



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

**“Análisis de la respuesta de los linfocitos T a la infección por  
Circovirus porcino tipo 2”**

Tesis que presenta:

Fernando Calderón Rico

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

Directora de tesis:

Dra. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA

Co-director:

Dr. ALEJANDRO BRAVO PATIÑO

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO.

MARZO DE 2020.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS _____	3
ÍNDICE DE TABLAS _____	3
LISTA DE ABREVIATURAS _____	4
Abstract _____	9
Resumen _____	10
2.- Antecedentes _____	12
2.1.- El complejo respiratorio porcino (CRP) y su Importancia económica. ____	12
2.2.- Historia del Circovirus porcino. _____	15
2.3.- Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2). _____	17
2.4.- Prevalencia de PCV2. _____	19
2.4.1.- Prevalencia de PCV2 a nivel mundial. _____	19
2.4.2.- Prevalencia de PCV2 en México. _____	20
2.5.- Transmisión del virus PCV2. _____	21
2.6.- Genoma de PCV2. _____	22
2.7.- Replicación de PCV2. _____	23
2.8.- Células blanco de PCV2. _____	24
2.9.- Evasión del sistema inmune innato mediado por el mecanismo de inhibición alostérica por los motivos CpG. _____	26
2.9.1- Evasión del sistema inmune y tolerancia inmunitaria mediada por el mecanismo de inhibición de células dendríticas en las tonsilas. _____	28
2.10.- Respuesta inmune celular antiviral. _____	31
2.10.1.- Respuesta inmune antiviral mediada por IFN $\gamma$ . _____	32
2.11.- Mecanismo de maduración y proliferación de linfocitos T CD4+, a través del factor de transcripción T-bet (T-box). _____	40
3.- Justificación _____	41
4.- Hipótesis _____	41
5.- Objetivo general _____	41
5.1.- Objetivos específicos _____	41
6.- Materiales y métodos _____	42
6.1.-Materiales _____	42
6.2.-Oligonucleótidos _____	43

6.3.- Metodología	43
6.4- Métodos	46
7.- Resultados	50
8.-Discusión	59
10.-Conclusión	65
11.- Bibliografía	66
12.- Anexos	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Conteo de linfocitos CD4+ durante la infección por PCV2.	25
Figura 2.- Activación e inhibición de TLR9	27
Figura 3.- Modelo de infección de PCV2, inhibición de la expresión de IL-12p40 en macrófago alveolar porcino para posteriormente suprimir la respuesta de Th1.	39
Figura 4.- Localización de las granjas del muestreo	50
Figura 5.- Ganancia de peso en cada etapa del desarrollo.	51
Figura 6.- Células PCV2+ de cerdo en las diferentes etapas del crecimiento.	52
Figura 7.- Inmunodetección de los principales agentes del CRP.	53
Figura 8.- Poblaciones celulares mononucleares aisladas de sangre periférica.	55
Figura 9.- Población celular de células CD4+ de los dos grupos PCV2- (control) y PCV2+ (PCV2) en las diferentes etapas de desarrollo.	56
Figura 10.- Expresión de T-bet, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 y GATA3 en las diferentes etapas de desarrollo en los dos grupos PCV2- (control) y PCV2+ (PCV2).	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- País de origen de diferentes aislados de PCV2 y su correspondiente genotipo actual.	17
Tabla 2.- Lista de reactivos.	42
Tabla 3.- Secuencias de <i>oligonucleótidos</i>	43

Tabla 4.- Causas asociadas a la pérdida de peso en los animales infectados con PCV2. ....	51
Tabla 5.-Anticuerpos contra microorganismos asociados al CRP.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
Con-A	Concavalina A
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta AMP cíclico
CRP	Complejo Respiratorio Porcino
CSF	Fiebre porcina clásica
DC	Células dendríticas
FIV	Virus de la inmunodeficiencia felina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GATA3	Factor de transcripción GATA3
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IL-10	Interleucina diez
IL-12	Interleucina doce
IL-4	Interleucina cuatro
ISH	Hibridación in situ
M $\Phi$	Macrófago
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
NK	Célula natural asesina
ORF	Marco de lectura abierto
Ori	Origen de replicación
PAMPS	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV2	Circovirus Porcino Tipo dos
PCVAD	Enfermedades asociadas a PCV2
PCVD EU	Comisión Europea para las enfermedades relacionadas con PCV2
PPV	Parvovirus Porcino
PRCV	Coronavirus Porcino
PRRSV	El Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
PRV	Virus de la Pseudorabia Porcina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SIV	Virus de la Influenza Porcina
SPF	Organismo libre de patógenos específicos
T-bet	Factor de transcripción T-bet
TBX21	Factor de transcripción T-bet
Th1	Linfocito cooperador tipo 1
Th2	Linfocito cooperador tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll

Fui nadie, no era nada, pero  
Todo empezó por una idea, un sueño. Para mí imposible...  
Trabajé tanto, me esforcé, tanto que...  
Llegue al límite de mi cuerpo, de la mente, incluso hasta romperse.  
Pero algo dentro de mí persistió, quizá fue mi alma.  
Lo hizo como una pequeña vela en la oscuridad.  
No perdí la esperanza y seguí.

Sigue tus sueños, trabaja en ellos, porque si se cumplen  
Yo te lo aseguro.

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por facilitarme mi formación superior y de posgrado. A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por las facilidades para la realización de este trabajo. Este trabajo fue realizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita y la Codirección del Dr. Alejandro Bravo Patiño. Agradecemos a la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES-UNAM) unidad león. Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. Al Centro de Investigaciones Biomédicas de Michoacán (CIBIMI).

Al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB).

A mi mesa sinodal la Dra. Yunuen Quintero Silva, al Dr. José Miguel Cervantes Alfaro, a mi co-tutor el Dr. Alejandro Bravo Patiño y en especial a la Dra. Ilane Hernández Morales, a mi tutora la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita por tomarse el tiempo para la revisión de mi trabajo, a todos ustedes gracias, muchas gracias.

Agradecemos el apoyo parcial a la CIC-UMSNH 2019.

También al apoyo CONACYT Ciencia Básica 2018-2019 (A1-S-43236).

A la Unidad de Proteómica y Bioingeniería Celular CONACYT infraestructura (INFR-2015-01-255010).

Al proyecto PAPIIT-UNAM IA0751.

A la Red Farmoquímicos por la beca de movilidad con el número de solicitud Est-002-18 para realizar estancia de investigación.

También al otorgamiento de las facilidades de las granjas de Michoacán y Guanajuato.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca Nacional (Tradicional) 2018-1 (2018-2020) con número de becario 704097 y número de CVU 872452.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi familia, por haberme tenido paciencia y por haberme apoyado siempre, aunque a veces dudaron de mí, nunca me negaron nada.

A mis padres, por quererme tanto, por haberme dado una excelente educación, por ser excelentes padres para mí, por guiarme y aunque tengan defectos, enseñarme valiosas lecciones.

A mi hermana menor, por escucharme y soportar mi carácter.

A la Doctora Rosa Elvira Núñez Anita, por aceptarme para que realizara un gran proyecto, por tenerme muchísima paciencia y siempre estar ahí para explicarme como se hacen las cosas, por orientarme, por su apoyo, sus consejos, sus regaños y por brindarme su confianza.

A mis compañeros y amigos del CMEB por su apoyo, muy en especial a Francisco Perez D. (pancho) que siempre me saco de dudas y me apoyo durante mi estancia en la maestría.

A mis amigas y amigos que han estado en todo momento conmigo para apoyarme.

Y muy en especial a todas esas personas que intentaron hacerme tropezar y no creyeron en mí, porque solo me fortalecieron y me ayudaron a superarme.

A todos los que me regalaron reactivo y apoyaron indirectamente al proyecto.

A mi Fernando del pasado, no fue como se planeó, pero estarías orgulloso.

Que más les puedo decir, gracias, Muchas gracias!.



## Abstract

Porcine Circovirus type 2 has been associated with diseases that cause in pigs growth failure and respiratory problems. One of the evasion mechanisms of the immune response is that PCV2 can remain in the pig tonsils and remerge after years. T lymphocytes (CD4+) are target cells of PCV2 that can contribute to the maintenance of viremia. The differentiation of the CD4+ cells toward Th1 phenotype depends on the expression or repression of the T-bet transcription factor, which directly regulates IFN $\gamma$  expression. At present, are unknown the mechanisms of subversion of the immune response that facilitate the persistence of PCV2 during different stages of development in PCV2+ infected animals. The objective of the present work was: Analyze the relation between T-bet and IFN $\gamma$  in CD4+ cells obtained by positive selection from PCV2 + and PCV2- (Control) animals, both groups was divided into three clusters: maternal weaning (DMT), Initiation (INI) and growth (CRE). In addition, PCV2 cells infected were evaluated and the state of health too by the measurement of the total monocytes and lymphocytes. METODS: serum and blood were obtained from 48 pigs of both groups, PCV2+ (Michoacán) and PCV2- (Guanajuato). Mononuclear populations were analyzed and immunodetection of PCV2 was performed by flow cytometry. Quantitative PCR was performed to measure the expression of T-bet, GATA3, IFN $\gamma$ , IL-4 and IL-10. RESULTS: The number of PCV2 + cells was lower in DMT, and increased in INI and CRE. Cell populations indicated that the number of macrophages increased in all three stages and the number of lymphocytes in DMT and INI were maintained, compared to control animals. Which suggests that PCV2+ animals in the DMT and INI stage could have a better antiviral response compared to CRE. On the other hand, the overexpression of T-bet and the repression of IFN $\gamma$  were observed in the three stages studied, accompanied by the overexpression of IL-4 in the INI and CRE stages, suggesting that, in INI and CRE the IL-4 could favor antiapoptotic signaling pathways. The above is consistent with the increase in CD4 + cells. However, the expression of IL-10 was observed without changes in the DMT stage and decreases in INI and CRE, suggesting this interleukin is not involved in the repression of IFN $\gamma$  locally. While GATA3 showed no changes. In summary, the data suggests that

---

although the CD4 + / Th1 phenotype could be favored, mediated by the expression of T-bet at all stages, other pathways could be favoring IFN $\gamma$  repression, such as the pathways regulated by the expression of IL-4.

## Resumen

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), está asociado a diversas enfermedades que cursan con retraso en el crecimiento y problemas respiratorios en cerdos. Como parte de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune, PCV2 puede permanecer en tonsilas en cerdos y reemerger años después. Las células blanco incluyen a los linfocitos T (CD4+), los cuales podrían contribuir al mantenimiento de la viremia. La diferenciación del linfocito CD4+ hacia en fenotipo Th1 depende de la expresión/represión del factor de transcripción T-bet, el cual regula directamente la expresión de IFN $\gamma$ . Hasta el momento no se conocen los mecanismos de subversión de la respuesta inmune que facilitan la persistencia del PCV2 durante diferentes etapas de desarrollo en animales PCV2+ infectados. OBJETIVO: Analizar la relación entre la expresión de T-bet e IFN $\gamma$  en células CD4+ obtenidas por selección positiva a partir de animales PCV2+ y PCV2- (Control), en los grupos experimentales: destete (DMT), Iniciación (INI) y crecimiento (CRE). Además, evaluar las células positivas al virus PCV2+ y determinar el estado de salud del animal a través de la medición de monocitos y linfocitos totales. MÉTODOS: Se obtuvo suero y sangre total de 48 individuos. Granja PCV2+ (Michoacán), granja PCV2- (Guanajuato). Se cuantificaron las poblaciones de células mononucleares y se realizó la inmunodetección de PCV2 por citometría de flujo. Mediante PCR cuantitativa se midió la expresión de T-bet, GATA3, IFN $\gamma$ , IL-4 y IL-10. RESULTADOS: El número de células PCV2+, fue menor en DMT, y aumentó en INI y CRE. Las poblaciones celulares indican que aumentó el número de monocitos en las tres etapas y se mantiene el número de linfocitos en DMT e INI, comparado con los animales control. Lo cual sugiere que los animales PCV2+ en la etapa DMT e INI, podrían tener una mejor respuesta antiviral comparada con CRE. Por otro lado, se observó la sobre-expresión de T-bet y la represión de IFN $\gamma$  en las tres etapas estudiadas, acompañado de la sobreexpresión de IL-4 en las etapas INI y CRE,

---

sugiriendo que, en INI y CRE la IL-4 podría favorecer vías señalización antiapoptóticas. Lo anterior concuerda con el aumento de células CD4+. Sin embargo, la expresión de IL-10 se observa sin cambios en la etapa DMT y disminuye en INI y CRE, sugiriendo esta interleucina no está involucrada en la represión de IFN $\gamma$  a nivel local. Mientras que GATA3 no mostró cambios. En resumen, los datos sugieren que aunque se podría estar favoreciendo el fenotipo CD4+/Th1, mediado por la expresión de T-bet en todas las etapas, otras vías podrían estar favoreciendo la represión de IFN $\gamma$ , tales como las vías reguladas por la expresión de IL-4.

**Palabras clave:** T-bet, IFN $\gamma$ , porcinos, PCV2, Linfocitos CD4+, gene expression.

## 2.- Antecedentes

### 2.1.- El complejo respiratorio porcino (CRP) y su Importancia económica.

Las enfermedades respiratorias son comunes en la producción porcícola y pueden estar presentes en todas las granjas con diferentes grados de tecnificación, estas pueden prevenirse y ser controladas a través de la vacunación contra agentes virales y bacterianos. La implementación de sistemas tanto de manejo de animales, como de bioseguridad para el personal y el recinto, favorecen el control de estos agentes. Un ejemplo del manejo y bioseguridad está descrito en el Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Porcinos, edición 2016 (actual) de SAGARPA/SENASICA. La no implementación de la vacunación o de sistemas de bioseguridad puede comprometer la salud de los animales del recinto, especialmente en los animales jóvenes (Chae, 2015).

En el CRP participan diversos virus y bacterias, estos agentes son: El Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV), el Virus de la Influenza Porcina (SIV), Circovirus Porcino Tipo dos (PCV2), Parvovirus Porcino (PPV), Virus de la Pseudorabia Porcina (PRV) y Coronavirus Porcino (PRCV).

Otros agentes secundarios oportunistas comunes son bacterias, las más frecuentes son: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Chae, 2015).

Los virus de este complejo han cobrado importancia por ser persistentes y porque pueden permanecer en animales aparentemente sanos ó ser categorizados como endémicos en algunos lugares, como es el caso del PCV2 que es endémico en diversos estados de México (SAGARPA DOF, 2018).

Los virus y bacterias del CRP son agentes primarios y secundarios oportunistas, de los cuales, los primarios pueden evadir los mecanismos normales de respuesta inmune innata y colonizar la cavidad nasal o las tonsilas para propagarse hacia los pulmones, posteriormente el agente primario predispone la entrada de agentes oportunistas, estos últimos toman ventaja de mecanismos de virulencia de los

---

primeros para establecerse en el animal causando complicaciones severas que repercuten seriamente en la salud y en la ganancia de peso (Chae, 2015).

A pesar de que los agentes primarios puedan establecerse en el cerdo, pueden no causar daños serios, esto si se tienen los cuidados y precauciones descritas en el manual para la producción porcina, sin embargo, la infección se complica con malas prácticas porcícolas que promueven la infección con agentes primarios y secundarios oportunistas del CRP resultando en una infección respiratoria compleja, que se traduce en enfermedad severa, muerte en algunos casos y pérdidas económicas directas hacia la industria porcina. Por otro lado, también se puede manifestar como una enfermedad subclínica y latente que pone en peligro no solo al animal infectado, pone en riesgo a la granja productora y a granjas vecinas (Chae, 2015).

Otros factores para el desarrollo del CRP, aparte de los agentes primarios, secundarios oportunistas son los factores medioambientales, en este sentido; durante las estaciones de otoño e invierno, se presentan meses fríos y es en estos meses donde se presenta la mayor incidencia de virus del CRP (Chae, 2015).

A nivel mundial se han descrito diferentes costos de producción relacionados al CRP y a los principales agentes que lo conforman. Se ha hecho una estimación total en base a los datos reportados por diversos autores, los cuales estiman que las pérdidas económicas ascienden a más de 1 billón de dólares anuales (Xin *et al.*, 2018; Gava *et al.*, 2017; Alarcón *et al.*, 2013; Montaner *et al.*, 2019). En este texto se citan ejemplos de países cercanos a México y su impacto económico en la industria porcícola, relacionados con virus y bacterias pertenecientes al CRP.

En Estados Unidos se ha documentado a los agentes del CRP como los principales relacionados a la pérdida de producción en este país (Montaner *et al.*, 2019; Neumann *et al.*, 2005).

En Brasil, las enfermedades relacionadas con el CRP están presentes en los estados del sur donde hay una importante fuente de producción tanto a nivel local como a nivel global. Un estudio reveló que del 2011 al 2017 las enfermedades

relacionadas a los agentes del CRP han causado las mayores pérdidas en la industria porcícola de este país (Gava *et al.*, 2018).

En México, en los últimos años se ha enfrentado a los retos de tres agentes del CRP: PRRSV, PCV2 y SIV. Estos tres agentes están presentes en el país, las cifras oficiales de las pérdidas económicas o de animales aún no se conocen, se sabe que año con año afectan a la producción y cualquier brote de cualquiera de estos agentes debe ser notificado a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA DOF, 2018).

La participación del PCV2 dentro de este CRP está relacionado con la persistencia de las infecciones en los animales, ya que puede subsistir en animales aparentemente sanos y reemerger después de años (Rose *et al.*, 2012). Además el virus puede reemerger aun cuando se logre eliminar al virus de la granja y se ha sugerido que esto podría deberse a que las granjas vecinas pueden re-infectar a la granja libre (Meng *et al.*, 2012).

Cabe destacar que la industria porcícola es una importante fuente de carne a nivel nacional y cualquier agente que ponga en riesgo a la salud de los animales es un problema que está directamente relacionado a la economía nacional. (Centeno *et al.*, 2016; Karuppattan, 2017; Yucatán *et al.*, 2011; Bedolla-López *et al.*, 2018).

## 2.2.- Historia del Circovirus porcino.

En 1974, un nuevo virus fue descubierto, en el instituto Robert Koch (Berlín, Alemania) como contaminante de la línea celular PK-15 (ATCC CCL-33, células de epitelio renal de cerdo). Posteriormente se aisló el genoma viral y se determinó que se trataba de un genoma de DNA circular cerrado y se propuso nombrar a este nuevo virus como circovirus porcino (Astiz *et al.*, 2008).

Este primer circovirus porcino ahora identificado como del tipo 1 (PCV1) fue encontrado extendido en la población de cerdos sin provocar enfermedad y por esa razón se consideró no patógeno (Nauwynck *et al.*, 2007).

En 1991 el Dr. John Harding identificó los síntomas de una nueva enfermedad llamada Síndrome de Desmedro Multisistémico Post Destete (*Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome ó PMWS*) en un grupo de cerdos, caracterizada por una pérdida progresiva de peso y dificultad respiratoria. Se enviaron muestras histológicas y el resultado reveló lesiones microscópicas en los tejidos linfoides, sin embargo las lesiones histológicas no se atribuyeron a PCV2. En 1996 guiados por similitudes de lesiones encontradas en tejidos linfoides en la bolsa de Fabricio producidas por un tipo de circovirus aviar y las cuales eran similares a las producidas por PCV2, se analizaron muestras para compararlas con circovirus contaminantes de células y se comenzó a retomar el interés por la enfermedad PMWS porque hasta entonces no se conocía el agente causal (Astiz *et al.*, 2008).

