimos que la respuesta en mucosas está compartimentalizada, es decir, existen patrones específicos de migración y comunicación entre sitios inductores y efectores. Además, nuestros resultados hablan de la importancia de comparar métodos para la búsqueda de respuestas particulares y que debe tomarse en cuenta en el diseño de los esquemas de vacunación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcón VL, Baca-Estrada ME, Vega-López MA, Willson P, Babiuk LA, Kumar P & Foldvari M (2005). Intranasal immunization using biphasic lipid vesicles as delivery systems for OmlA bacterial protein antigen and CpG oligonucleotides adjuvant in a mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **57**: 955-961.
- Alcón VL, Baca-Estrada ME, Vega-López MA, Willson P, Babiuk LA, Kumar P, Hecker R & Foldvari M (2005). Mucosal delivery of bacterial antigens and CpG oligonucleotides formulated in biphasic lipid vesicles in pigs. *The AAPS Journal* **7**(3): E566-E571.
- Alexander NJ, Baker E, Kaptein M, Karck U, Miller L & Zampaglione E (2004). Why consider vaginal drug administration? *Fertility and Sterility* **82**: 1-12.
- Anjuère F., Bekri S., Bihl F., Braud VM., Cuburu N., Czerkinsky C., Hervouet C. & Luci C (2012). B cell and T cell immunity in the female genital tract: Potential of distinct mucosal routes of vaccination and role of tissue-associated dendritic cells and natural killer cells. *Clinical Microbiology and Infection* **18**: 117-122.
- Armitage CW, O'Meara CP & Beagley KW (2017). Chlamydial infection enhances expression of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) and transcytosis of IgA. *American Journal of Reproductive Immunology* **77**: 1-8.
- Brandtzaeg P (1985). Role of J chain and secretory component in receptor mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man. *Scand J Immunol* **22**: 111-146.
- Brandtzaeg P (2007). Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences* **1098**: 288-311.
- Brandtzaeg P (2009). Mucosal immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scandinavian Journal of Immunology* **70**: 505–515.

- Brandtzaeg P (2011). Potential of Nasopharynx-associated Lymphoid Tissue for Vaccine Responses in the Airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **183**: 1595-1604.
- Catanzaro JR, Strauss JD, Bielecka A, Porto AF, Lobo FM, Urban A, Schofield WB, Palm NW (2009). IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Scientific Reports* **9**: 1-10.
- Cha HR, Ko HJ, Kim ED, Chang SY, Seo SU, Cuburu N, Ryu S, Kim S & Kweon MN (2011). Mucosa-Associated Epithelial Chemokine/CCL28 Expression in the Uterus Attracts CCR10⁺ IgA Plasma Cells following Mucosal Vaccination via Estrogen Control. *The Journal of Immunology* **187**(6): 3044-3052.
- Cho HJ, Kim J-Y, Lee Y, Kim JM, Kim YB, Chun T & Oh Y-K (2010). Enhanced humoral and cellular immune responses after sublingual immunization against human papillomavirus 16 L1 protein with adjuvants. *Vaccine* **28**(14): 2598-2606.
- Crowe TP, Greenlee MHW, Kanthasamy AG & Hsu WH (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences* **195**: 44-52.
- Çuburu N, Kweon M, Song JH, Hervouet C, Luci C, Sun JB, Hofman P, Holmgren J, Anjuere F & Czerkinsky C (2007). Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* **25**: 8598-8610.
- Çuburu N, Kweon MN, Hervouet C, Cha H-R, Pang Y, Holmgren J, Stadler K, Schiller JT, Anjuère F & Czerkinsky C (2009). Sublingual Immunization with Nonreplicating Antigens Induces Antibody-Forming Cells and Cytotoxic T Cells in the Female Genital Tract Mucosa and Protects against Genital Papillomavirus Infection. *The Journal of Immunology* **183**(12): 7851-7859.
- Curran RM, Donnelly L, Morrow RJ, Fraser C, Andrews G & Cranage M (2009). Vaginal delivery of the recombinant HIV-1 clade-C trimeric gp140 envelope protein CN54gp140 within novel rheologically structured vehicles elicits specific immune responses. *Vaccine* **27**: 6791–8.

- Czerkinsky C & Holmgren J (2012). Mucosal delivery routes for optimal immunization: Targeting Immunity to the right tissues. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **354**: 1-18.
- De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D, Girolamo A, & Cassone A (2002). Intravaginal and intranasal immunizations are equally effective in inducing vaginal antibodies and conferring protection against vaginal candidiasis. *Infection and Immunity* **70**: 2725-2729.
- Dirección general de epidemiología DGE (2019). Boletín Epidemiológico No. 52 Vol. 36
- Fahrbach KM, Malykhina O, Stieh DJ & Hope TJ (2013). Differential Binding of IgG and IgA to Mucus of the Female Reproductive Tract. *PloS One* **8**(10): 1-11.
- Fiorino F, Pettini E, Pozzi G, Megagliani D & Ciabattini A (2013). Prime-boost strategies in mucosal immunization affect local IgA production and the type of Th response. *Frontiers in Immunology* **4**: 1-8.
- Gallichan WS, Woolstencroft RN, Guarasci T, Mc Cluskie MJ, Davis HL & Rosenthal KL (2001). Intranasal Immunization with CpG Oligodeoxynucleotides as an Adjuvant Dramatically Increases IgA and Protection Against Herpes Simplex Virus-2 in the Genital Tract. *The Journal of Immunology* **166**: 3451-3457.
- Gerdts V, Mutwiri G, Tikoo S & Babiuk L (2006) Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Veterinary Research* **37**(3): 487-510.
- Guerrero RA, Ball JM, Krater SS, Pacheco SE, Clements JD, & Estes MK (2001). Recombinant Norwalk Virus-Like Particles Administered Intranasally to Mice Induce Systemic and Mucosal (Fecal and Vaginal) Immune Responses. *Journal of Virology* **75**: 9713-9722.
- Guzmán-Bautista ER, García-Ruiz CE, Gama-Espinosa AL, Ramírez-Estudillo MC, Rojas-Gomez OI & Vega-López MA (2014). Effect of age and maternal antibodies on the systemic and mucosal immune response after neonatal immunization in a porcine model. *Immunology* **141**(4): 609-616.

- Guzmán-Bautista ER, Ramírez-Estudillo MC, Rojas-Gomez OI & Vega-López MA (2015). Tracheal and bronchial polymeric immunoglobulin secretory immune system (PISIS) development in a porcine model. *Developmental and Comparative Immunology* **53**(2): 271-282.
- Hervouet C, Luci C, Bekri S, Juhel T, Bihl F, Braud VM, Czerkinsky C, & Anjuere F (2014). Antigen-bearing dendritic cells from the sublingual mucosa recirculate to distant systemic lymphoid organs to prime mucosal CD8 T cells. *Mucosal Immunology* **7**: 280-291.
- Hettegger P, Huber J, Pabecker K, Soldo R, Kleger U, Nöhammer C, & Weinhausel (2019). High similarity of IgG antibody profiles in blood and saliva opens opportunities for saliva based serology. *Plos One* **14**: 1-17.
- Hoft DF, Lottenbach KR, Blazevis A, Turan A, Blevins TP, Pacatte TP, Yu Y, Mitchell MC Hoft SG & Belshe RB (2017). Comparisons of the Humoral and Cellular Immune Responses Induced by Live Attenuated Influenza Vaccine and Inactivated Influenza Vaccine in Adults. *Clinical and Vaccine Immunology* **24**: 1-9.
- Holmgren J & Czerkinsky C (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine Supplement* **11**(4): 45-53.
- Horton RE & Vidarsson (2013). Antibodies and their receptors: Different potential roles in mucosal defense. *Frontiers in Immunology* **4**: 1-13.
- Hussain A & Ahsan F (2005). The vagina as a route for systemic drug delivery. *Journal of Controlled Release* **103**: 301-313.
- Isho B, Abe KT, Zuo M, Jamal AJ, Rathod B, Wang JH, Li Z, Chao G, Rojas OL et al., (2020). Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Science Immunology* **5** (52): 1-21.
- Iwasaki A (2010). Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nature Reviews Immunology* **10**: 699-711.
- Johansen MD, Irving A, Montagutelli X, Tate MD, Rudloff I, Nold MF, Hansbro NG, Kim YR, Donovan C, Liu G, et al., (2020). Animal and translational

models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunology* **13**: 877-891.