En 1997, un virus similar a PCV1 fue aislado y designado como Circovirus Porcino de Tipo 2 (PCV2 por sus siglas en ingles). Este nuevo circovirus se encontró como agente causal de la enfermedad Síndrome de Desmedro Multisistémico Post Destete (PMWS) y como agente causal de lesiones en cerdos después de una inoculación experimental (Nauwynck *et al.*, 2007).

En 1998, se publicó el genoma de los virus aislados y se mostró que el PCV2, aislado de la enfermedad PMWS, era distinto al ya conocido PCV1 contaminante celular, teniendo una similitud entre 65-75%. Desde entonces se ha aceptado

internacionalmente al PCV1 como no patógeno y al PCV2 como el patógeno asociado a la enfermedad del PMWS (Nauwynck *et al.*, 2007).

Hoy en día, PCV1 y PCV2 están clasificados por el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus como virus de DNA monocatenario ubicados en la familia *Circoviridae* en el género circovirus. En la clasificación de Baltimore están ubicados en el grupo dos por tener un genoma viral de DNA circular cerrado de polaridad positiva (Segalés *et al.*, 2013; Taxonomic Proposals (2018). International Committee on Taxonomy of Viruses).

Se ha sugerido que PCV1 y PCV2 podrían tener un origen evolutivo común (Olvera *et al.*, 2007). Actualmente PCV2 está asociado a un grupo de enfermedades conocidas como enfermedades asociadas a PCV2 (*Porcine circovirus associated disease* ó PCVAD), una de las más frecuentes es el PMWS o Circoviriosis porcina (Segalés *et al.*, 2013).



### 2.3.- Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2).

Los análisis de secuenciación de diferentes aislados de PCV2 de todo el mundo revelan una relación filogenética, la cual en la década pasada sirvió para dividir en dos principales genitpos al PCV2, el a y b, pero, a pesar de esto, diversos autores utilizaban diferente nomenclatura para referirse a los genotipos (Meng, 2012).

**Tabla 1.- País de origen de diferentes aislados de PCV2 y su correspondiente genotipo actual.**

Aislado	País de origen (año de aislamiento)	Genotipo
1247	Suecia (1993)	PCV2-a
1010	Canadá (1997)	
5549	Irlanda del norte (1997)	
1155	Dinamarca (1999)	
1117	Estados Unidos U.S.A. (1999)	
10557	Irlanda del norte (2003)	
48285	Francia (1997)	
1452/3	Suecia (2004)	
9367	Italia (2000)	
1206	Belgica (2000)	
H2755	Hungria (2000)	
1127	Irlanda del norte (2004)	

Modificado de Duffy, *et al.*, 2009.

Por otro lado, la secuenciación de diferentes aislados del virus PCV2 en los últimos 20 años, ha mostrado la existencia de diferentes genotipos. Hasta el momento la Comisión Europea para las enfermedades relacionadas con PCV2 (PCVD EU) ha reconocido cinco genotipos, propuestos por el Dr. Segales en 2008, los cuales son “a, b, c, d, e”. El genotipo “f” es de reciente aparición en el continente asiático y se ha propuesto como parte de esta clasificación pero actualmente está en debate (Bao, *et al.*, 2017). Los genotipos a y b tienen una distribución mundial, mientras que el genotipo c solo se ha aislado en Dinamarca. Los genotipos d y e han sido aislados y caracterizado en Asia (Bedolla-López *et al.*, 2018).

Se conoce que PCV2 está presente en todos los países donde se desarrolla la porcicultura ya que, infecta a cerdos domésticos. También se ha sugerido que PCV2 podría infectar cerdos salvajes, pero no existen suficientes evidencias para sustentar esta afirmación (Segales *et al.*, 2007).

En condiciones de campo, cuando un cerdo adquiere una primo infección por PCV2, el tiempo de incubación es de dos a tres semanas, y la carga viral se puede detectar en suero y en tejidos desde el periodo de incubación. Por otro lado, los anticuerpos se detectan dos semanas posteriores a la infección y persisten durante toda la vida del animal (Chae, 2015).

Los signos clínicos de PCV2, son, anemia, diarrea, ictericia y PCVAD, se presentan a partir de la semana 8 de edad y se intensifican en las semanas posteriores. El más alto índice de mortalidad se ha reportado a partir de la semana 12 de edad del cerdo. Sin embargo, en años recientes, la naturaleza de la infección ha cambiado y ahora los signos que se presentan son menos severos, pero aún existe la morbi-mortalidad elevada. Entre estos signos se siguen destacando la pérdida de peso, diarrea, palidez, espasmos involuntarios entre otros (Chae, 2015).

A la fecha muchos cerdos están infectados con PCV2 pero solo una parte de ellos desarrollan la enfermedad. El PCV2 permanece latente en las tonsilas de animales portadores, aparentemente sanos, y puede re-surgir y ser infectivo. Este dato es interesante, en especial porque sementales o cerdas gestantes darán pie a la siguiente progenie de cerdos, pero si alguno estuviera infectado, se infectará de forma vertical el producto (O'Sullivan *et al.*, 2011; Kekarainen *et al.*, 2015; Kristensen *et al.*, 2015).

PCV2 puede erradicarse de granjas porcinas cuando se disminuye el riesgo de infección con PCV2 aplicando medidas de control como: el monitoreo de los corrales y no mezclar cerdos de diferentes edades, buena prácticas de higiene en el hato, un sistema de vacunación y sistemas de bioseguridad. Sin embargo el control del virus PCV2 sigue siendo un reto por las re-infecciones y la presencia de animales portadores, en especial para granjas con medianos o bajos niveles de tecnificación (Kristensen *et al.*, 2015).

## **2.4.- Prevalencia de PCV2.**

### **2.4.1.- Prevalencia de PCV2 a nivel mundial.**

Como se mencionó anteriormente PCV2 está presente en países donde se desarrolla la porcicultura, destacando en los primeros lugares China, seguido de la Unión Europea, Estados Unidos, Brasil, Rusia, Vietnam, México entre otros. A nivel mundial se estima que hay entre un 20 a un 80% de animales seropositivos al virus, esto gracias a la vacunación y a animales reservorio del virus producto de una infección pasajera. Particularmente en las granjas con un alto grado de tecnificación, hasta un 60 % de las enfermedades están relacionadas con virus respiratorios como PCV2, esto está relacionado con una tasa de mortalidad de 3 a 10% pero, en animales provenientes de granjas no controladas, se puede alcanzar hasta un 40% de mortalidad (Karuppanan *et al.*, 2017). Respecto a esto último, el problema se ha vuelto complicado por la limitada información acerca de la frecuencia de diferentes enfermedades que deterioran la producción de cerdos, específicamente en países en vías de desarrollo como en África (Karuppanan *et al.*, 2017).

Otros países que también han resaltados casos relacionados con el virus PCV2 como problema de salud porcícola han sido Alemania, Bélgica, diferentes países del Reino Unido, Irlanda, Canadá, España, entre otros (Karuppanan *et al.*, 2017. Afolabi *et al.*, 2017).

En Estados Unidos la prevalencia relacionada con PCV2 ha disminuido, gracias a la implementación de programas de sanidad y a la vacunación, sin embargo sigue presente el virus PCV2 en la nación (Dvorak *et al.*, 2018).

### **2.4.2.- Prevalencia de PCV2 en México.**

El PCV2 está presente en México (Yucatán *et al.*, 2011; Rami *et al.*, 2018) y no se sabe exactamente su prevalencia. En un análisis de sueros de zonas conurbadas de la Ciudad de México se estimó una prevalencia de entre 20 % y 70 %, muy similar a la de PRRSV (Ramírez-Mendoza *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2008). El virus está presente en los principales estados porcícolas del país, incluyendo Jalisco, Nuevo León, Querétaro, Ciudad de México y Michoacán, y los genotipos más prevalentes son el a y el b (Robles *et al.*, 2010). En el 2018 se reportó una prevalencia del 12.5 % para el genotipo a y del 87.5% para el genotipo b (Bedolla-López *et al.*, 2018).

El SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) clasifica a PCV2 como una enfermedad endémica (sobre todo en Michoacán) y lo considera un riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico y para el comercio nacional e internacional, por lo que es una enfermedad de reporte obligatorio (SENASICA DOF 29/11/2018).

## 2.5.- Transmisión del virus PCV2.

PCV2 se ha detectado en distintas vías de excreción, incluyendo secreciones nasales, saliva, moco traqueal, orina, heces, semen y secreciones oculares, lo que indica que PCV2 podría excretarse por cualquier vía (Bojkovski, 2018).

De estas secreciones se asume que la ruta de transmisión más común es la vía oro-nasal. Por otro lado, también la transmisión transplacentaria del PCV2 ha sido demostrada mediante el seguimiento de infecciones experimentales intranasales en cerdas gestantes, indicando que la transmisión vertical de PCV2 es factible (Opriessnig, 2010).

La susceptibilidad a padecer la enfermedad se considera individual ya que existen diversos factores que permiten que se desarrolle o no la enfermedad, algunos de estos son la edad, la coinfección con otras enfermedades, la respuesta inmunitaria y la predisposición genética (Large White/ Duroc, Duroc y Landrace son más susceptibles) (Opriessnig, 2011). Sin embargo, los determinantes genéticos para la susceptibilidad de la enfermedad viral y los factores de virulencia aún son desconocidos (Lin *et al.*, 2008).

PCV2 afecta a cerdos en todas las etapas del desarrollo, particularmente los que están en etapa de Iniciación hasta el crecimiento, que abarcan de la semana 4 a la 16 de edad; estos cerdos presentan signos marcados de la enfermedad e incluso aumento de la mortalidad (Opriessnig, 2010). En el presente trabajo se observó que en la semana 9 los animales presentaron palidez, adelgazamiento, ictericia, mientras que en animales de 16 semanas de edad se observó retraso del crecimiento.

## 2.6.- Genoma de PCV2.

El PCV2 es un virus no envuelto y de cápside con estructura icosaédrica. El virión mide 17-18 nm de diámetro. PCV2 posee un genoma circular de DNA con una secuencia de 1,766-1,769 nucleótidos de longitud y posee once potenciales marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*) de los cuales el más estudiado es el ORF2 que codifica para la única proteína de cápside, la proteína E2. (Darwich, *et al.*, 2012).

La alta tasa de mutación de PCV2 contribuye a la gran variabilidad en los genotipos y sugiere una alta adaptabilidad a diferentes entornos (Firth *et al.*, 2009). Se estima que PCV2 presenta una tasa de sustituciones por año de  $1.21 \times 10^{-3}$ , esta tasa de mutación es comparable con virus de RNA, como PRRSV (Firth *et al.*, 2009).

La plasticidad genética involucra la adaptación al hospedero incluso si hay coinfecciones con otros genotipos, por ejemplo, cuando se encuentran dos genotipos en el mismo hospedero; el genoma se recombina originando mutaciones en los nuevos viriones. También se ha descrito que la polimerasa de PCV2 juega un papel importante porque la tasa de error causa sustituciones de bases en el genoma viral (Han *et al.*, 2018).

Un estudio reciente en donde se mezclaron dos grupos de animales de dos granjas diferentes en España concluyó que, la exposición a diferentes genotipos de PCV2 en el hospedero originan cambios en el genoma viral de PCV2 durante una infección, esta situación es muy interesante porque también se resalta la alta tasa de mutaciones por coinfecciones de otros virus, los cuales pueden desencadenar una recombinación en el genoma viral, dando como resultado diferentes genotipos a nivel local (Correa-fiz *et al.*, 2018).

## 2.7.- Replicación de PCV2.

Los Circovirus replican su genoma a través del mecanismo del círculo rodante, este proceso también es utilizado por plásmidos bacterianos, fagos y por algunos virus de plantas y otros animales (Meng, 2012).

PCV2 infecta a la célula a través de la adhesión a los receptores glucosaminoglicanos, heparán sulfato y condroitin sulfato B en la membrana celular, posteriormente penetra a la célula a través de la formación de vacuolas de clatrina; en este proceso PCV2 permanece en el endosoma, hasta llegar a la etapa de endosoma tardío en donde el virus pierde la cápside por la acidificación del medio. Por procesos aún desconocidos, el DNA se transloca al núcleo. Una vez dentro, se lleva a cabo la replicación por enzimas y proteínas celulares expresadas durante las fases G1 y S del ciclo celular. Como primer paso, PCV2 replica la cadena complementaria del genoma para formar una doble hélice de DNA. En esta fase, las enzimas celulares transcriben un RNA mensajero el cual se transloca al ribosoma para formar las proteínas de replicación Rep y Rep' las cuales regresan al núcleo y se unen al DNA viral en sitio de origen de replicación (Ori) para iniciar la replicación. El complejo Rep (Rep y Rep') se une a Ori en la secuencia de hexanucleótidos palindrómicos H1/H2 y hace una incisión para comenzar la replicación. Finalmente, la terminación del proceso de replicación del DNA naciente ocurre con cierre de la horquilla de la nueva cadena y el desplazamiento de la cadena original de ADN, sin embargo, se desconocen los eventos con los que culmina el proceso (Faurez *et al.*, 2009) ANEXO XI.

La transcripción del RNA del genoma viral de PCV2 es compleja y la síntesis del RNA mensajero se lleva a cabo en la fase S del ciclo celular, donde se replica la cadena sencilla de ADN en una doble hélice de DNA para después realizar la transcripción del RNA mensajero. La estrategia de transcripción es bidireccional y varios ARN son producidos por empalme alternativo (Meng, 2012).

## 2.8.- Células blanco de PCV2.

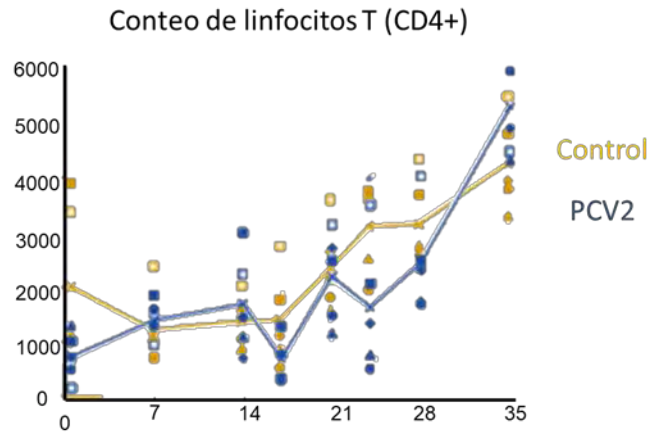
El virus ataca preferentemente tejidos del sistema linfoide ocasionando un mal funcionamiento y la muerte de las células infectadas. PCV2 tiene como células blanco a células dendríticas, macrófagos e histiocitos, hepatocitos, células del epitelio intestinal, células del epitelio renal, células epiteliales respiratorias y células endoteliales.

También infecta linfocitos T y B, los cuales son susceptibles de ser infectados por PCV2. Un estudio en el año 2008, reveló que los linfocitos T de sangre periférica, son blanco del virus PCV2, esto se observó en lechones de 4 a 6 semanas de edad, provenientes de granjas comerciales, portadores naturales de la infección por PCV2 que mostraron títulos positivos para el virus sin signología clínica, sin infecciones adicionales y en buen estado físico (Lin *et al.*, 2008). Adicionalmente se utilizaron lechones de 4 a 6 semanas de edad los cuales se inocularon con PCV2a y se realizó el mismo procedimiento que con los positivos. Se aislaron los linfocitos T y se observó mediante hibridación in situ (ISH) la presencia del genoma de PCV2, por tanto, los linfocitos T son susceptibles de ser infectados por PCV2 en los dos grupos de lechones.

También se realizó otro experimento para inducir la proliferación celular, utilizando Conavalina A (Con-A) y se demostró que PCV2 se encuentra en las células durante la replicación, después de 4 días en incubación, se observaron cúmulos de viriones en el citoplasma de los linfocitos (Lin, *et al.*, 2008)

También, se ha reportado que durante un reto con PCV2 en animales libres del virus (3 semanas de edad) y con virus aislado (1452/3 PCV2b), el número de células CD4+ aumenta durante los días 7 a 14 post infección, pero posteriormente se disminuye entre los días 14 a 21 y de 21 a 28. Posteriormente se observó un aumento de los CD4+ hasta el sacrificio de los animales en el día 35 posterior a la infección.





**Figura 1.- Conteo de linfocitos CD4+ durante la infección por PCV2.** En azul animales PCV2+, en amarillo animales control inoculados con PBS. Eje Y: número de células, eje X: días pos-infección. Modificado de Steiner *et al.*, (2009).

Durante la infección se ha observado que ocurre una inmunosupresión, lo cual favorece coinfecciones con otros agentes patógenos (Tsai *et al.*, 2010). PCV2 ataca células específicas de sistema inmune como los macrófagos y las células dendríticas en las cuales modula sus funciones. Durante la infección por PCV2 existe una regulación positiva de IL-10, que es una citocina anti-inflamatoria, y una regulación negativa de diferentes citocinas pro-inflamatorias que contribuyen a la patogénesis de PCV2 (Lin *et al.*, 2008).

En suma, la infección de todas las células blanco de PCV2 trae como consecuencia que se manifiesten los diferentes signos clínicos marcados de la enfermedad, principalmente desmedro anorexia y linfopenia, lo cual repercute en la salud del animal y por lo tanto, baja la producción porcícola.

## **2.9.- Evasión del sistema inmune innato mediado por el mecanismo de inhibición alostérica por los motivos CpG.**

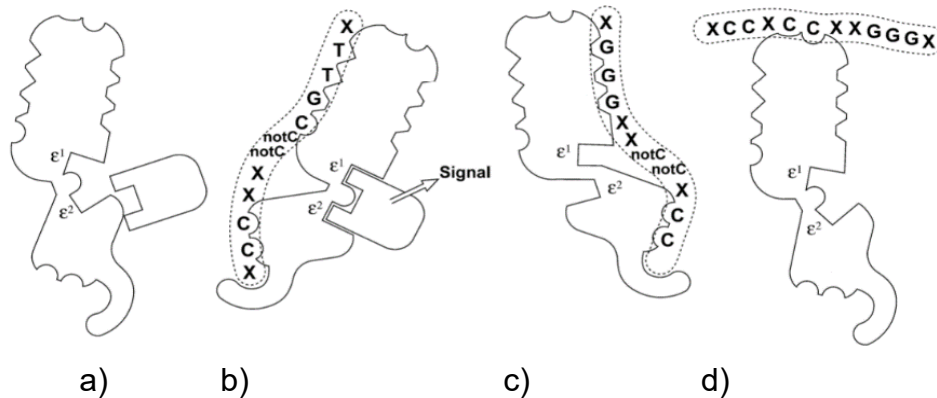
Actualmente no se conoce el mecanismo por el cual el virus Circovirus Porcino tipo dos (PCV2) evade el sistema inmune celular durante los primeros días de la infección (Kekarainen, *et al.*, 2008).