- Johansson EL, Wassén L, Holmgren J, Jertborn M & Rudin A (2001). Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infection and Immunity* **69**: 7481-7486.
- Kaushic C & Nguyen PV (2016). Immunology of the female reproductive mucosa. *Encyclopedia of Immunobiology* **5**: 63-72.
- Kirkeby L, Rasmussen TT, Reinholdt J & Kilian M (2000). Immunoglobulins in nasal secretions of healthy humans: Structural integrity of secretory immunoglobulin A1 (IgA1) and occurrence of neutralizing antibodies to IgA1 proteases of nasal bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **7**: 31-39.
- Kiyono H, Ogra PL, & McGhee JR (1996). *Mucosal vaccines*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Kiyono H & Azegami T (2015), The mucosal immune system: From dentistry to vaccine development. *The Japan Academy* **91**(8): 423-439.
- Kobayashi K, Ogata H, Morikawa M, Iijima S, Harada N, Yoshida T, Brown WR, Inoue N, Hamada Y, Ishii H, Watanabe M & Hibi T (2002). Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. *Gut* **51**: 169-177.
- Kono Y, Suzuki S, Mukai T, Okazaki K, Honda E, & Yamashiro T (1994). Detection of specific systemic and local IgG and IgA of pigs after infection with *Bordetella bronchiseptica* by ELISA. *Journal of Veterinary Science* **56**: 249-253.
- Kozlowski PA, Cu-Uvin S, Neutra MR & Flanigan TP (1997). Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infection and Immunity* **65**(4): 1387-1394.
- Kraan H, Soema P, Amorij JP & Kersten G (2017). Intranasal and sublingual delivery of inactivated polio vaccine. *Vaccine* **35**: 2647-2653.

- Krugmann S, Pleass RJ., Atkin JD & Woof JM (1997). Structural requirements for assembly of dimeric IgA probed by site-directed mutagenesis of J chain and a cysteine residue of the α chain CH2 domain. *Journal of Immunology* **159**: 244–249.
- Kunkel EJ & Butcher EC (2003). Plasma cell homing. *Nature Reviews Immunology* **3**(10): 822-829.
- Kweon M (2011). Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. *Cytokine* **54**: 1-5.
- Li M, Wang Y, Sun Y, Cui H, Zhu SJ & Qiu H-J (2020). Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunology Letters* **217**: 116-125.
- Li Z., Palaniyandi S., Zeng R., Tuo W., Roopeniand DC & Zhu X (2011). Transfer of IgG in the female genital tract by MHC Class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4388-4393.
- Lin M, Du L, Brandtzaeg P, & Pan-Hammarström Q (2014). *Mucosal Immunology* **7**(3): 511-520.
- Liu Y, Hammer LA, Liu W, Hobbs MM, Zielke RA, Sikora AE, Jerse AE, Egilmez NK & Russell MW (2017). Experimental vaccine induces Th1-driven immune responses and resistance to *Neisseria gonorrhoeae* infection in a murine model. *Mucosal Immunology* 1-15.
- Luo R, Liu W, Wang J, Chen Y, Sun C, Zhou L, Li Y, & Deng L (2014). Role of BAFF in pediatric patients with allergic rhinitis during sublingual immunotherapy. *European Journal of Pediatrics*. **173**(8): 1033-1040.
- Lycke N (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations. *Nature Reviews Immunology* **12**: 592–605.
- Marks EM, Helgeby A, Andersson JO, Schön K, & Lycke NY (2011). CD4+ T cell immunity in the female genital tract is critically dependent on local mucosal immunization. *European Journal of Immunology* **41**: 2642–2653.

- Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, Nagano H, Miyashita K & Kurono Y (2018). Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx* **45**(2): 273-280.
- Mestecky J, Russell MW & Elson CO (2007). Perspectives on Mucosal Vaccines: Is Mucosal Tolerance a Barrier? *Journal Immunology* **179**: 5633–5638.
- Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L & Gerdtts V (2012). The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology* **20**(1): 50-57.
- Michaelsen TE, Emilsen S, Sandin RH, Granerud BK, Bratlie D, Ihle O & Sandlie I (2017). Human Secretory IgM Antibodies Activate Human Complement and Offer Protection at Mucosal Surface. *Scandinavian Journal of Immunology* **85**: 43-50.
- Minges Wols H (2005). Plasma cells. *Encyclopedia of life sciences* 1-8.
- Morgan KL, Hussein A, Newby TJ & Bourne FJ (1980). Quantification and origin of the immunoglobulins in porcine respiratory tract secretions. *Immunology* **41**(3): 729-736.
- Mudgal R, Nehul S & Tomar S (2020). Prospects for mucosal vaccines: shutting the door on SARS-CoV-2. *Hum Vaccin Immunother.* **16**(12): 2921-2931.
- Murakami A, Moriyama H, Osako-Kabasawa M, Endo K, Nishimura M, Udaka K, Muramatsu M, Honjo T, Azuma T, & Shimizu T (2014). Low-affinity IgM antibodies lacking somatic hypermutations are produced in the secondary response of C57BL/6 mice to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl hapten. *International Immunology.* **26**(4): 195-208.
- Norderhaug IN, Johansen FE, Schjerven H, Brandtzaeg P (1999). Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev Immunol.* **19**:481–508.
- Ogra PL, Faden H & Welliver R (2001). Vaccination Strategies for mucosal immune responses. *Clinical Microbiology Reviews* **14**(2):430-445.
- Palomares RA, Hurley DJ, Crum LT, Rollin E, Collop T, Williard A, Felton J, Parrish J & Corbeil LB (2017). Serum, uterine,

and vaginal mucosal IgG antibody responses against *Tritrichomonas foetus* after administration of a commercial killed whole T foetus vaccine in beef cows. *Theriogenology* **87**: 235-241.

- Passalacqua G, Bagnasco D & Canonica GW (2019). 30 Years Of Sublingual Immunotherapy. *Allergy* **74**(5): 1107-1120.
- Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B & Paul S (2012). New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* **30**: 142-154.
- Pedersen G & Cox R (2012). The mucosal vaccine quandary: Intranasal vs. sublingual immunization against influenza. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* **8**(5): 689-693.
- Pedersen GK, Ebesen T, Gjeraker IH, Svindland S, Bredholt G & Guzmán CA (2011). Evaluation of the sublingual route for administration of influenza H5N1 virosomes in combination with the bacterial second messenger c-di-GMP. *PloS One* **6**: 26973.
- Pettini E, Prota G, Ciabattini A, Boianelli A, Fiorino F, Pozzi G, Vicino A & Medagliani D (2013). Vaginal Immunization to Elicit Primary T-Cell Activation and Dissemination. *PloS One*. **8**(12):1-10.
- Pozzi PS & Alborali GL (2012). Reproductive diseases in sows (*Sus scrofa domestica*): A Review. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. **67**: 24-33.
- Puga I, Cols M & Cerutti A (2010). Innate signals in mucosal immunoglobulin class switching. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **126**(5): 889-895.
- Ponzio TA & Sanders JW (2017). The salivary gland as a target for enhancing immunization response. *Tropical Diseases Travel Medicine Vaccines*. **3**: 4.
- Rauch S, Jasny E, Schmidt KE & Petsch B (2018). New vaccine technologies to combat outbreak situations. *Frontiers in Immunology* **9**: 1-24.
- Salinas Zacarías Iván (2011). Análisis de la respuesta inmune de anticuerpos en suero y de linfocitos T en pulmón ante la vacunación y desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos convencionales destetados. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.