Diversos autores han realizado análisis de bioinformática del genoma viral de PCV2 y se han caracterizado dieciséis posibles motivos de inhibición en el genoma viral, los cuales contienen motivos CpG (motivos ricos en Citocinas y Guaninas) (Kekarainen *et al.*, 2008). Estos CpG (CG dinucleótidos) podrían estar participando en el bloqueo del reconocimiento de los sensores citoplasmáticos tipo Toll-Like (TLR) nueve y siete (censores de DNA y RNA extraño respectivamente) por alosterismo en los residuos ricos en tirosina que presentan los TLR y por lo tanto evitar el reconocimiento del virus en etapas tempranas de la infección viral (Bryan 2007).

Dicho esto, la activación alostérica del receptor TLR9 depende del reconocimiento de secuencias CpG en el genoma de microorganismos como bacterias en donde se ha caracterizado la mayor fuente de estos motivos, los cuales también se encuentran presentes en los virus. Sin embargo, el genoma de mamíferos carece de estas secuencias, esto podría ser una característica por la cual el sistema inmune pueda diferenciar fragmentos del genoma propio del extraño (Dalpke *et al.*, 2006). El reconocimiento de estas secuencias CpG desencadenan una fuerte señal de activación para la expresión de interferones del tipo I (INF- $\alpha$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) durante la respuesta inmune innata (Meehan *et al.*, 2007).

Los motivos CpG de activación contienen citocinas y guaninas (CG) en el genoma bacteriano o viral. Por otro lado, los motivos de inhibición contienen secuencias de tres o cuatro guaninas (GGG o GGGG). Esto es interesante porque en el reconocimiento del genoma viral por células fagocíticas (M $\Phi$ . Y DC.), este genoma viral se fragmenta en el endosoma tardío en presencia de un pH ácido (pH~5) y forma motivos de activación o inhibición (Ashman *et al.*, 2005).

La unión de los motivos CpG induce un cambio conformacional en el TLR9, este cambio permite la unión de un mensajero el cual desencadena la respuesta inmune ó la inhibición de la misma, esta unión se da en los residuos ricos en tirosina de la región épsilon ( $\epsilon_1$  y  $\epsilon_2$ ) en el TLR9 (Ashman *et al.*, 2005).



**Figura 2.- Activación e inhibición de TLR9.**

a) estructura del TLR9 sin fragmento de DNA. b) unión de motivos CpG de activación (CG) al TLR9, cambio de conformación y activación del mensajero. c) unión de motivos de inhibición ricos en guaninas (GGG) en la región  $\epsilon_1$  y  $\epsilon_2$ , cambio de conformación, no hay activación. d) unión no específica de motivos CpG, no cambio de conformación, no activación. Modificado de Ashman *et al.*, 2005.

Se han caracterizado 63 motivos CpG de activación e inhibición presentes en el genoma de PCV2, de los cuales solo 16 han sido seleccionados por programas informáticos como mejores motivos para la regulación de la activación/inhibición de la respuesta inmune innata (Kekarainen *et al.*, 2008). Estos motivos en el genoma de PCV2 han sido sintetizados y en condiciones *in vitro* activan al sistema inmune con fragmentos ricos en motivos CpG (CG) o inhiben la respuesta inmune con motivos CpG ricos en guaninas (GGG) (Meehan *et al.*, 2007). Por tanto estos motivos CpG descritos en la literatura se conocen como motivos CpG de activación o inhibición. Esto es muy interesante para entender que está pasando con la respuesta inmune innata durante la infección viral temprana o primoinfección.

Otros factores están inmersos en el papel inmunoregulador del virus, como el propio genoma viral donde se ha descrito que el genoma de una sola cadena (ssDNA) tiene efecto estimulador y la doble cadena (sdDNA) tiene efecto inhibitorio durante la respuesta inmune innata (Kekarainen-Segalés 2015). Este efecto de activación/inhibición también se ha descrito para el TRL7 como posible agonista en la inhibición con TLR9 (Vincent *et al.*, 2006). Esto es muy importante porque al estar bloqueados éstos dos receptores, la replicación viral podría ocurrir sin la activación del sistema inmune innato hasta días después de la infección. Por otra parte, es durante la respuesta del sistema inmune adaptativo donde responde a la infección.

### **2.9.1- Evasión del sistema inmune y tolerancia inmunitaria mediada por el mecanismo de inhibición de células dendríticas en las tonsilas.**

Las tonsilas están estratégicamente posicionadas para responder ante cualquier patógeno extraño antes que ingrese al sistema del animal (Álvarez *et al.*, 2010).

La vía más común de infección y entrada del virus PCV2 al lechón es la vía oro nasal, en esta vía converge la vía bucal y nasal del cerdo. Estas dos vías se unen en el fondo de la cavidad bucal donde tienen contacto con las tonsilas. Justamente en las tonsilas está ubicado el anillo de Waldeyer, y este a su vez está compuesto por folículos linfoides ricos en células del sistema inmune que tienen contacto con los antígenos extraños que pasen por estas dos vías (Horter *et al.*, 2003).

El anillo de Waldeyer está compuesto por cuatro diferentes folículos linfoides: la tonsila faríngea ubicada en la parte superior, las tonsilas tubales en la parte superior derecha e izquierda, tonsilas platinas ubicadas a los extremos y tonsila lingual en la parte inferior (Horter *et al.*, 2003). Las células presentes son linfocitos T y B, MΦs y DC, células epiteliales maduras y en estado mitótico, células epiteliales M que

ayudan al transporte de patógenos y presentación de estos a los MΦ, DC y células del tejido conectivo (Horter *et al.*, 2003).

Durante una primo infección, el anillo de Waldeyer es la primera barrera inmunitaria que entra en contacto con el virus PCV2. Ahí el virus es fagocitado por APCs como las DC, se cree que por el mecanismo de CpG, el genoma del virus es reconocido por la célula, la cual a su vez, es capaz de reconocer epítopes de la cápside viral. Estos epítopes juegan un papel importante en las DC las cuales se sabe que participan en el proceso de maduración de los linfocitos por medio de la selección positiva y negativa, esto es posible porque en las tonsilas se encuentran linfocitos inmaduros y los cuales maduran hacia linfocitos efectores en el timo. La DC muestra el epítope y los linfocitos que tienen una baja reactividad al epítope sobreviven y las que tiene una alta reactividad mueren. Así es como se lleva a cabo la tolerancia inmune por parte del virus (Klausmann *et al.*, 2015).

El mecanismo de persistencia del virus PCV2 en las tonsilas no está bien caracterizado, sin embargo se sabe que células que están en estado mitótico como las células epiteliales tonsilares son susceptibles de ser infectadas por PCV2, en estas células una vez maduras, el virus permanece porque ya no puede acceder a la maquinaria de replicación de la célula, puesto que la célula se encuentra en el estado de G0. Las células epiteliales son altamente permisivas al virus, por lo tanto, se consideran el reservorio viral (Pérez-Martín *et al.*, 2007).

Un estudio asociado al mecanismo de persistencia del virus PCV2, evaluó tonsilas de diferentes granjas sin vacunación y con diferentes niveles de tecnificación provenientes de cerdos que se sacrificaban en Canadá; el resultado arrojó que PCV2 tiene una alta incidencia en las tonsilas de los cerdos incluso más frecuente que bacterias patógenas que afectan al cerdo, por lo tanto, las tonsilas son órganos secundarios donde se puede mantener el virus PCV2 por mucho tiempo (O'Sullivan *et al.*, 2011).

Por otro lado, hablando específicamente de la tolerancia inmune en el animal, esta se lleva a cabo por medio de células DC infectadas en las tonsilas que viajan a través del torrente linfático hasta llegar al linfonodo medial retrofaringeal, en este

linfonodo viaja la DC por medio de la vía profunda el cual tiene contacto estrecho con la vena interna juglar, donde la DC puede migrar a la sangre periférica y a su vez en el torrente sanguíneo viajar hasta llegar al timo (Li *et al.*, 2009). Se han caracterizado las mismas DC presentes en las tonsilas y en la sangre periférica, conocidas como DC plasmocitoides (Sato *et al.*, 2007).

Una vez en el timo, la célula infectada viaja hasta la región corticomedular donde se lleva a cabo la maduración y diferenciación de linfocitos. Las células infectadas presentan los epítopes de la cápside y son reconocidos por los linfocitos. En este proceso se lleva a cabo la selección positiva y negativa de los linfocitos a nivel del timo, aquellos que tienen una baja afinidad al MHC sobreviven, por lo tanto, maduran y salen a la circulación reconociendo al patógeno como propio. PCV2 se disemina y el sistema inmune no lo reconoce, a este proceso se le llama tolerancia inmune (Klausmann *et al.*, 2015).

## 2.10.- Respuesta inmune celular antiviral.

Algunas células del sistema inmune del cerdo han sido evaluadas durante la infección por PCV2 como los MΦs alveolares, las células del ganglio linfático mediastinal, sangre entera lisada y recientemente líneas celulares como la de VR1BL (Células del epitelio pigmentario de la retina) (Bin *et al.*, 2014. Dvorak *et al.*, 2018).

Estudios de transcriptómica han demostrado la expresión diferencial de genes de citocinas como IL-10 e IFN $\gamma$ , esto en aislados de MΦs alveolares, donde se utilizaron lechones de 3 semanas de edad a los que se les inoculó PCV2b, el virus fue amplificado en células PK-15 y se inoculó en los cerdos en concentraciones de  $1.0 \times 10^7$  TCID50/ml a través de la vía orofaríngea. Se tomaron muestras a las 24 y 48 horas, posteriormente los cerdos se eutanasiaron a las 48 horas post infección y se obtuvieron los macrófagos alveolares por medio de lavados bronquiales para evaluar la expresión de genes. Los resultados mostraron una sobre expresión del gen *il-10* y represión del gen *ifny*. Esto es muy interesante porque la IL-10 es una molécula anti-inflamatoria y por otro lado el IFN $\gamma$  está asociado directamente a la respuesta inmune antiviral (Bin *et al.*, 2014).

En otro estudio donde se aislaron células del ganglio linfático mediastinal y leucocitos totales, se utilizaron lechones de 1 mes de edad inoculados con PCV2a y se tomaron muestras desde el día cero al día 29 post infección. El resultado mostró que en estas células del ganglio linfático mediastinal y leucocitos totales, el IFN $\gamma$  se expresa menos durante la infección por PCV2a, pero en el día número 21 post infección se observó un aumento en la expresión de IFN $\gamma$  (Tomas *et al.*, 2010).

En el año 2018 se publicó un estudio en donde se utilizó la línea celular VR1BL (células de retina fetal de porcino) para analizar a través de análisis transcriptómico los genes que se regulan durante la infección de PCV2b. Este estudio evaluó las células infectadas después de 4 días post infección; el resultado mostró que los genes asociados a la expresión de interferones de tipo 1 están sub-expresados. Además se observó una sub-expresión del gen TBX20 (T-box 20) el cual es un factor de transcripción que tiene elementos respuesta para la caja box (t-box). Esto

---

es importante porque en el estudio se muestran los factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune antiviral y, más específicamente, los factores de transcripción asociados a la familia box (T-box). Ejemplo de los factores que se encuentran en esta familia son TBX20 (T-box20) y TBX21 (T-bet) (Dvorak *et al.*, 2018). También los autores remarcan que durante la respuesta inmune en este tipo celular y con 4 días de infección, se aumenta la respuesta por IFN $\beta$ . Sin embargo, la inducción por interferones durante la respuesta inmune innata no necesariamente induce un efecto protector en cerdos. Por otro lado, no se encontró asociación entre la represión de TBX20 y las vías de señalización RIG-I y IRF7 (Dvorak *et al.*, 2018).

Estos trabajos sugieren que la infección de PCV2 favorece la represión de IFN $\gamma$  a diferentes niveles. A la fecha se desconoce la participación curso-temporal de la enfermedad en los linfocitos T (CD4+) durante la infección por PCV2 en lechones nacidos y positivos al virus. Además, no se conoce en estas células la relación entre la expresión de los factores de transcripción, como T-bet el cual es el regulador maestro de la maduración de linfocitos Th1, y su relación con la expresión de IFN $\gamma$  dependiendo del estadio de la enfermedad.

Finalmente, se ha observado que virus como el HIV y el FIV tienen acción similar al PCV2 en un fenómeno llamado inmunosupresión persistente, que se atribuye por la capacidad del virus de regular negativamente la expresión de IFN $\gamma$  y favorecer la sobreexpresión de T-bet (Shete *et al.*, 2016; Mórtola., *et al.*, 1999).

### **2.10.1.- Respuesta inmune antiviral mediada por IFN $\gamma$ .**

El IFN $\gamma$  coordina diversas funciones celulares a través de la regulación transcripcional, en respuesta a patógenos intracelulares. En este contexto, las células que producen IFN $\gamma$  en el sistema inmune son los M $\Phi$ s, DC, células NK y linfocitos T (Schroder *et al.*, 2004).

La mayor producción de IFN $\gamma$  ocurre en las células Th1. La producción de IFN $\gamma$  por estas células diferenciadas es gracias a que por una parte, el efecto activador derivado de las células NK y su mecanismo de secreción de IFN $\gamma$  favorece la



diferenciación de los linfocitos CD4+ vírgenes. Por otro lado, los MΦs presentan epítopes de reconocimiento a las células T CD4+ junto con co-estimuladores como la IL-12 para que estos linfocitos T CD4+ vírgenes sean diferenciados hacia el fenotipo celular Th1. Así, la expresión de IFN $\gamma$  promueve citotoxicidad inmunitaria por mecanismos indirectos, como la represión del fenotipo celular Th2 y estimula la expresión del proceso de presentación de antígeno en los MΦs, además de promover la expresión de citocinas pro inflamatorias (Italiani *et al.*, 2014). El IFN $\gamma$  influye directamente en la diferenciación celular de las células CD4+ vírgenes hacia el fenotipo celular Th1 al inducir la producción de IL-12 en fagocitos e inhibir la producción de IL-4 secretado por el fenotipo celular Th2 (Schroder *et al.*, 2004).

Los MΦs, las DC y las células NK participan en la defensa temprana de parásitos intracelulares y secretan IFN $\gamma$ . Durante la infección por PCV2 se ha descrito que la secreción de IFN $\gamma$  es baja durante las dos primeras semanas de la infección en lechones SPF expuestos a una cepa aislada. Esto sugiere que células involucradas en la inmunidad innata: MΦs, DC y células NK no producen suficiente IFN $\gamma$  para combatir la infección o también que no se estén activando estas células (Miller *et al.*, 2011).

El IFN $\gamma$  regula la inmunidad innata y adaptativa durante la infección viral mediante varios mecanismos: IFN $\gamma$  induce el estado antiviral induciendo la diferenciación de células vírgenes a Th1, esto en células infectadas y no infectadas, estimula a los macrófagos para que se diferencien a través de la vía clásica para secretar citocinas pro inflamatorias (Italiani *et al.*, 2014) y estimula a las células NK para que secreten una mayor cantidad de IFN $\gamma$  (Schroder *et al.*, 2004).

Parte de la importancia del presente trabajo, es el estudio del IFN $\gamma$  en cerdos PCV2 naturalmente nacidos e infectados, el cual no ha sido bien descrito en la literatura hasta ahora. Se sabe que, durante la semana 6 de gestación, la secreción de IFN $\gamma$  en los fetos esta disminuida, mientras que en el nacimiento hay un aumento de la secreción de esta citocina, pero 48 horas después vuelve a disminuir. Esto podría sugerir que en el momento del nacimiento hay secreción de IFN $\gamma$  la cual se reduce después del nacimiento (Oliver-Ferrando *et al.*, 2018).

También se ha evaluado la expresión de IFN $\gamma$  en cerdos de entre 16 a 26 semanas de edad naturalmente infectados con PCV2. La expresión de IFN $\gamma$  se midió en las semanas 16, 19, 20, 22 y 26, y se observó que durante la semana 16 los animales tuvieron un nivel bajo de expresión, similar al grupo de cerdos no infectados. En las semanas posteriores (19, 20, 22 y 26), se detectó una sub expresión de esta citocina en los cerdos PCV2+ (Borghetti *et al.*, 2013).

Ambos estudios resaltan edades diferentes de los animales, por una parte se utilizaron lechones pre y recién nacidos, por otra, se utilizaron cerdos de edades de 16 semanas en adelante, pero no hay estudios que muestren el comportamiento de la expresión de IFN $\gamma$  en animales naturalmente infectados con el virus PCV2 en etapas después del nacimiento. Por lo tanto, es de nuestro interés estudiar a dicha citocina durante la primera etapa de desarrollo, es decir, el destete materno y sus dos posteriores etapas de desarrollo hasta la semana 16 de edad, lo cual resulta interesante para analizar el curso temporal de la expresión de IFN $\gamma$ .

En este contexto, es importante mencionar que para poder comprender la expresión molecular de IFN $\gamma$ , es necesario conocer acerca de las células que producen esta citocina y cómo podrían estar involucradas durante la infección viral, analizando las vías de señalización que promueven su expresión.

Las células más estudiadas en relación con la expresión de IFN $\gamma$  durante la infección por PCV2 y las vías de señalización relacionadas con la expresión/represión del mismo, son principalmente los M $\Phi$ s. Los monocitos son precursores de los M $\Phi$ s, los cuales realizan sus funciones al reconocer diferentes tipos de moléculas extrañas, así como moléculas del anfitrión producidas en respuesta a las infecciones y lesiones (Abbas *et al.*, 2015). Los M $\Phi$ s expresan IFN $\gamma$  en respuesta a diversos estímulos como ciclohexamida, interferones de tipo 1, IL-12, lipopolisacárido (LPS) entre otros. En contraste, se inhibe la producción de IFN $\gamma$  cuando los M $\Phi$ s se estimulan con IL-10 y IL-4 (Gessani *et al.*, 1998; Darwich *et al.*, 2012). Durante una infección los M $\Phi$ s maduran y activan las vías de señalización MyD88-NF-KB, NFAT, CREB que regulan la expresión de IFN $\gamma$ , mediante factores de transcripción que se unen al promotor de gen. La vía de

señalización MyD88-NF-KB está relacionada con la expresión de IFN $\gamma$  (Sica *et al.*, 1997) La función regulatoria del eje MyD88-NF-KB se demostró estimulando M $\Phi$ s de ratón RAW 264.7 con LPS. El LPS interacciona con el TL4, el cual activa a MyD88 para que fosforile a las cinasas IRAK (1 y 4), las cuales a través de segundos mensajeros activan a NF-KB para su translocación al núcleo como P50/P65 en la vía canónica de señalización. Una vez en el núcleo desplazará al inhibidor y se unirá al promotor de IFN $\gamma$  para expresar el RNA mensajero. Esta vía canónica esta descrita en el mapa de señalización descrito en la enciclopedia de Kioto de genes y genomas (KEGG Pathway 2019) ANEXO I.

La vía NFAT también está presente en M $\Phi$ s y en diversas células inmunitarias, como los linfocitos T, B, NK y DC (Goodridge *et al.*, 2011; Fric *et al.*, 2012). Se ha descrito que el promotor del IFN $\gamma$  tiene elementos de respuesta para NFAT y se potencializa la expresión de IFN $\gamma$  cuando se encuentran presentes NFAT Y NF-KB (Sica *et al.*, 1997). Esta vía se ha asociado a la activación por calcio en diferentes vías, pero en definitiva “NFAT juega un papel importante en el desarrollo y la función de las células inmunes” (Elloumi *et al.*, 2012), NFAT participa principalmente en la expresión de IL-12 en M $\Phi$ s, está presente en la expresión de citocinas pro inflamatorias en las células NK y en la vía de diferenciación de los linfocitos T cooperadores (KEGG Pathway 2019; Elloumi *et al.*, 2012) ANEXO II. Sin embargo, esta vía confluye con otras vías de señalización, lo cual, sugiere que para que la expresión de IFN $\gamma$  se favorezca, NFAT debería estar presente junto con otros factores de transcripción como co-estimulador de la expresión.

Por último, la vía CREB se describió como una vía potencial para la expresión de IFN $\gamma$  en células blancas aisladas de pacientes asintomáticos con tuberculosis. Los autores demostraron que “CREB puede promover la transcripción y traducción de IFN $\gamma$  a través de su unión con el sitio proximal del promotor” en macrófagos. Además, es bien sabido que el IFN $\gamma$  estimula la ativación de los macrófagos (Liu *et al.*, 2010). En este contexto, la vía CREB podría tener importancia como co-activador. Sin embargo, se ha descrito que CREB regula negativamente a la vía NF-KB cuando se encuentra en el núcleo como RelA/65, p50, La fosforilación de CREB

favorece su unión al dipéptido RelA/65, p50 que finalmente inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias y estimula señales para la supervivencia del MΦ (Wen *et al.*, 2014).

En definitiva, el IFN $\gamma$  es la principal citocina que activa los MΦs a través de las vías Jak-Stat, NF- $\kappa$ B, utilizando las vías CREB, NFAT, cAMP, PKA como co-reguladoras (Liu *et al.*, 2004; Sica *et al.*, 1997).

Así se podría decir que, aunque los MΦs puedan expresar IFN $\gamma$ , su principal acción es ser estimulados con esta citocina para ser activados y diferenciados.

Pero durante la infección de PCV2, la regulación de estas vías de señalización en MΦs alveolares de porcino favorece la activación de la vía MyD88-NF- $\kappa$ B, que estimula la expresión de citocinas pro inflamatorias como la IL-8 (Qin *et al.*, 2016) y citocinas anti inflamatorias, como la IL-10 (Junyuan *et al.*, 2017). En consecuencia, PCV2 inhibe la acción de los MΦs a través de la secreción de IL-10 por la vía TLR2/MyD88/NF- $\kappa$ B (Junyuan *et al.*, 2017) ANEXO III.

Las DC también son fagocitos que expresan IFN $\gamma$  a través de la vía “jump start” en la cual la producción de IL-12 por las APCs permite su activación autocrina y la estimulación de la producción de IFN $\gamma$  durante la presentación del antígeno (Frucht *et al.*, 2001). Esta vía en la cual interacciona IL-12 es la vía STAT, donde, a través de la expresión del factor de transcripción STAT4 se expresa IFN $\gamma$  (Frucht *et al.*, 2001). En esta vía se encuentra T-bet el cual podría estar favoreciendo la expresión del IFN $\gamma$ .

Aunque durante la infección de PCV2 el virus permanece latente en estas DCs, podría sugerirse que debido a los motivos CpG de inhibición, la célula no censa al virus. Sin embargo, la sobre expresión de IL-10 en estas células sugiere que el virus modula la expresión de IFN $\gamma$  de igual manera que los linfocitos Th1 (Kekarainen *et al.*, 2015).

Las células NK expresan IFN $\gamma$  a través de las vías MAPK y NFAT (KEGG Pathway 2019 ANEXO II); sin embargo, no se ha esclarecido qué pasa durante la infección por PCV2. Se sabe que PCV2 es capaz de inhibir la actividad de diversos tipos de

células involucradas en la eliminación del patógeno como los macrófagos, linfocitos Th1 y células NK (Kekarainen *et al.*, 2015). Es posible que el virus inhiba la expresión de IFN $\gamma$  en éstas células utilizando mecanismos similares.

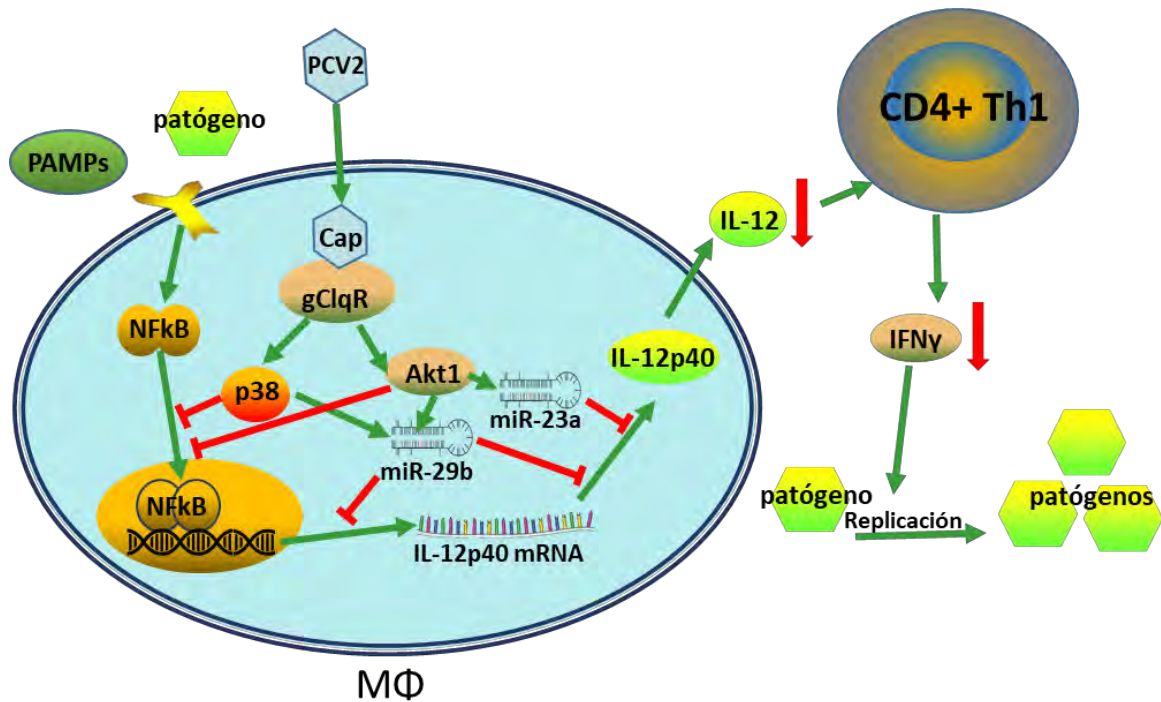
Por último, las células Th1 son las principales productoras de IFN $\gamma$  (Schoenborn *et al.*, 2007) mediante las vías T-bet, Jak/STAT, NOTCH, NF- $\kappa$ B y NFAT como co-activador (KEGG Pathway 2019), ANEXO IV. Principalmente se ha involucrado a la vía de señalización T-bet como responsable de la diferenciación celular hacia el fenotipo celular Th1 por su factor de transcripción T-bet, conocido como el factor maestro de la regulación de linfocitos vírgenes hacia linfocitos Th1. Esta vía de señalización se explica más adelante, ANEXO IV.

Por otro lado, la vía Jak/STAT en los linfocitos Th1 induce la expresión de IFN $\gamma$  mediante los estímulos de IL-12 y de IFN $\gamma$  exógeno; ambos provenientes de APCs o de la secreción de IFN $\gamma$  de otros linfocitos Th1 activos. Estos estímulos activan a los segundos mensajeros Jak1 y Jak2, los cuales activan a STAT1 y, por otro lado Jak2 y TYK activan a STAT4. La vía Jak/STAT se ha reportado en células DC como la vía “jump start” para la expresión de IFN $\gamma$  (Frucht *et al.*, 2001). Sin embargo, en los linfocitos Th1 se ha relacionado con la expresión del factor de transcripción T-bet. Esto sugiere que la vía Jak/STAT interviene tanto en la expresión de IFN $\gamma$  como de T-bet y esto, como anteriormente se mencionó, depende del tipo celular y del contexto en el que se encuentre.

Hasta el momento no hay estudios relacionados con la vía de señalización NOTCH y PCV2, pero se sabe que esta vía puede favorecer la expresión de IFN $\gamma$  a través de NOTCH3, el cual, por medio de la unión con su ligando en la célula adyacente, se lleva a cabo un corte proteolítico transmembranal, donde se libera NICD. NICD es translocado al núcleo donde interactúa con factores de transcripción de la familia CLS, es aquí donde se disocia un complejo represor que incluye una diacetilasa de histonas (HDAC-1) (Santos *et al.*, 2006). Además, recluta coactivadores como los factores de transcripción MAML1 y RBPJ para favorecer la expresión de T-bet y por otra parte p50 y c-Rel favorecen la expresión de IFN $\gamma$  (ANEXO V).

Por último, se ha resaltado a la vía NF- $\kappa$ B como vía de señalización para la co-expresión de INF $\gamma$  junto con la vía NFAT dependiente de calcio. Esto durante la activación del linfocito CD4<sup>+</sup> virgen. Esta vía es activada a través del TCR del linfocito virgen, el cual reconoce al SLA (MHCII en otros mamíferos) para su activación. A través del aumento de la secreción de moléculas como el inositol trifosfato (IP3), el calcio (Ca<sup>2+</sup>) y el diacilglicerol (DAG) se activan a segundos mensajeros (CaN serina/treonina fosfatasa y DAG cinasa C tipo theta), que a su vez, activaran las vías NFAT y NF- $\kappa$ B, respectivamente. Éstas vías favorecen la expresión de IFN $\gamma$  en linfocitos Th1 (KEGG Pathway 2019, ANEXO IV).

En relación con la vía NF- $\kappa$ B, se han realizado escasos estudios relacionados a esta vía en células de porcino como leucocitos primarios y M $\Phi$ s alveolares, donde se ha resaltado la baja expresión de IL-12 durante su cultivo con PCV2 a las 48 horas post inóculo (Duan *et al.*, 2014). Es interesante resaltar que PCV2 puede inhibir la expresión de IL-12 en M $\Phi$ s, los cuales a su vez inhiben la expresión de IFN $\gamma$  en células Th1 (Qian *et al.*, 2019). Sin embargo, no hay estudios en los que se haya analizado la expresión de esta vía en Linfocitos T de cerdos naturalmente infectados con PCV2 en diferentes estadios del crecimiento.



**Figura 3.- Modelo de infección de PCV2, inhibición de la expresión de IL-12p40 en macrófago alveolar porcino para posteriormente suprimir la respuesta de Th1.** La infección de PCV2 activa las vías de señalización PI3K/Akt1 y p38-MPAK a través de la interacción de la cápsida viral CAP y gC1qR. Esta interacción suprime las vías inductoras de PAMPs reprimiendo la expresión de IL-12p40. También se activan las vías PI3K/Akt1 y p38 MAPK, las cuales inducen la sobre expresión de RNAs de silenciamiento miR-23a y miR-29b, que a su vez suprimen la expresión transcripcional y post transcripcional de IL-12p40. Por tanto, la secreción de IL-12 por el MΦ resulta en una baja respuesta por parte de los Th1 a la infección viral. Las flechas verdes significan inducción, las líneas rojas en forma de T significan inhibición y las flechas rojas significan represión (Modificado de: Qian *et al.*, 2019).

## **2.11.- Mecanismo de maduración y proliferación de linfocitos T CD4+, a través del factor de transcripción T-bet (T-box).**

Los linfocitos CD4+ vírgenes se diferencian hacia el fenotipo celular Th1, Th2, Th17 o Treg. La diferenciación hacia cualquier fenotipo celular requiere de tres elementos, estos son: primero, la presentación del antígeno por medio del MHC II (complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos), la secreción de citocinas en el microambiente celular y por último receptores para estas citocinas (Jinfang *et al.*, 2013).

T-bet es el factor de transcripción más importante relacionado para la diferenciación de los linfocitos vírgenes CD4+ hacia el fenotipo celular Th1, de ahí su importancia, además, requiere la presencia de factores intracelulares incluyendo STAT1, STAT4 y extracelulares como citocinas que se encuentran en el microambiente celular, la más importante IL-12 (Alspach *et al.*, 2019; Schoenborn *et al.*, 2007; Afkarian *et al.*, 2002).

Las células Th1 producen citocinas en respuesta a patógenos intracelulares las cuales son: IL-2, IFN $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Éste último contribuye al reclutamiento de leucocitos y aumenta la respuesta inflamatoria. El IFN $\gamma$  juega un rol crucial en la activación de M $\Phi$ s para la eliminación de patógenos intracelulares, estimula a otras células CD4+ vírgenes a que se diferencien, estimula a células NK y es una de las moléculas más importantes que tiene respuesta antiviral (Askonas, 1988; Zhu, *et al.*, 2013).

Tomando en consideración los datos de la literatura, el presente trabajo plantea evaluar la respuesta inmune antiviral mediada por IFN $\gamma$ . Resulta interesante conocer la relación entre la expresión del factor de transcripción T-bet relacionado a la expresión de IFN $\gamma$  durante el curso de la enfermedad en las etapas de desarrollo: destete materno total (DMT), Iniciación (INI) y crecimiento (CRE) debido a que no se tienen datos en la literatura hasta el momento.



### **3.- Justificación**

PCV2 forma parte del Complejo Respiratorio Porcino (CRP) y está diseminado en países con alta producción porcícola. PCV2 se mantiene durante años en órganos linfoides como tonsilas y puede reemerger. Las células CD4+ son células blanco de PCV2 y podrían participar en la persistencia del virus en el hospedero. Además, los Linfocitos Th1 (CD4+) son importantes para la respuesta antiviral mediada por interferón gama (IFN $\gamma$ ), a través de la vía de T-bet (T-box21).

Para conocer los mecanismos de persistencia de PCV2, resulta importante investigar la relación entre la expresión del factor de transcripción T-bet, el cual es reconocido como el factor regulador maestro de la maduración de linfocitos Th1, y la expresión de IFN $\gamma$  durante las etapas de desarrollo de cerdos en producción comercial.

### **4.- Hipótesis**

En los linfocitos T (CD4+) infectados por PCV2, la vía T-bet (T-box) está sobre expresada y esta sobreexpresión favorece la represión de Interferón gama (IFN $\gamma$ ).

### **5.- Objetivo general**

Explorar la relación entre la expresión del factor de transcripción T-bet e IFN $\gamma$  en células CD4+ aisladas de cerdos infectados naturalmente con PCV2, no vacunados.

#### **5.1.- Objetivos específicos**

- 1.- Evaluar la presencia de PCV2 en cerdos PCV2+ y PCV2- en tres diferentes etapas de desarrollo.
- 2.- Cuantificar las poblaciones celulares de leucocitos mononucleares aislados de sangre periférica en individuos PCV2+ y PCV2-, en tres diferentes etapas de desarrollo.

- 3.- Determinar la población de linfocitos T CD4+ en individuos PCV2+ y PCV2- en tres diferentes etapas de desarrollo.
- 4.- Analizar la expresión de reguladores de la diferenciación T-bet, GATA3 y de citocinas IFN $\gamma$  e IL-4 en Linfocitos T (CD4+) aislados de sangre periférica en individuos PCV2+ y PCV2-, en tres diferentes etapas de desarrollo.

## 6.- Materiales y métodos

### 6.1.-Materiales

**Tabla 2.- Lista de reactivos.**

Reactivo	Descripción	Marca y No. Catalogo.
Anticuerpo primario	Ratón ANTI-porcino CD4+ Purificado, monoclonal.	Bio-Rad MCA6045GA.
Anticuerpo secundario	ANTI-ratón IgG-FITC Hecho en cabra.	Santa Cruz Biotechnology, Inc sc-2010.
Anticuerpo de detección de PCV2 por inmunocitoquímica	ANTI-PCV2-E2-FITC.	CJ-F-PCV2-50X Nalgene.
Perlas magnéticas	Goat ANTI-mouse IgG MicroBreads.	Macs Miltenyi Biotec #130-048-401.
Separador de Leucocitos por gradiente de densidad	Lymphoprep®.	STEMCELL #07801.
Kit para obtención de RNA mensajero	Quick-RNA MINI Prep Plus.	Zymo Research #R1057.
Kit de retro transcripción	RevertAid First strand cDNA synthesis kit.	Thermo scientific #K1622
Pre-Mix para PCR	Master Mix PCR SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)	TAKARA #RR420L

## 6.2.-Oligonucleótidos

**Tabla 3.- Secuencias de *oligonucleótidos***

Gen	Secuencia de <i>oligonucleótidos</i> sentido/anti sentido	Amplicón	T° de alineamiento	Secuencia de referencia (NCBI)
GAPDH	CTCAACGGGAAGCTCACTGG	177pb	60	AF017079
	CACAACCTGGTGCTCAGTGT			
T-bet	GCCTGGACCCAACTGTCAA	199pb	60	AY435216.1
	GAATGCAGGCTTCATGCTGA			
IFN $\gamma$	GCTCTGGGAAACTGAATGAC	167pb	60	NM_213948
	TCTCTGGCCTTGGAACATA			
GATA3	TGCGGGCTCTACCACAAAAT	240	58	NM_001044567.1
	TCGGTTTCTGGTCTGGATGC			
IL-4	GTCTGCTTACTGGCATGTACCA	118	64	NM_214123.1
	GCTCCATGCACGAGTTCTTTCT			
IL-10	AGCCAGCATTAAAGTCTGAGAA	394	60	L20001.1
	CCTCTCTTGGAGCTTGCTAA			NM_214041.1

## 6.3.- Metodología

### 1.- Recolección de las muestras

Se realizó la toma de muestra de sangre periférica en dos granjas porcícolas, denominadas PCV2 + y otra PCV2 -. La primera fue la granja control PCV2- ubicada en Dolores Hidalgo, la cual cuenta con certificación de calidad TIFF, libre de PRRSV y PCV2. Además llevaba a cabo un monitoreo periódico de la presencia de virus del complejo respiratorio porcino por PCR, datos mostrados en la encuesta realizada en el ANEXO VI.

De esta granja se tomaron muestras de 24 animales, para un total de 3 grupos experimentales con 8 animales por grupo: Grupo 1 Destete Materno Total (DMT) que incluyó animales de edad 21 al 24 días post natal, grupo 2 Iniciación (INI)

animales de 60 a 70 días post natal y grupo 3 Crecimiento (CRE) animales de 90 a 120 días post natal.

La segunda colecta se realizó de la granja PCV2+, ubicada el Álvaro Obregón. Donde de la misma manera se tomaron muestras de 24 animales, para un total de 3 grupos experimentales con 8 animales por grupo: Grupo 1 Destete Materno Total (DMT) con animales entre los días 21 al 24 post natal, grupo 2 Iniciación (INI) animales de 60 a 70 días post natal y grupo 3 Crecimiento (CRE) animales de 90 a 120 días post natal.

Cabe destacar que aspectos como el manejo y raza de los animales se encuentran descritos en la encuesta realizada a las dos granjas (ANEXO VI y VII). El manejo de los animales para la colecta de sangre se realizó conforme a lo establecido en las normas oficiales mexicanas vigentes: NOM-062-ZOO-1999 y NOM-056-ZOO-1995.

De la granja infectada (PCV2+) se tomaron muestras de sangre periférica de las tres etapas para evaluar la presencia del virus y cuantificar el número de células PCV2+ circulantes.