- Salinas ZI, Guzmán-Bautista ER, Ramírez EM, Chacón SR & Vega LM (2020). Mucosal and systemic immune responses to Aujeszky's disease virus (ADV) in early vaccinated piglets. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **68**: 101400.
- Samson G, García de la Calera A, Dupuis-Girod S, Faure F, Decullier E, Paintaud G, Vignault C, Scoazec JY, Pivot C, Plauchu H, & Pirot F (2012). Ex vivo study of bevacizumab transport through porcine nasal mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **80**(2): 465-469.
- Schjerven H, Brandtzaeg P, & Johansen FE (2000). Mechanism of IL-4-Mediated Up-Regulation of the Polymeric Ig Receptor: Role of STAT6 in Cell Type-Specific Delayed Transcriptional Response. *The Journal of Immunology* **165**(7): 3898-3906.
- Shimoda M, Nakamura T, Takahashi Y, Asanuma H, Tamura S, Kurata T, Mizuochi T, Azuma N, Kanno C & Takemori T (2001). Isotype-specific selection of high affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue. *Journal of Experimental Medicine* **194**(11): 1597-1607.
- Song JH, Kim JI, Kwon HJ, Shim DH, Parajuli N, Cuburu N, Czerkinsky C & Kweon MN (2009). CCR7-CCL19/CCL21-Regulated Dendritic Cells Are Responsible for Effectiveness of Sublingual Vaccination. *The Journal of Immunology* **182**: 6851-6860.
- Stavenezer J, Guikema JEJ, & Schrader CE (2008). Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annual Review of Immunology*. **26**: 261-292.
- Stricker-Krongrad A., Shoemale CR & Bouchard GF (2016) The Miniature Swine as a Model in Experimental and Translational Medicine. *Toxicol Pathol.* **44**: 612-623.
- Strugnell RA & Wijburg OL (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature Review Microbiology* **8**: 656-667.
- Swindle MM (2007) *Swine in the Laboratory*. CRC Press, Boca Raton

- Tan HX, Wheatley AK, Esterbauer R, Jegaskanda S, Glass JJ, Masopust D, De Rose R & Kent SJ (2018). Induction of vaginal-resident HIV-specific CD8 T cells with mucosal prime-boost immunization. *Mucosal immunity* **11**(3): 994-1007.
- Vega MA & Ramírez MC (2018). No. 355566. CDMX, México. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.
- Wang YY, Kannan A, Nunn KL, Murphy MA, Subramani DB, Moench T, Cone R & Lai SK (2014). IgG in cervicovaginal mucus traps HSV and prevents vaginal Herpes infections. *Mucosal Immunology* **7**: 1036-1044.
- Wang Y, Sui Y, Kato S, Hogg AE, Steel JC, Morris JC & Berzofsky JA (2015). Vaginal type-II mucosa is an inductive site for primary CD8+ T-cell mucosal immunity. *Nature Communications* **6**: 1-13.
- Wegmann F, Krashias G, Lühn K, Laamanen K, Vieira S & Jeffs SA (2011). A novel strategy for inducing enhanced mucosal HIV-1 antibody responses in an anti-inflammatory environment. *PloS One* **6**: 158-61.
- Wilson H & Obradovic (2014). Evidence for a common mucosal immune system in the pig. *Molecular Immunology* **66**: 22-34.
- Wira CR, Rodriguez-García M & Patel MV (2015). The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nature Reviews* **15**: 4 217-230.
- Woff JM & Mestecky J (2015). Chapter 17. Mucosal Immunoglobulins. Elsevier USA. Pp. 287-314.
- Woodrow KA, Bennett KM & D.Lo D (2012). Mucosal Vaccine Design and Delivery. *Annual Review of Biomedical Engineering* **14**: 17-46.
- Wu HY, Abdu S, Stinson D & Rusell MW (2000). Generation of female genital tract antibody responses by local or central (common) mucosal immunization. *Infect Immun.* **68**(10): 5539-5545.
- Yuan LJ, Geyer A, Hodgins DC, Fan ZQ, Qian Y, Chang KO, Crawford SE, Parreno V, Ward LA, Estes MK, Conner ME & Saif LJ (2000). Intranasal

administration of 2/6-rotavirus-like particles with mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT-R192G) induces antibody-secreting cell responses but not protective immunity in gnotobiotic pigs. *J Virol.* **74**: 8843–8853.

- Zhai L & Tumban E (2016). Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. *Antiviral Research* **130**: 101-109.