Se registraron los pesos de los animales de ambos grupos experimentales en cada una de las tres etapas de desarrollo.

## **2.- Aislamiento de Leucocitos**

Se realizó el aislamiento de leucocitos mononucleares por la técnica de separación por gradiente de densidad utilizando el reactivo lymphoprep. Posteriormente se tomó una alícuota de  $2 \times 10^6$  células para cuantificar linfocitos CD4+ por citometría de flujo.

## **3.- Extracción de RNA**

Se realizó extracción de RNA con el kit Zimo Research utilizando aproximadamente  $1 \times 10^4$  células de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Posteriormente se

cuantificó en el equipo nanoDrop y se verificó que la relación de calidad fuera 1.8 – 2.0 en relación 260/280nm.

#### **4.- Retrotranscripción**

Se realizó la Retrotranscripción (RT) utilizando la enzima (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase /Thermo Fisher Scientific®). Se siguieron las indicaciones recomendadas por el fabricante

#### **5.- PCR cualitativa**

Posteriormente, se realizó un gradiente de densidad para conocer la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos GAPDH, IFN $\gamma$ , T-bet, GATA3, IL-4, IL-10 (ANEXO VIII).

Se realizó una curva estándar con diferentes diluciones de cDNA utilizando GAPDH para conocer la concentración óptima para una correcta amplificación del gen de referencia, datos mostrados en el ANEXO X. Cabe destacar que las muestras fueron ajustadas a 60 ng/ $\mu$ l de los cuales se utilizaron 120 ng/ $\mu$ l por cada medición.

#### **6.- PCR cuantitativa**

Se realizó PCR tiempo real para analizar la expresión de IFN $\gamma$ , GATA3, IL-4 e IL-10, donde se utilizó el gen constitutivo GAPDH.

Se utilizaron los oligonucleótidos descritos por:

Pilon *et al.*, 2009 (GAPDH, IFN $\gamma$ ); (Royae *et al.* 2004 (T-bet); Gu *et al.*, 2013 (GATA3); (Duvigneau *et al.*, 2005 (IL-4); (Suradhat *et al.*, 2019 (IL-10). Todos los juegos de oligonucleótidos fueron examinados con los programas informáticos Primer Blast e IDTDNA.com, con secuencias de referencia

Condiciones qPCR: desnaturalización inicial 95 grados centígrados por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 grados por 15 segundos, alineamiento 60 grados por 30 segundos, elongación 72 grados por 30 segundos, elongación final 72 grados por 4 minutos.

## **7.- Análisis de inmunodetección de microorganismos asociados a CRP**

Se enviaron muestras de suero a un laboratorio certificado, para la detección de diversos virus del CRP frecuentemente encontrados como coinfecciones y los cuales pudieran estar presentes en alguna etapa del desarrollo, estas pruebas fueron ELISA para PRRSV, PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae* y hemoaglutinación para SIV H1N1 y H3N2.

## **6.4- Métodos**

### **1.-Aislamiento de células blancas mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando el reactivo separador de leucocitos por gradiente de densidad Lymphoprep.**

Se separaron células blancas de sangre periférica de cerdo, utilizando 15 ml de sangre con 1.5 ml de EDTA [0.5 M] el cual se mezcló con 15 ml de buffer PBS+SFB2% durante 30 minutos en agitador para que se homogenizara totalmente. Posteriormente en tubo falcon (50 ml) se depositaron 15 ml del reactivo lymphoprep y se agregó la mezcla anterior por la pared del tubo. Se centrifugó a 2,900 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Se recolectó la interface en otro tubo y se agregó PBS para romper el gradiente de densidad, posteriormente se centrifugó 2,000 rpm por 10 min para obtener pellet de células aisladas. Se re suspendió el pellet en 5 ml de PBS y posteriormente se cuantificó el número de células con un equipo contador automatizado para células (Marca Millipore 60 µl) con dilución 1/20. Por último, se separaron  $2 \times 10^6$  células para realizar citometría, también  $10 \times 10^6$  células para el aislamiento de células CD4+ y las células restantes se depositaron en 500 µl de Tri-reagent® para posteriores análisis.

## **2.-Preservación de leucocitos aislados para citometría de flujo.**

Se utilizaron  $2 \times 10^6$  células disueltas en PBS previamente aisladas con lymphoprep. Se centrifugaron 2,000 rpm por 5 minutos. El pellet se re-suspendió en 1 ml de paraformaldehído 3.7 %. Se almacenaron las muestras a 4 °C hasta su uso.

## **3.-Marcaje y aislamiento de linfocitos CD4+ con perlas magnéticas Miltenyi®.**

Se utilizaron  $10 \times 10^6$  leucocitos aislados con lymphoprep para el aislamiento de células CD4+. Se centrifugaron 2000 rpm por 5 minutos, se agregó el anticuerpo primario anti CD4+ (3 µl de Ac. Y 3 ml PBS/0.5% BSA) hecho en ratón. Posteriormente se incubó por 1 hora conforme a lo establecido por el fabricante pero adicionalmente se incubó en agitador orbital 30 minutos para mejorar las uniones del anticuerpo a las células. Se realizaron dos lavados con PBS y se agregó el anticuerpo secundario anti ratón marcado con una perla magnética, se incubó por una hora a 4 °C conforme a lo establecido por el fabricante. Se realizó un lavado con PBS y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se transfirieron las células a una columna de separación magnética de separación positiva, donde las células marcadas se quedaron adheridas a la columna para posteriormente mediante un lavado de la columna, obtener a las células aisladas, estas células aisladas fueron CD4+.

## **4.-Obtención de RNA mensajero con el kit Zymo Research y retro transcripción para generación de banco de cDNA.**

Las células CD4+ obtenidas de la separación con perlas magnéticas se usaron para la obtención de RNA mensajero con el Kit Zymo Research conforme a las especificaciones del fabricante, posteriormente se utilizó el kit de retro transcripción Thermo scientific conforme a lo establecido por el fabricante para generar bancos de cDNA de cada muestra.

### **5.-Protocolo para citometría de flujo con leucocitos de cerdo con Anticuerpos anti CD4+ y Anticuerpos anti Anti-mouse IgG - FITC.**

Se utilizaron células previamente fijadas con paraformaldehído en una concentración de  $1.5 \times 10^5$  células las cuales se centrifugaron y se lavaron 2 veces con PBS para eliminar residuos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti CD4+ (5  $\mu$ l de Ac. Y 100  $\mu$ l PBS/0.5% BSA), posteriormente se incubó por 1 hora conforme a lo establecido por el fabricante, pero adicionalmente se dejó en agitador orbital para mejorar las uniones del anticuerpo a las células. Se realizó un lavado con PBS y se incubó posteriormente con el anticuerpo secundario IgG anti ratón-FITC conforme a lo recomendado por el fabricante, se dejó incubando por 1 hora, posteriormente se lavó con buffer PBS y se re suspendieron las células en 500  $\mu$ l de PBS para realizar la citometría de flujo.

### **6.-Protocolo para marcaje de células infectadas con PCV2 utilizando Anticuerpo anti proteína E2 de la cápside viral.**

Se utilizaron células previamente fijadas con paraformaldehído en una concentración de  $1 \times 10^5$  células, se lavaron 3 veces con PBS-Tritón al 0.03% y se agregó solución bloqueadora (PBS-TRITÓN 0.3% al 10% con suero de ternera) dejándose incubar por 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con PBS-Tritón. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo anti-PCV2 acoplado a FITC (50X) a una concentración de 1X (10  $\mu$ l en 0.5 ml) en PBS-Tritón y en ausencia de luz y en reposo por toda la noche.

Finalmente se dieron 3 lavados con PBS-Tritón y uno más con agua destilada para en seguida dejarse en glicerol al 40%, adicionalmente se agregó el reactivo DAPI como contraste y tinción de núcleos celulares. Se observó al microscopio de fluorescencia, con luz ultravioleta a objetivo de 10X con un Zoom de 4X. Las fotografías fueron tomadas con una cámara comercial acoplada al microscopio.



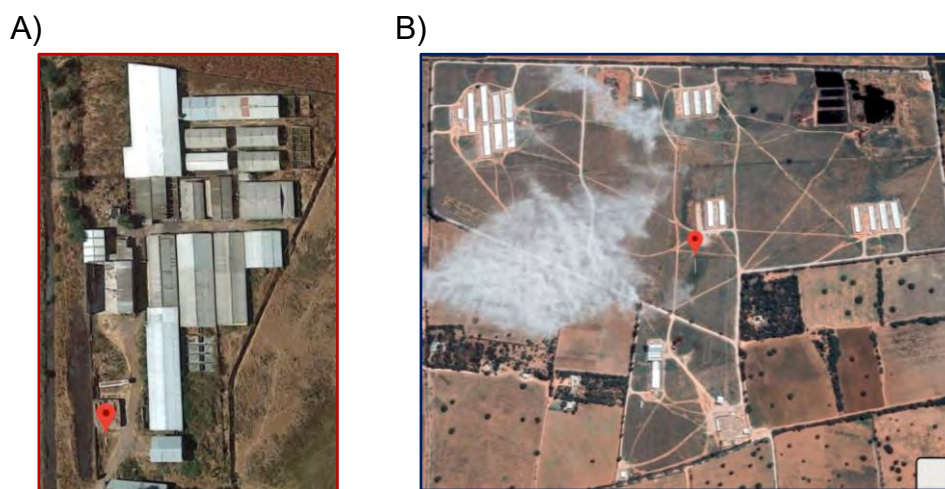
## **7.- Análisis estadístico**

Se utilizó la versión 6.01 del programa informático GraphPad Prism para realizar las gráficas y figuras del presente trabajo, así como las pruebas estadísticas de las mismas, las cuales fueron prueba t de Student, ANOVA y Prueba post hoc de Tukey, con un nivel de significancia de  $P = <0.05$ .

## 7.- Resultados

### 1. Localización de las granjas para los muestreos

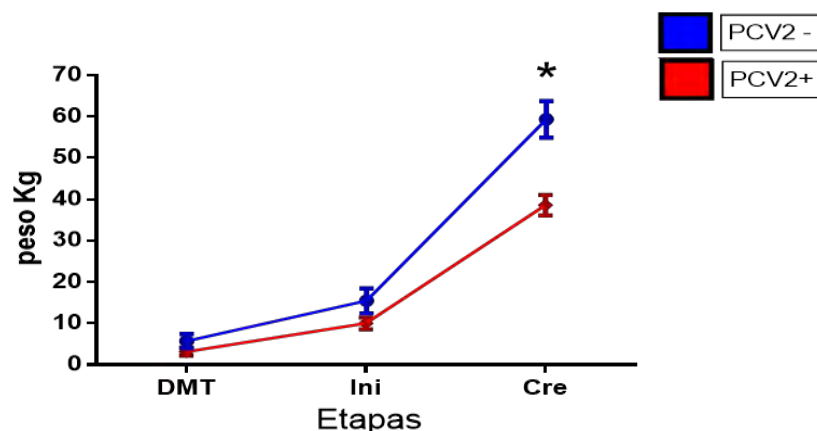
Se realizó un muestreo en dos diferentes granjas y se designaron los dos grupos denominados PCV2+ y PCV2- con una N=24 por cada una. En nuestro grupo de trabajo del laboratorio en trabajos anteriores, se había documentado la presencia de PCV2. Por otro lado, la granja PCV2- estaba certificada al momento de la toma de muestra y cumple las buenas prácticas de producción porcícola además de las pruebas por PCR, por lo que se asegura que los animales estaban libres de PCV2.



**Figura 4.- Localización de las granjas del muestreo.** A) Granja PCV2+ con ubicación en 19.867833,-101.033778 Michoacán. B) Granja control PCV2- con ubicación en 21.307095,-100.875984 Guanajuato.

## 2. Registro del peso de los animales PCV2+ y PCV2-

Se pesaron nueve cerdos al azar por cada granja para observar la ganancia de peso en cada etapa del desarrollo.



**Figura 5.- Ganancia de peso en cada etapa del desarrollo.** En azul se muestra la granja control PCV2- y en rojo se muestra la granja PCV2+. \* $P < 0.05$ ;  $N=9$ , Prueba t entre grupos de la misma edad.

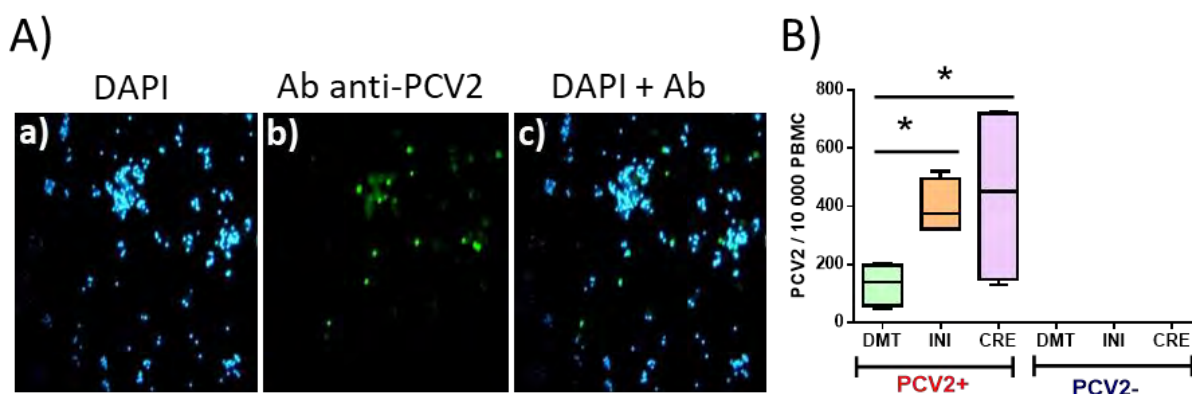
En la siguiente tabla se analizaron los factores externos e internos que podrían intervenir en la pérdida de peso de los animales PCV2+

**Tabla 4.- Causas asociadas a la pérdida de peso en los animales infectados con PCV2.**

Causas externas	Consecuencias a corto plazo	Consecuencias a largo plazo	Referencias
<u>Mal manejo de los animales:</u> baja o nula ventilación, cambio brusco de temperatura, baja sanidad	Pérdida del apetito, signos de depresión, estrés.	Aumento de la vía metabólica-catabólica proteica para mantener las necesidades basales para subsistir.	Nauwynck, N., 2007
<u>Coinfecciones virales:</u> CRP	Aumento de la defensa de la respuesta inmune.	Aumento de las necesidades energéticas.	Brockmeier, S. L. <i>et al.</i> , 2002
<b>Causas asociadas a PCV2</b>			
<u>PCV2:</u> daño a las paredes del intestino	Mala absorción de los alimentos.	Diarrea: el alimento pasa tan rápido por el intestino que no hay absorción de los nutrientes.	Caswell, J. L. <i>et al.</i> , 2016

### 3. Determinación de células positivas a PCV2.

Se realizó Inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo anti-PCV2-FITC para determinar la presencia del virus en leucocitos aislados de sangre periférica (PMBC). Se presentan fotografías representativas Figura 6A. Posteriormente, para cuantificar las células positivas a PCV2, se realizó citometría de flujo de cada aislado de PMBC de cada animal en cada etapa del desarrollo proveniente del grupo PCV2+ y PCV2-, con el anticuerpo anti-PCV2-FITC. Todos los animales del grupo PCV2+ mostrarán células positivas a PCV2.

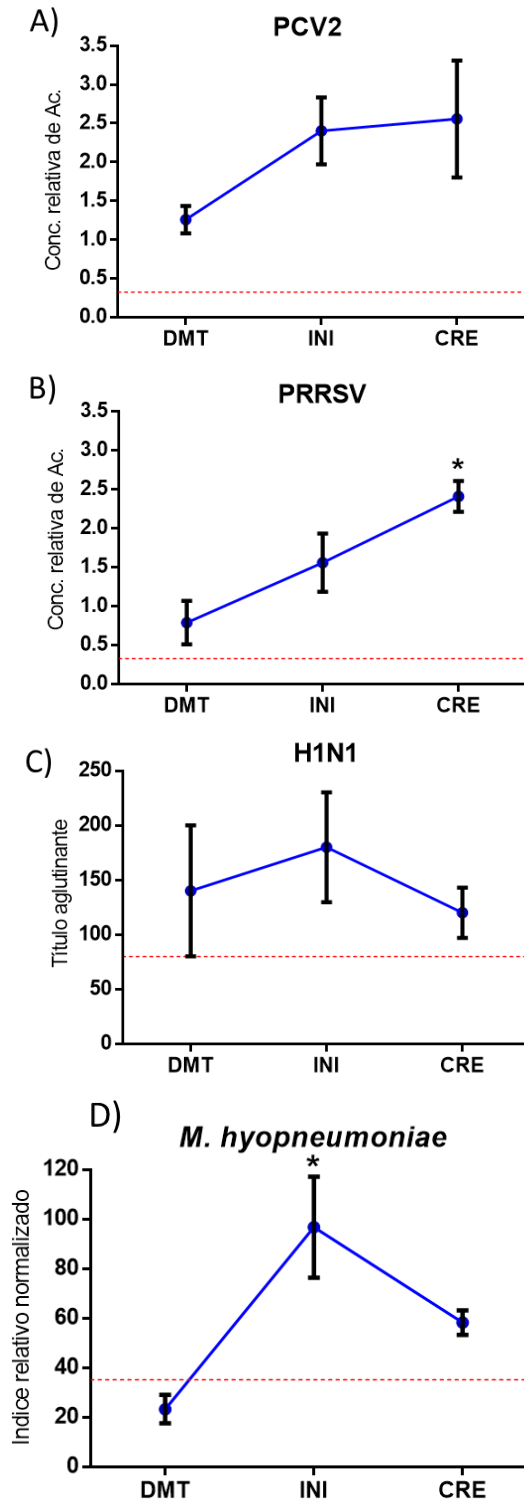


**Figura 6.- Células PCV2+ de cerdo en las diferentes etapas del crecimiento.** A) Imagen representativa de leucocitos obtenidos de un lechón del grupo PCV2+ (INI), técnica cualitativa de Inmunofluorescencia visto en el microscopio de fluorescencia 40X. a) tinción de contraste con DAPI. b) anticuerpo anti-PCV2-FITC. c) Sobre posición de las imágenes a y b. B) Cuantificación de células PCV2+, en las diferentes etapas del desarrollo. Evaluación a través de citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti-PCV2-FITC. \* $P < 0.05$ ;  $n=4$ ; ANOVA, Tukey.

### 4. Determinación de anticuerpos contra microorganismos que conforman el Complejo Respiratorio Porcino.

Se realizaron pruebas de inmunodetección para la detección de anticuerpos contra microorganismos frecuentemente encontrados en el CRP y así determinar co-infecciones que pudieran haber tenido los animales del grupo PCV2+ y corroborar

la presencia de PCV2. Cabe destacar que no se detectó la presencia de anticuerpos contra el virus de la influenza porcina H3N2.



**Figura 7.- Inmunodetección de los principales agentes del CRP.** A) Prueba de ELISA para determinación de anticuerpos anti PCV2, Concentración relativa de Ac. mayor a 0.4 se consideró

positivo. B) Prueba de ELISA para detección de anticuerpos anti PRRSV, Concentración relativa de Ac. mayor a 0.4 se consideró positivo. C) Prueba de Hemoaglutinación para determinar el virus de la Influenza H1N1, Título aglutinante mayor a 80 fue considerado positivo y D) Prueba de ELISA para determinar anticuerpos anti *Mycoplasma hyopneumoniae*, Índice relativo normalizado mayor a 35 fue considerado positivo.

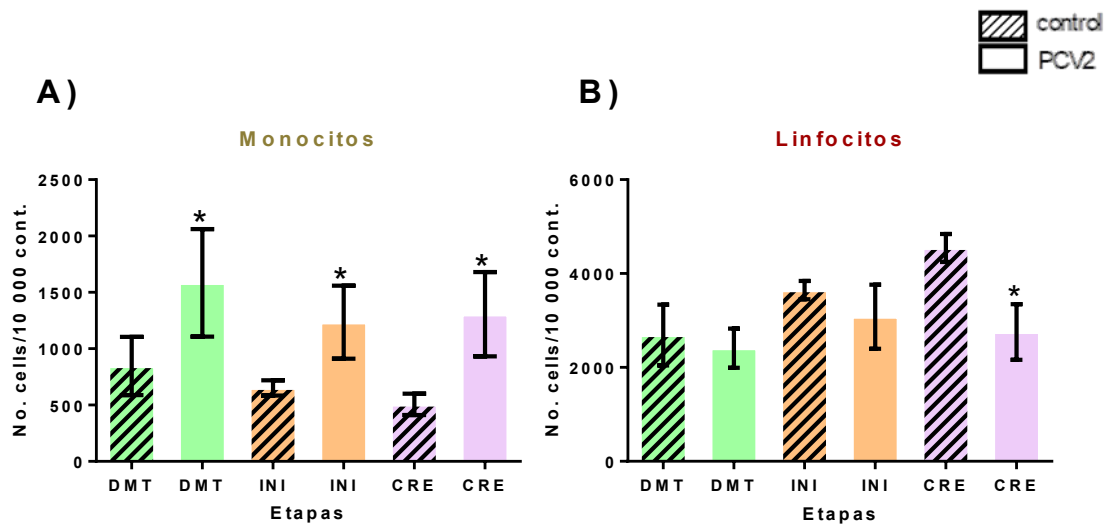
En la tabla 5 se muestra el resumen de las pruebas anteriormente descritas

**Tabla 5.-Anticuerpos contra microorganismos asociados al CRP.**

Virus	DMT	INI	CRE	Tipo de prueba
PRRSV	2/4	4/4	4/4	ELISA
PCV2	4/4	4/4	4/4	ELISA
SIV (H1N1)	4/4	4/4	4/4	hemoaglutinación
SIV (H3N2)	0/4	0/4	0/4	hemoaglutinación
<b>Bacteria</b>				
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1/4	4/4	4/4	ELISA

## **5. Determinación de poblaciones celulares de acuerdo con su tamaño y complejidad.**

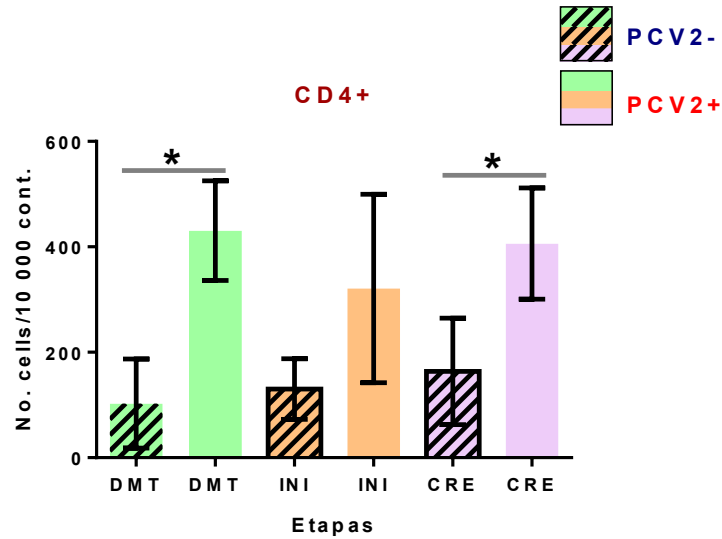
Se cuantificaron las poblaciones celulares mononucleares para conocer cómo se encontraba el sistema inmune de los animales infectados comparado con los animales control. Se cuantificó la población de monocitos y linfocitos, los cuales se compararon con su control PCV2-, esto para conocer los cambios relacionados con estas células en las diferentes etapas del desarrollo.



**Figura 8.- Poblaciones celulares mononucleares aisladas de sangre periférica.** A) Población celular de monocitos de los dos grupos PCV2- (control) marcado con barras rayadas y PCV2+ (PCV2) marcado con barras lisas en las diferentes etapas de desarrollo. Separación por citometría de flujo de acuerdo con el tamaño y complejidad B) Población celular de linfocitos de los dos grupos PCV2- (control) y PCV2+ (PCV2) en las diferentes etapas del desarrollo. Separación por citometría de flujo de acuerdo con el tamaño y complejidad \* $P < 0.05$ ;  $n=4$ ; ANOVA, *Tukey*. 10,000 eventos (células) por lectura en 3 repeticiones.

## 6. Determinación de poblaciones celulares CD4+.

Se realizó la cuantificación de células CD4+ en cada etapa de desarrollo animal para conocer el aumento o disminución de estas, comparándolas con su control.

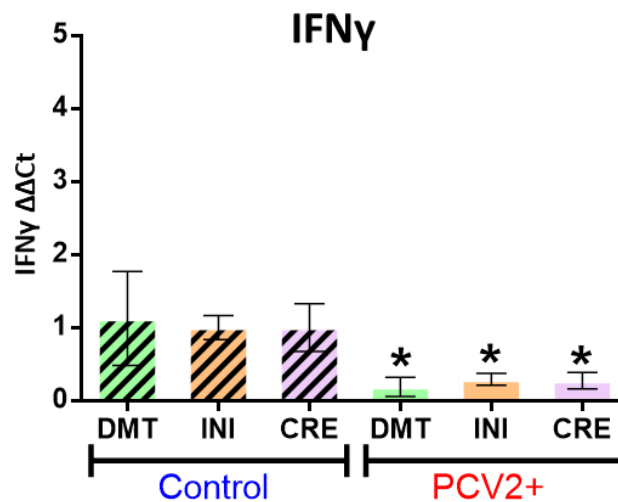
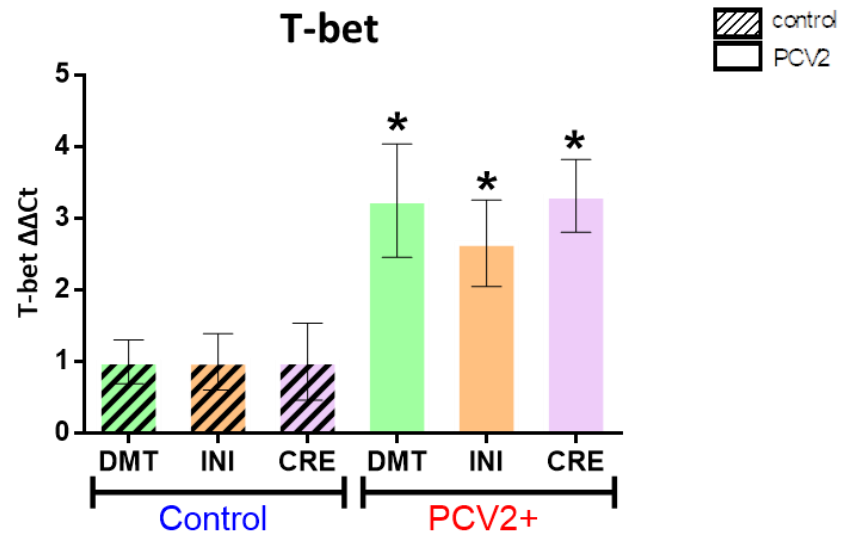


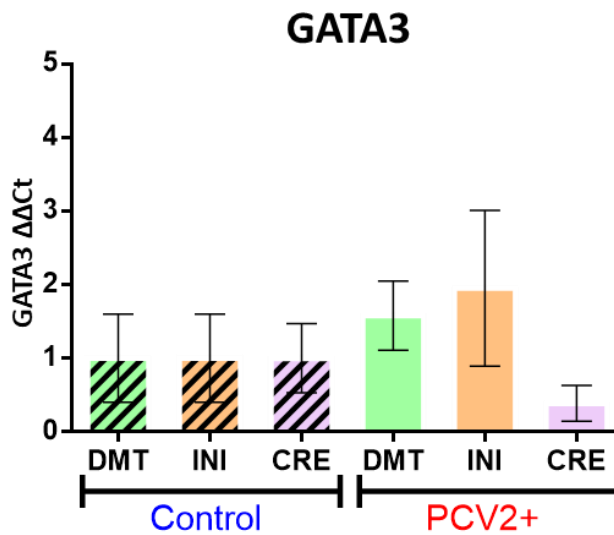
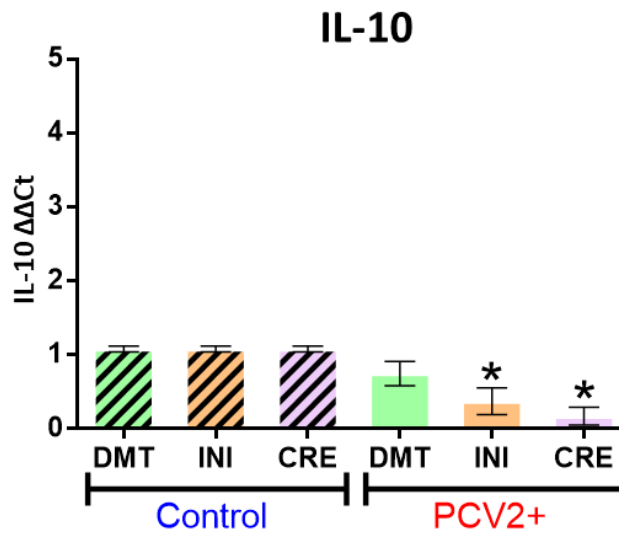
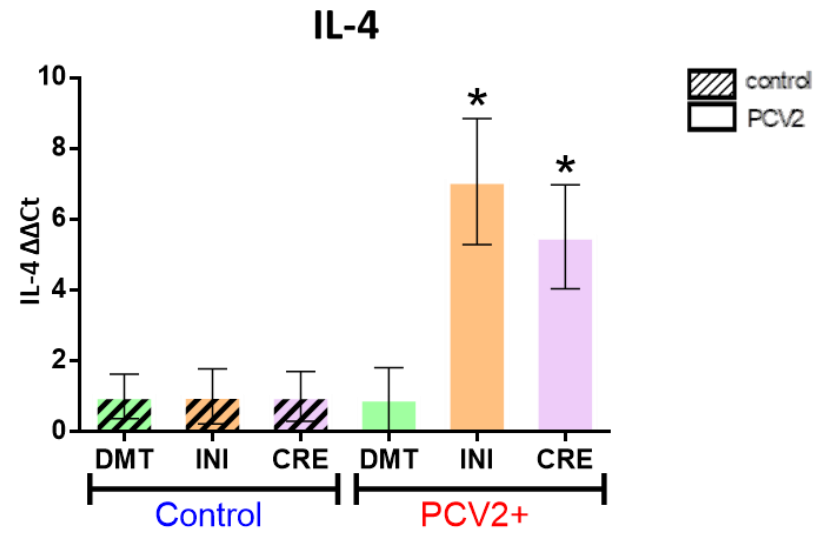
**Figura 9.- Poblaciones celulares de células CD4+ de los dos grupos PCV2- (control) y PCV2+ (PCV2) en las diferentes etapas de desarrollo.** Evaluación a través de citometría de flujo, células marcadas con anticuerpo anti-CD4-FITC. Grupo PCV2- marcado con barras rayadas y grupo PCV2+ marcado con barras lisas. \* $P = < 0.05$ ;  $n=4$ ; ANOVA, *Tukey*. 10,000 eventos (células) por lectura en 3 repeticiones.



## 7. Análisis de la expresión de genes relacionadas a la vía T-bet.

Se cuantificó la expresión de genes T-bet, IFN $\gamma$ , IL-4, GATA3 e IL-10 de linfocitos CD4+ aislados por selección positiva a partir de sangre de cerdo.





**Figura 10.- Expresión de T-bet, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 y GATA3 en las diferentes etapas de desarrollo en los dos grupos PCV2- (control) y PCV2+ (PCV2).** Análisis a través de qPCR. Gen constitutivo GAPDH, Grupo PCV2- marcado con barras rayadas y grupo PCV2+ marcado con barras lisas.  $\Delta\Delta CT$ .- Veces de cambio \* $P$  = < 0.05; n=8; ANOVA, *Tukey*.

## 8.-Discusión

La toma de muestra para la determinar la presencia de PCV2 fue colectada de sangre periférica, debido a que órganos como las tonsilas son de difícil acceso y se requiere que los animales estén vivos durante la colecta.

Particularmente, en campo se observó que en la semana 9 los animales presentaron palidez, adelgazamiento, ictericia, mientras que en animales de 16 semanas de edad se observó retraso del crecimiento.

Se evaluó el peso de los animales entre ambos grupos para conocer la ganancia o pérdida de peso. El resultado mostró que durante las etapas DMT e INI no hubo diferencia respecto a la ganancia de peso entre ambos grupos, pero en la etapa CRE, los animales PCV2+ mostraron un menor peso comprado con el grupo control (Figura 5).

En la tabla 5, se resumen algunas de las causas que podrían estar originando que durante la etapa CRE se observara menor ganancia de peso. En la que destaca el hecho de que PCV2 está asociado al daño en las paredes del intestino, por lo tanto, esto evita la absorción correcta de nutrientes. En conjunto los factores externos e internos podrían explicar el desmedro de los animales, observado en la pérdida de peso en la etapa CRE.

Además, en la infección por HIV que es un virus similar a PCV2 por tener células blanco CD4+ e inducir caquexia en los individuos infectados, también se han observado causas similares por las cuales los pacientes HIV+ pierden peso, por ejemplo, el incremento de la respuesta inmune por aumento en la secreción de TNF $\alpha$ , reducción del apetito e inflamación del tracto digestivo (OMS, 2003).

Para corroborar la presencia de PCV2 y conocer el contexto de este resultado en relación con otros microorganismos que conforman el CRP se realizaron pruebas de inmunodetección de PCV2, PRRSV, H1N1, H3N2 y *M. hyponeumonie*. Los datos se muestran en la figura 7 y se resumen en la tabla 5. Dónde, se observó aumento de títulos de anticuerpos contra PCV2 en las tres diferentes etapas de desarrollo, y este aumento se correlacionó con el aumento de las células infectadas por PCV2. El resultado también mostró títulos positivos para los virus PRRSV, H1N1 y *M. hyponeumonie*. Por otro lado no se detectó la presencia del virus H3N2, el cual también es de interés porque se ha reportado que puede alterar la respuesta de los linfocitos CD4+ infectando células del tracto respiratorio así como MΦs alveolares y por tanto también causa el deterioro de salud en los animales.

En este trabajo se determinó la presencia de PCV2 en las muestras de animales de la granja PCV2+ mediante inmunocitoquímica Usualmente esta técnica se utiliza para detectar PCV2 en tejidos y es como usualmente se reporta en la literatura (Seo *et al.*, 2014). Así, esta técnica se utiliza como cualitativa para la detección de PCV2 en tejidos ó cuantitativa dando una cantidad de células positivas por centímetro cuadrado en tejido. Sin embargo, en el presente trabajo se utilizó una muestra representativa de un cerdo del grupo PCV2 donde se observó la presencia de PCV2 en sangre periférica, esto debido a que el lechón estaba en la etapa donde se ha reportado que hay un aumento de la viremia de PCV2 (Figura 6a).

La cuantificación de las células PCV2+, se realizó a través de citometría de flujo (figura 6b), se observó un aumentó en la presencia de PCV2 en el orden de: menor en la etapa DMT y aumento en las etapas INI y CRE (Resultado 1). Los datos sugieren que en la atapa CRE se mantiene la cantidad de células infectadas. Por otra parte, los animales provenientes de la granja negativa a PCV2, efectivamente resultaron negativos.

Se encontró que esta técnica es un método relativamente sencillo de realizar, comparándolo con otras técnicas como PCR e hibridación *in situ* donde se requieren instrumentos y materiales más costosos para estas técnicas, así como mayor complejidad en los protocolos.

Por otro lado, con el uso del anti-PCV2-FITC es posible la detección de ambos genotipos presentes en México (a y b) considerando que es una técnica en la que se detecta la proteína E2 presente en la cápside viral, independientemente del genotipo. Por otro lado, la técnica de PCR es útil para medir la replicación viral y conocer el título viral en cada etapa del desarrollo de los animales y es ampliamente usada para el diagnóstico en animales vacunados, debido a que al ser un método cuantitativo se puede observar el aumento del título viral a medida que avanza la enfermedad, esto permite discriminar un animales con una infección viral activa de un animal vacunado. En este trabajo, la determinación de PCV2 a través de inmunodetección, tales como citometría de flujo y ELISA, resultan útiles considerando que los animales estudiados no estaban vacunados, por lo tanto, el conteo de células PCV2+ y los títulos de anticuerpos anti-E2 de PVC2 reflejan el comportamiento del virus durante las diferentes etapas evaluadas.

Aunado a los resultados de las células infectadas por PCV2, también se cuantificó el título de anticuerpos anti PCV2 mediante ELISA (Figura 7a y tabla 5). Los resultados confirmaron la presencia de anticuerpos contra PCV2 en las tres etapas de desarrollo, con un incremento similar al encontrado con las células infectadas PCV2+. Además se evaluaron otros agentes del CRP como PRRSV, H1N1, H3N2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* (Figura 7 y tabla 5). Los resultados fueron positivos para anticuerpos contra PRRSV, Influenza H1N1 y *M hyopneumoniae*, lo cual indica la presencia de éstos patógenos en la granja experimental. Las co-infecciones con éstos microorganismos comprometen la respuesta inmune debilitando la respuesta inmune adaptativa, tanto celular como humnoral. Además, contribuyen con la disfunción en las necesidades nutricionales y de crecimiento que ocasionan un deterioro de la salud del animal a largo plazo.

También se determinó la población de monocitos y linfocitos en las tres etapas de desarrollo y se utilizó como controles animales PCV2-. Los resultados mostraron que en las tres etapas aumenta el número de monocitos en el grupo experimental comparados con su control, lo cual podría indicar la presencia de co-infecciones virales o bacterianas y la activación de la respuesta inmune, disminuyendo la

ganancia de peso. Se ha reportado que durante la infección con PCV2 en monocitos aislados con un reto de PCV2 aislado se observó que aumentaba el número de monocitos, sin embargo no se sabe que vía de señalización que expresen citocinas antiapoptóticas y anti-inflamatorias que favorezcan la infección viral (Tsai *et al.*, 2010). Los datos sugieren que la infección de PCV2 en cerdos naturalmente infectados aumenta el número de monocitos por la infección viral y por coinfecciones de microorganismos infecciosos respiratorios, tales como los pertenecientes al CRP y que también están presentes en la granja experimental.

Con respecto a la población de linfocitos se observó que en las etapas DMT e INI no hubo diferencia comparada con el grupo control. Sin embargo, en la etapa CRE se observó linfopenia marcada (Figura 8). Esto concuerda con la sintomatología en estos animales, las cuales fueron retraso del crecimiento, diarrea, ictericia, desmedro y signos de cansancio. También en la literatura se ha mostrado que durante el incremento de la infección viral por PCV2 se ha observado disminución en las células CD4+, CD8+ y Linfocitos B, evidenciando el compromiso inmunológico celular. No se había documentado hasta el momento la repuesta de los linfocitos en cada etapa del desarrollo en animales naturalmente infectados por PCV2 comparados con animales libres del virus. Estos datos sugieren que los animales PCV2+ durante la etapa DMT e INI mantienen un conteo estable de estas células ante la infección viral, pero disminuye cuando pasan a la siguiente etapa de desarrollo, la etapa CRE.

Para conocer particularmente lo que ocurría con la población de linfocitos T cooperadores (CD4+), células blanco del virus (Lin *et al.*, 2008), se evaluó el número de células CD4+ utilizando el anticuerpo anti-CD4 (figura 9). El resultado mostró que en las etapas DMT y CRE, los linfocitos CD4+, se encuentran aumentados comparados con las células de los animales control. Mientras que en la etapa INI no se observan cambios. Por un lado, estos datos nos llevan a sugerir que en la etapa de DMT, el aumento de la población de células CD4+ podría ser una respuesta natural del cerdo a la adaptación del virus, tal como se ha reportado para otro virus, el virus de la influenza A (H1N2), el cual, el cerdo es su hospedero natural

(Talker et al., 2015). Por otro lado, en la etapa INI al haber un aumento de las células infectas (Figura 6b), se podría estar favoreciendo la replicación viral en células CD4+, lo cual podría estar asociado al ciclo lítico del virus. Esto se relaciona a la disminución de estas con respecto a la etapa inmediata anterior. Esta especulación surge de la correlación del comportamiento de población de CD4+ igual al control y el aumento de las células PCV2+. Finalmente en la etapa de CRE, el aumento de linfocitos CD4+, coincide con el aumento significativo de las células PCV2+ y de la expresión de IL-4 (figura 10c), lo cual podría estar favoreciendo la supervivencia celular, permitiendo que las células CD4+ aumenten.

En este sentido, Steiner y colaboradores (2009) reportaron en cerdos SPF infectados con PCV2 el número de células CD4+ aumentaba durante un periodo de 2 semanas tras la infección y posterior a este periodo había una tendencia a disminuir. Por otro lado, datos similares se obtuvieron en el presente trabajo en cerdos naturalmente infectados, donde se observó aumento de células CD4+ en las etapas DMT y CRE, sin cambio en la etapa INI respecto al control. Este dato nos sugiere que las células CD4+ pudieran tener estos mismos ciclos de aumento y posterior disminución celular en cerdos naturalmente infectados, y también debido a lo discutido anteriormente que involucra el aumento de las células infectadas, indicando la diseminación del virus.

En cuanto a la respuesta inmune antiviral, se cuantificó la expresión de T-bet, IFN $\gamma$ , GATA3, IL-4 e IL-10, en células CD4+ separadas de otros tipos celulares por selección positiva en los grupos PCV2- y PCV2+, en las tres etapas de desarrollo, mediante PCR cuantitativa (Figura 10). T-bet se encontró sobre expresado en las 3 etapas en el grupo PCV2+ comparado con el grupo control, mientras que IFN $\gamma$  se encontró reprimido en las 3 etapas. Estos datos sugieren que se estimula la diferenciación celular hacia el fenotipo celular Th1. Sin embargo, la baja expresión del IFN $\gamma$  podría deberse a la presencia de elementos inhibidores en el promotor de IFN $\gamma$ , favorecidos por la presencia del virus PCV2. En este contexto, se ha reportado que la vía NF- $\kappa$ B está comprometida durante la infección por PCV2. Esta vía contiene al factor de transcripción P50/P65, el cual desplaza al inhibidor de la región

promotora y favorece la expresión de IFN $\gamma$  (Sica *et al.*, 1997). Un mecanismo por el cual el virus podría estar comprometiendo la vía NF-KB es imposibilitando el desplazamiento del inhibidor y por tanto inhibiendo la expresión de IFN $\gamma$ . Por otro lado, la inhibición del promotor también podría estar comprometida por las vías relacionadas a la expresión de IFN $\gamma$  como, MAPK/ERK y por el favorecimiento de vías antiapoptóticas, como la relacionada a la vía para la expresión de IL-4, como se ha observado en M $\Phi$ s aislados e infectados con PCV2 (Gessani *et al.*, 1998; Darwich *et al.*, 2012). Por todo esto, al observarse la sobre expresión de T-bet, se sugiere que el fenotipo celular Th1 se ve favorecido. Sin embargo, al haber represión de IFN $\gamma$ , se sugiere que las vías por las cuales se expresa esta citocina se encuentran comprometidas.

Por otro lado, se encontró que la expresión de GATA3 fue igual que su control. Al no haber represión en esta vía, se sugiere que el fenotipo celular Th2 también está presente. Pero al no haber cambios en la expresión de GATA3, este pudiera estar favoreciendo que se exprese T-bet. Además, se encontró sobreexpresión de IL-4 durante las etapas de INI y CRE, lo cual podría favorecer vías antiapoptóticas. Por otro lado, también se ha relacionado la expresión de IL-4 con la disminución de la expresión de IFN $\gamma$  en M $\Phi$ s (Gessani *et al.*, 1998; Darwich *et al.*, 2012).

También se analizó la expresión de IL-10, debido a que esta citocina ha sido relacionada a la inhibición de IFN $\gamma$  en leucocitos mononucleares aislados. Además, es la principal citocina relacionada a los linfocitos reguladores (Treg). Se ha documentado que la expresión de SOCS1 está relacionado con la inhibición de IFN $\gamma$  al igual que la IL-10. Incluso, tanto IL-10 como SOCS1 forman parte de la vía de transcripción para la diferenciación hacia el fenotipo celular T reg. La expresión de esta citocina no mostró diferencia significativa en la etapa DMT; sin embargo, se observó disminución de la expresión de IL-10 en los CD4+ aislados en la etapas INI y CRE. Esto sugiere, que el fenotipo Treg no está relacionado con la inhibición de IFN $\gamma$  en las tres etapas del desarrollo, pero no se descarta que otras células diferentes a las CD4+ pudiesen estar expresando IL-10 y tener un efecto en la población de Tregs.



## **10.-Conclusión**

En animales naturalmente infectados con PCV2 y no vacunados, se encontró que la vía T-bet-T-box está desregulada, esto podría favorecer la represión de IFN $\gamma$  en las tres etapas del desarrollo del cerdo. También se encontró sobre expresión de IL-4 en dos etapas del desarrollo INI y CRE, la cual está asociada a vías antiapoptóticas, que podrían facilitar la persistencia del virus en el organismo.

## 11.- Bibliografía

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. p. 16. ISBN: 978-84-9022-894-4
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., ... Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator for IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nature Immunology*, 3(6), 549–557. <https://doi.org/10.1038/ni794>
- Afolabi, K. O., Iweriebor, B. C., Okoh, A. I., & Obi, L. C. (2017). Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa. *Advances in Virology*, 2017, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2017/6807964>
- Alarcon, P., Rushton, J., & Wieland, B. (2013). Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(2), 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.010>
- Alexander Dalpke, Jutta Frank, Mirjam Peter, and K. H. (2006). Activation of Toll-Like Receptor 9 by DNA from Different Bacterial Species. *Science's STKE*, 2007(393), 239. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.940–946.2006>
- Alspach, E., Lussier, D. M., & Schreiber, R. D. (2019). Interferon  $\gamma$  and its important roles in promoting and inhibiting spontaneous and therapeutic cancer immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028480>
- Alvarez, D., Elisabeth H. Vollmann, and U. H. von A. (2010). Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. *Science Direct, Immunity*, 29(3). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.006.Mechanisms>
- Antonia, M., & Monroy, R. (2014). *Circovirosis porcina en Colombia: Aspectos moleculares y caracterización biológica de cepas de campo*, Tesis de maestría.
- Ashman, R. F., Goeken, J. A., Drahos, J., Lenert, P., Elisa, I., & Elisa, I.-. (2005). Sequence requirements for oligodeoxyribonucleotide inhibitory activity, *International Immunology*, 17(4), 411–420. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh222>
- Askonas B. A. (1988). T cell Differentiation and Effector Function. *Immunology*, 15, 403–432.
-

- Astiz, S. *et al.*, (2008) PCV2: Un enfoque histórico de la circovirus porcina. Impacto de la enfermedad en Europa. *Cria y salud*, Vol. 1, pp: 22-23.
- Bao, F., Luo, S. M. Q., Tu, H. G. C., & Gong, G. Z. W. (2017). Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. *Wiley* (June), 1–9. <https://doi.org/10.1111/tbed.12721>
- Bedolla-López, F., V. Q., & Sanchez-betancourt, J. I. (2018). *Identification and genotyping of porcine circovirus type II (PCV2) in Mexico*. *Virus disease*, 6–10. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0460-6>
- Bin, L., Luping, D., Bing, S., Zhengyu, Y., Maojun, L., Zhixin, F., ... Kongwang, H. (2014). Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Plos One*, 9(8), e101968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101968>
- Bojkovski, J. A. (2018). Investigation of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) antibodies in clinically healthy boars from Serbian commercial farms. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2(160429).
- Borghetti, P., Morganti, M., Saleri, R., Ferrari, L., De Angelis, E., Cavalli, V., ... Martelli, P. (2013). Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden. *Veterinary Microbiology*, 163(1–2), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.007>
- Brockmeier, S. L., Patrick G. Halbur, and Eileen L. Thacker. (2002) Capítulo 13 Porcine Respiratory Disease Complex. *Polymicrobial Diseases*, Extraído del e-book: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/>, Bookshelf ID: NBK2499, ISBN-10: 1-55581244-9
- Caswell, J. L., & Williams, K. J. (2016). Respiratory System. In *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals: Sixth Edition* (Sixth Edition, Vol. 2), pp: 527. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5318-4.00011-5>
- Centeno, N., Ochoa, J., Obregón, L., Ruíz, F., Chévez, J., Schagemann, G., Guzmán, H. (2016). Evaluation of two vaccination programs against PRRS virus, PCV2 and

*Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine production system in Mexico. Boehringer Ingelheim.

Chae, C., C. (2015). Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.030>

Cheung, A. K. (2011). Porcine circovirus: Transcription and DNA replication. *Virus Research*, 164(1–2), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.Virusres.2011.10.012>

Correa-fiz, F., Fran, G., Llorens, A., & Segalés, J. (2018). Porcine circovirus 2 (PCV-2) genetic variability under natural infection scenario reveals a complex network of viral quasispecies. *Nature*, (October), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33849-2>

Darwich, L., & Mateu, E. (2012). Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164(1–2), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.003>

Darwich, L., Coma, G., Peña, R., Bellido, R., Blanco, E. J. J., Este, J. A., Bofill, M. (2009). Secretion of interferon- $\gamma$  by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology*, 126(3), 386–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02905.x>

Dawson, H. D., Royae, A. R., Nishi, S., Kuhar, D., Schnitzlein, W. M., Zuckermann, F., Lunney, J. K. (2004). Identification of key immune mediators regulating T helper 1 responses in swine, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.03.006>

Duan, D., Zhang, S., Li, X., Guo, H., Chen, M., Zhang, Y., Lv, Y. (2014). Activation of the TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B signal pathway contributes to changes in IL-4 and IL-12 production in piglet lymphocytes infected with porcine circovirus type 2 *in vitro*. *Plos One*, 9(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097653>

Duffy Catherine, Julie McClintock, Michael McMenamy, John McKillen, Prof. Gordon M. Allan. (2009) preliminary studies in the development of a minor-groove binder PCR assay for the phylogenetic characterisation of PCV2 isolates (Comité organizador: Mária Benkő, Tamás Bakonyi, Balázs Harrach), 8th International Congress of Veterinary Virology, 20 years of ESVV: Integrating classical and molecular virology, Budapest – Hungria, European Society for Veterinary Virology (ESVV).

- Duvigneau, J. C., Hartl, R. T., Groiss, S., & Gemeiner, M. (2005). Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines, *Journal of Immunological Methods*, 306, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.06.021>
- Dvorak, C. M. T., Puvanendiran, S., & Murtaugh, M. P. (2018). Porcine circovirus 2 infection induces IFN  $\beta$  expression through increased expression of genes involved in RIG-IRF7 signaling pathways and I. *Virus Research*, 253(May), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.027>
- Elloumi, H. Z., Maharshak, N., Rao, K. N., Kobayashi, T., Ryu, H. S., Li, F., Mu, M. (2012). A Cell Permeable Peptide Inhibitor of NFAT Inhibits Macrophage Cytokine Expression and Ameliorates Experimental Colitis. *Plos One*, 7(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034172>
- Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., & Jestin, A. (2009). Replication of porcine circoviruses. *Virology Journal*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-60>
- Firth, C., Charleston, M. A., Duffy, S., Shapiro, B., & Holmes, E. C. (2009). Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. *Journal of Virology*, 83(24), 12813–12821. <https://doi.org/10.1128/JVI.01719-09>
- Fric, J., Zelante, T., Wong, A. Y. W., Mertes, A., Yu, H., & Ricciardi-castagnoli, P. (2012). Review article NFAT control of innate immunity. *Blood*, 120(7), 1380–1389. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-404475>
- Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., Shea, J. J. O., Koyasu, S., & Shea, J. J. O. (2001). IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Cell press*, 22(10), 556–560. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02005-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02005-1)
- Fultz, M. J., Barber, S. A., Dleffenbach, C. W., & Vogel, S. N. (1993). Induction of IFN- $\gamma$  in macrophages by lipopolysaccharide. *International Immunology*, 5(11), 1383–1392.
- Gava, R. R. R. D., Fernandes, M. C. S. L. T., & Schaefer, J. R. C. R. (2018). Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1 / 2009 influenza virus in Brazil. *Zoonoses Public Health*, 1(June 2017), 155–161. <https://doi.org/10.1111/zph.12424>

- Gessani, S., & Belardelli, F. (1998). IFN- $\gamma$  expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 9(2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(98\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(98)00007-0)
- Goodridge, H., Reyes, C., Becker, C. et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature* 472, 471–475 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10071>
- Gu, W., Li, C. S., Yin, W. P., Hou, X. M., Zhang, J., Zhang, D., & Guo, Z. (2013). Expression imbalance of transcription factors GATA-3 and T-bet in post-resuscitation myocardial immune dysfunction in a porcine model of cardiac arrest. *Resuscitation*, 84(6), 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2012.11.023>
- Han, H., Xin, C., Liu, Y., Gao, M., Yu, J., Sun, W., & Cong, X. (2018). The correlation between the mutual deletions of amino acids within porcine circovirus rep protein and the discrepancy of replication. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.045>
- Horter, D. C., Yoon, K., & Zimmerman, J. J. (2003). A review of porcine tonsils in immunity and disease, *Animal Health Research Reviews*, 4(2), 143–156. <https://doi.org/10.1079/AHRR200358>
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>
- Junyuan Han, Shuxia Zhang, Yaqun Zhang, Mengmeng Chen, Y. L. (2017). Porcine circovirus type 2 increases interleukin-1 $\beta$  and interleukin-10 production via the MyD88–NF-kappa B signaling pathway in porcine alveolar macrophages *in vitro*. *Journal of Veterinary Science*, 18(2), 183–191. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.183>
- Karuppanan, A. K., & Opriessnig, T. (2017). Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology, *Viruses*, 2, 1–15. <https://doi.org/10.3390/v9050099>
- KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto, (27 de diciembre de 2019), NF-kappa B signaling pathway,

PATHWAY: map04064, recuperado de: [https://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04064](https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?map04064)

KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto, (27 de diciembre de 2019), Th1 and Th2 cell differentiation, PATHWAY: map04658, recuperado de: [https://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04658](https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?map04658)

KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto, (27 de diciembre de 2019), Natural killer cell mediated cytotoxicity, PATHWAY: map04650, recuperado de: [https://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04650](https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?map04650)

KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto, (27 de diciembre de 2019), Toll-like receptor signaling pathway, PATHWAY: map04620, recuperado de: [https://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04620](https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?map04620)

Kekarainen, T., & Segalés, J. (2015). Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine Health Management*, 1(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0012-z>

Kekarainen, T., Montoya, M., & Dominguez, J. (2008). Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.031>

Klausmann, S., Sydler, T., Summerfield, A., Lewis, F. I., Weilenmann, R., Sidler, X., & Brugnera, E. (2015). T-cell reprogramming through targeted CD4-coreceptor and T-cell receptor expression on maturing thymocytes by latent Circoviridae family member porcine circovirus type 2 cell infections in the thymus. *Emerging Microbes & Infections*, 4(000), 0. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.15>

Kopan, R. (2012). Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 10(4), 1–4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011213>

Kristensen, C. S., Hjulsager, C. K., & Larsen, L. E. (2015). A two-year follow-up study of the PCV2 status of a Danish pig herd that was initially assumed to be PCV2-free. *Porcine Health Management*, 1, 1–5. <https://doi.org/10.1186/2055-5660-1-5>

- Bryan Ray, L. (2007). Allosteric Activation of Toll-Like Receptor Activity. *Science's STKE*, 2007(393), 239. <https://doi.org/10.1126/stke.3932007tw239>
- Li, J., Park, J., Foss, D., & Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *Journal of Experimental Medicine*, 206(3), 607–622. <https://doi.org/10.1084/jem.20082232>
- Lin, C. M., Jeng, C. R., Chang, H. W., Guo, I. C., Huang, Y. L., Tsai, Y. C., Pang, V. F. (2008). Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124(3–4), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.04.019>
- Liu, L. E. I., Wang, Y. U. N., Fan, Y. I., Li, C., & Chang, Z. (2004). IFN- $\gamma$  Activates cAMP / PKA / CREB Signaling Pathway in Murine Peritoneal Macrophages. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 342, 334–342.
- Liu, Y., Guo, Y., Zhou, S., Liu, F., Du, F., Zheng, X., ... Zhang, Z. (2010). CREB Is a Positive Transcriptional Regulator of Gamma Interferon in Latent but Not Active Tuberculosis Infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(9), 1377–1380. <https://doi.org/10.1128/CVI.00242-10>
- Ma, C. M., Hon, C. C., Lam, T. Y., Li, V. Y. Y., Wong, C. K. W., de Oliveira, T., & Leung, F. C. C. (2007). Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. *Journal of General Virology*, 88(6), 1733–1737. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82629-0>
- Meehan, B. M., Berg, M., Timmusk, S., Elving, J., Fuxler, L., Magnusson, M., ... Fossum, C. (2007). Structure-Dependent Modulation of Alpha Interferon Production by Porcine Circovirus 2 Oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Virology*, 81(10), 4919–4927. <https://doi.org/10.1128/JVI.02797-06>
- Meng, X. (2013). Porcine Circovirus Type 2 ( PCV2 ): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 43–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103720>



- Meng, X. J. (2012). Emerging and Re-emerging Swine Viruses. *Emerging Swine Viruses*, 59, 85–102. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01291.x>
- Miller, L. C., & Nadc, U. A. R. S. (2011). Gene expression in lymph nodes of PRRSV-infected pigs. *Pork checkoff*, NPB #08-247, 1–18.
- Montaner Tarbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M., & Fraile, L. (2019). Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science*, 6(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
- Mórtola, E. C., Endo Y., Zuccolilli G. O., G. E. J. (1999). Feline immunodeficiency virus infection: interferon gamma secretion in a T-lymphoblastoid infected cell line. *Revista Argentina de Microbiología*, 31(3), 127–134. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10509391>
- Nauwynck, N., Hans Nauwynck (2007) 1 Pathogenesis of porcine circovirus 2 (PCV2)-infections and link with PCV2-associated diseases (Boehringer Ingelheim Animal Health GmbH), *Boehringer Ingelheim Satellite Symposium*, Germany, pp: 4-16
- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., ... Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(3), 385–392. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.385>
- O’Sullivan, T., Friendship, R., Blackwell, T., Pearl, D., McEwen, B., Carman, S., ... Dewey, C. (2011). Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(2), 106–111.
- Oliver-Ferrando, S., Segalés, J., Sibila, M., & Díaz, I. (2018). Comparison of cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells between piglets born from Porcine circovirus 2 vaccinated and non- vaccinated sows. *Veterinary Microbiology*, 214(August 2017), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.011>
- Olvera, A.; Cortey, M. and Segalés, J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*. 357: 175–185

- OMS (2003) Aprender a Vivir con el VIH/SIDA - Manual sobre Cuidados y Apoyo Nutricionales a los Enfermos de VIH/SIDA, Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Capítulo 4. NECESIDADES ESPECIALES DE CONSUMO DE ALIMENTOS DE LOS ENFERMOS DE VIH/SIDA. Consultado el 02/02/2020 <http://www.fao.org/3/y4168s/y4168s06.htm>
- Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L. G., & Halbur, P. G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, 12(02), 133–148. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000120>
- Opriessnig, Tanja & R Prickett, John & M Madson, Darin & Shen, Hui-Gang & M Juhan, Nicole & Pogranichniy, Roman & Meng, Xiang-Jin & Halbur, Patrick. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: Virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Veterinary research*. 41. 31. 10.1051/vetres/2010003.
- Pérez-Martín E., Rovira, A., Calsamiglia, M., Mankertz, A., Rodr, F., & Segal, J. (2007). A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *Journal of virological methods* 146, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.005>
- Pilon, C., Levast, B., Le, Y., Kerboeuf, D., Salmon, H., Velge-roussel, F., ... Baron, C. (2009). CD40 engagement strongly induces CD25 expression on porcine dendritic cells and polarizes the T cell immune response toward Th1. *Molecular immunology*, 46, 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.014>
- Qian Du, Xingchen Wu, Tongtong Wang, Xuefeng Yang, Zhenyu Wang, Y., & Niu, Xiaomin Zhao, Shan-Lu Liu, Dewen Tong, and Y. H. (2019). PCV2 suppresses IL-12p40 induction via Cap/gC1qR-mediated miRNAs and signalings. *Journal of Immunology*, 201(2), 533–547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800250>
- Qin, Y., Li, H., & Qiao, J. (2016). TLR2 / MyD88 / NF- k B signalling pathway regulates IL-8 production in porcine alveolar macrophages infected with porcine circovirus 2. *The Journal of general virology*, 445–452. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000345>
- Ramírez, E., Moreno, V., Díaz, N., Osorio, F., Ruiz, A., Neira, V. y Quezada, M. (2008). Evaluation of the pathogenicity and transmissibility of a chilean isolate of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55, 115-24.

Ramírez-Mendoza, H., Castillo-Juárez, H., Hernández, J., Correa, P., & Segalés, J. (2009). Retrospective serological survey of porcine circovirus-2 infection in Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 73(1), 21–24.

Robles, F. A., Chevez JA, Angulo RB, Díaz EB and González CA. Sciences, H. (2010). Analysis of the Genetic Sequences of PCV2 Virus in Mexico. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 4(5), 185–189.

Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., & Jestin, A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164(1–2), 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.002>

Santos, L., León-Galván, M. F., & Marino-Marmolejo, E. N. (2006). Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud Publica de Mexico*, 48(2), 155–165. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342006000200009>

Sato, K., & Fujita, S. (2007). Dendritic Cells-Nature and Classification. *Journal of the Japanese Society of Allergology* 56(December 2006), 183–191.

Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of Interferon-  $\gamma$  during Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in immunology* 96(07). [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96002-2)

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-  $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(February). <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252.Journal>

Segalés, J., Kekarainen, T., & Cortey, M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease. *Veterinary Microbiology*, 165(1–2), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.033>

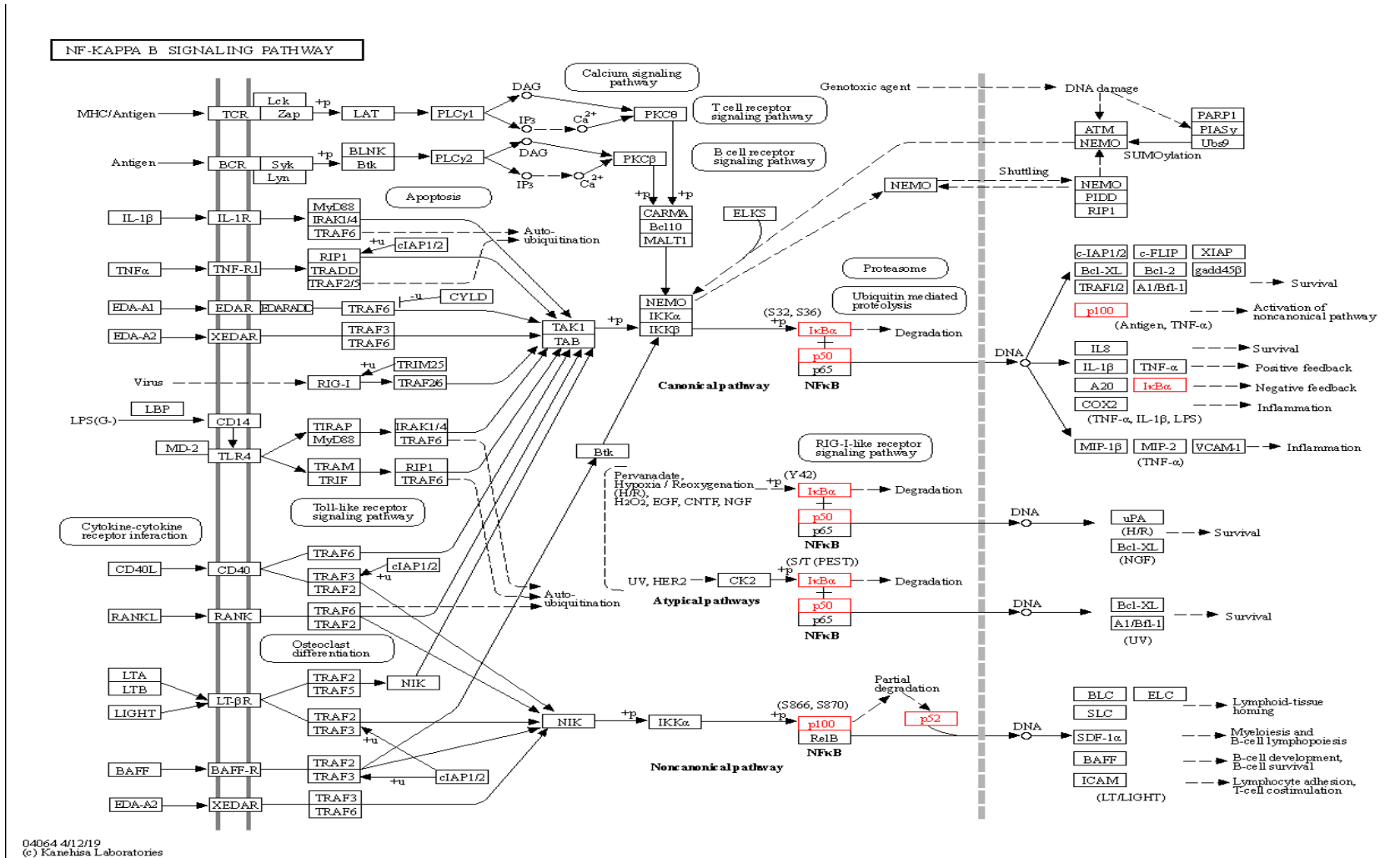
SENASICA, Diario Oficial de la Federación (DOF 29/11/2018) ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Artículo 8, grupo 3.

- Seo, H. W., Han, K., Oh, Y., Kang, I., Park, C., Joo, H. E., ... Chae, C. (2014). Evaluation of commercial polyclonal- and monoclonal-antibody-based immunohistochemical tests for 2 genotypes of Porcine circovirus type 2 and comparison with in-situ hybridization assays. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(3), 233–236.
- Shete A., P. Suryawanshi, S. Godbole, J. Pawar, R. P. & M. T. (2016). HIV-infected CD4+ T Cells Use T-bet-dependent Pathway for Production of IL-10 Upon Antigen Recognition. *Human Immunology*, 86(24), 288–296.  
<https://doi.org/10.1111/sji.12422>
- Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., & Young, H. A. (1997). Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the Interferon- $\gamma$  Promoter. *Journal of biological chemistry*, 272(48), 30412–30420.
- Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., & McCullough, K. (2009). Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *Springer Nature, BMC Veterinary Research*, 5, 1–13.  
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-45>
- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., & Poovorawan, Y. (2019). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology* (2003), 453–459.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.18698-0>
- Talker, S. C., Koinig, H. C., Stadler, M., Graage, R., Klingler, E., Ladinig, A., ... Gerner, W. (2015). Magnitude and kinetics of multifunctional CD4+ and CD8 $\beta$ + T cells in pigs infected with swine influenza A virus. *Veterinary Research*, 46(1), 1–16.  
<https://doi.org/10.1186/s13567-015-0182-3>
- Tomas A., Fernandes L. T., Sánchez A., S. J. (2010). Time course differential gene expression in response to porcine circovirus type 2 subclinical infection. *Veterinary Research*, 41(1): 12, 1–16. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009060>
- Tsai, Y. C., Jeng, C. R., Hsiao, S. H., Chang, H. W., Liu, J. J., Chang, C. C., ... Pang, V. F. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2) induces cell proliferation, fusion, and chemokine expression in swine monocytic cells *in vitro*. *Veterinary Research*, 41(5), 1–12. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010032>

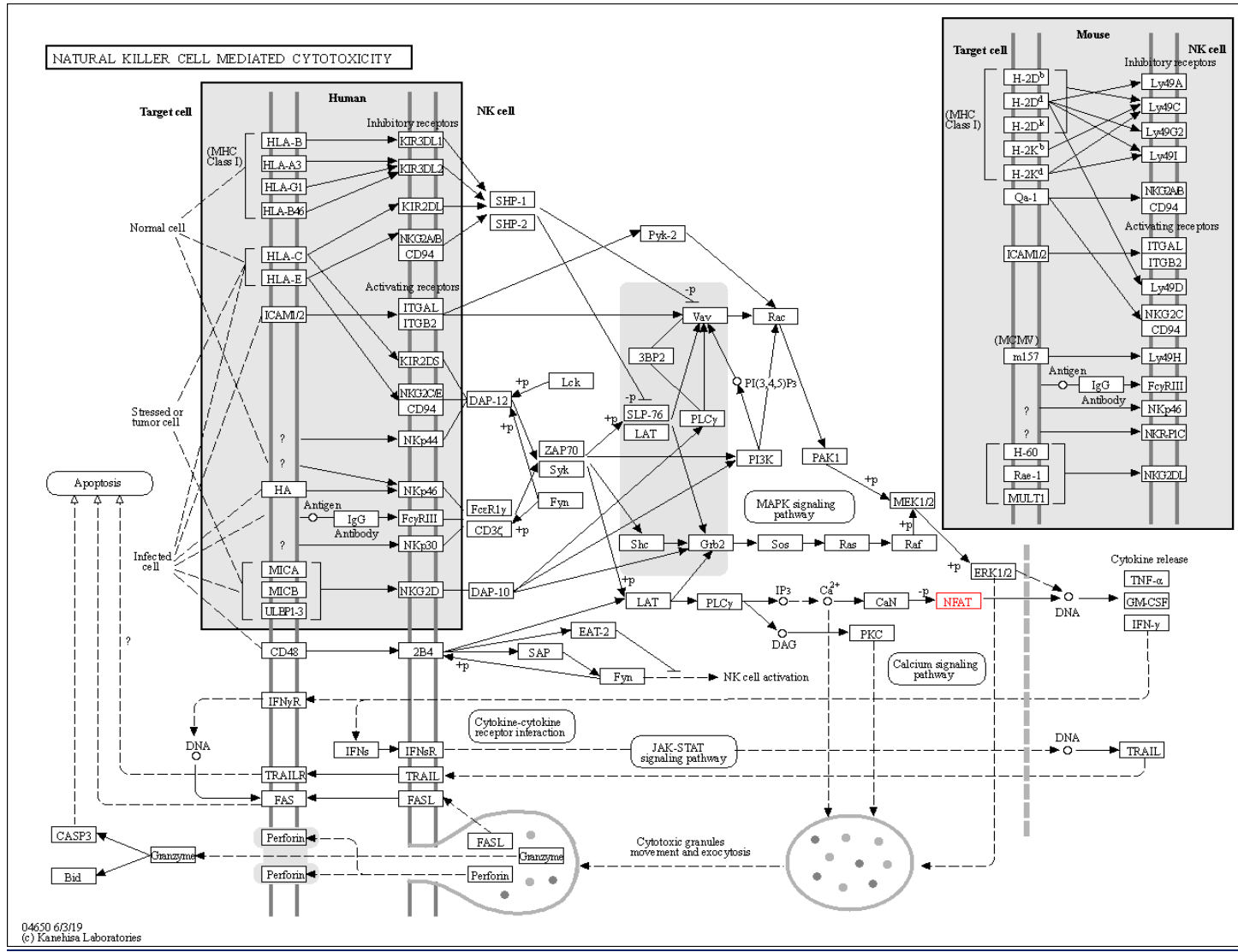
- Vincent, I. E., Meehan, B., Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2006). Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology*, 47–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02476.x>
- Wen, A. Y., Sakamoto, K. M., & Miller, L. S. (2014). The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*, 185 (11) 6413-6419. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001829>
- Xin Du, J. Z. (2018). Application of biosensors to detection of epidemic diseases in animals. *Research in Veterinary science*, 118, 444–448. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.04.011
- Yang, K., Jiao, Z., Zhou, D., Guo, R., Duan, Z., Yuan, F., & Tian, Y. (2018). Detection of porcine circoviruses in clinical specimens using multiplex PCR in Hubei, central China. *PeerJ Preprints*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27145>
- Yucatán, E. D. E., Cordero, L. G., León, M. T., Buenfil, J. C. R., Flores, R. C., Soberanis, R. M., & Parra, M. Q. (2011). Clinical incidence and frequency of lesions associated to porcine circovirus type 2 in pigs of a farm in the state of Yucatan, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 431–440. ISSN: 1870-0462.
- Jinfang, Zhu, J., Jankovic, D., Oler, A. J., Wei, G., Sharma, S., Hu, G., ... Paul, W. E. (2013). The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. *Immunity*, 37(4), 660–673. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.007>
- Zhu, Y., Lau, A., Lau, J., Jia, Q., Karuppanan, A. K., & Kwang, J. (2007). Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line. *Virology*, 369(2), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.08.014>

## 12.- Anexos

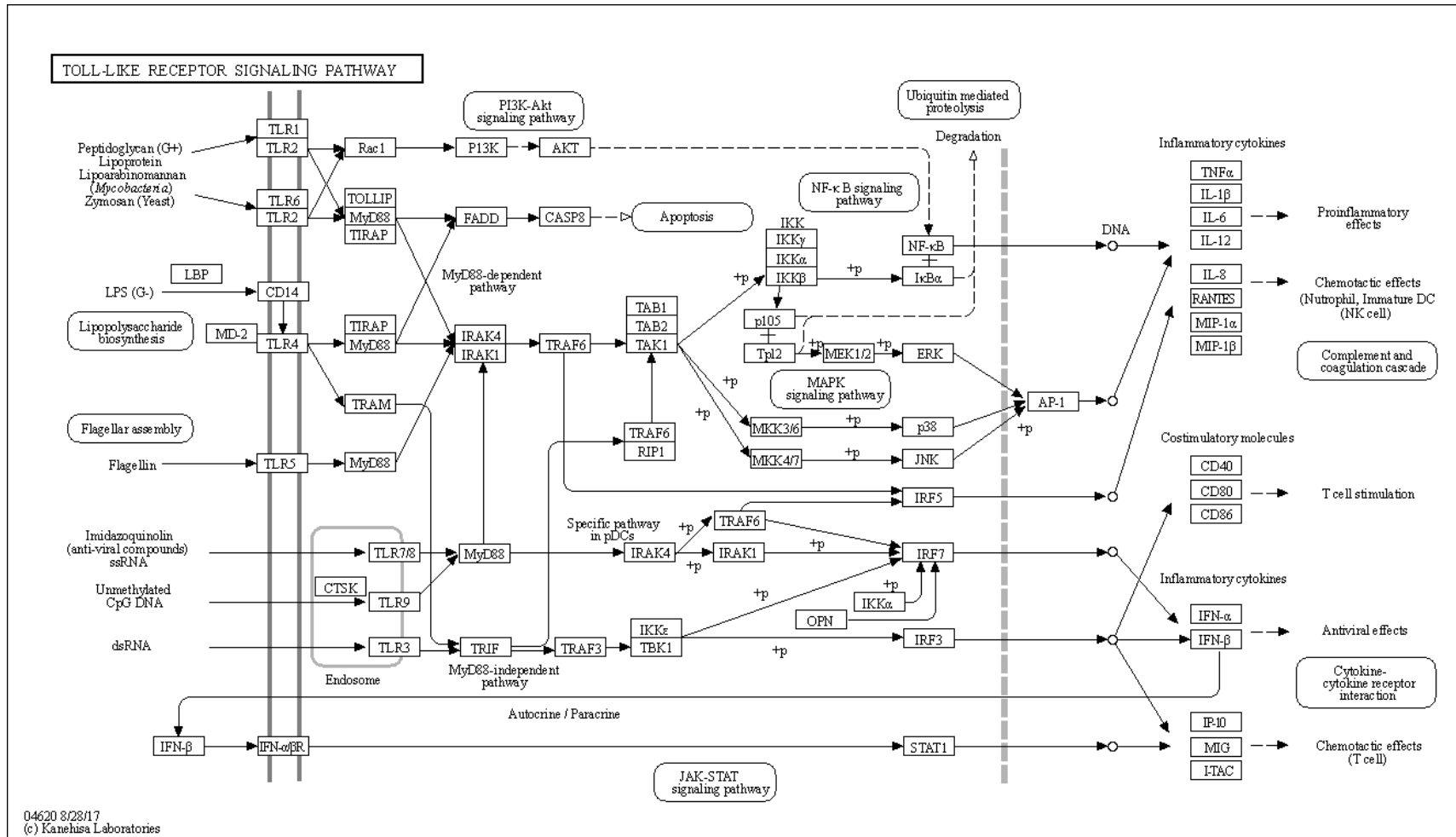
### ANEXO I.- Mapa de la vía de señalización NF-kappa B



## ANEXO II.-Mapa de la vía de señalización de la citotoxicidad de células NK

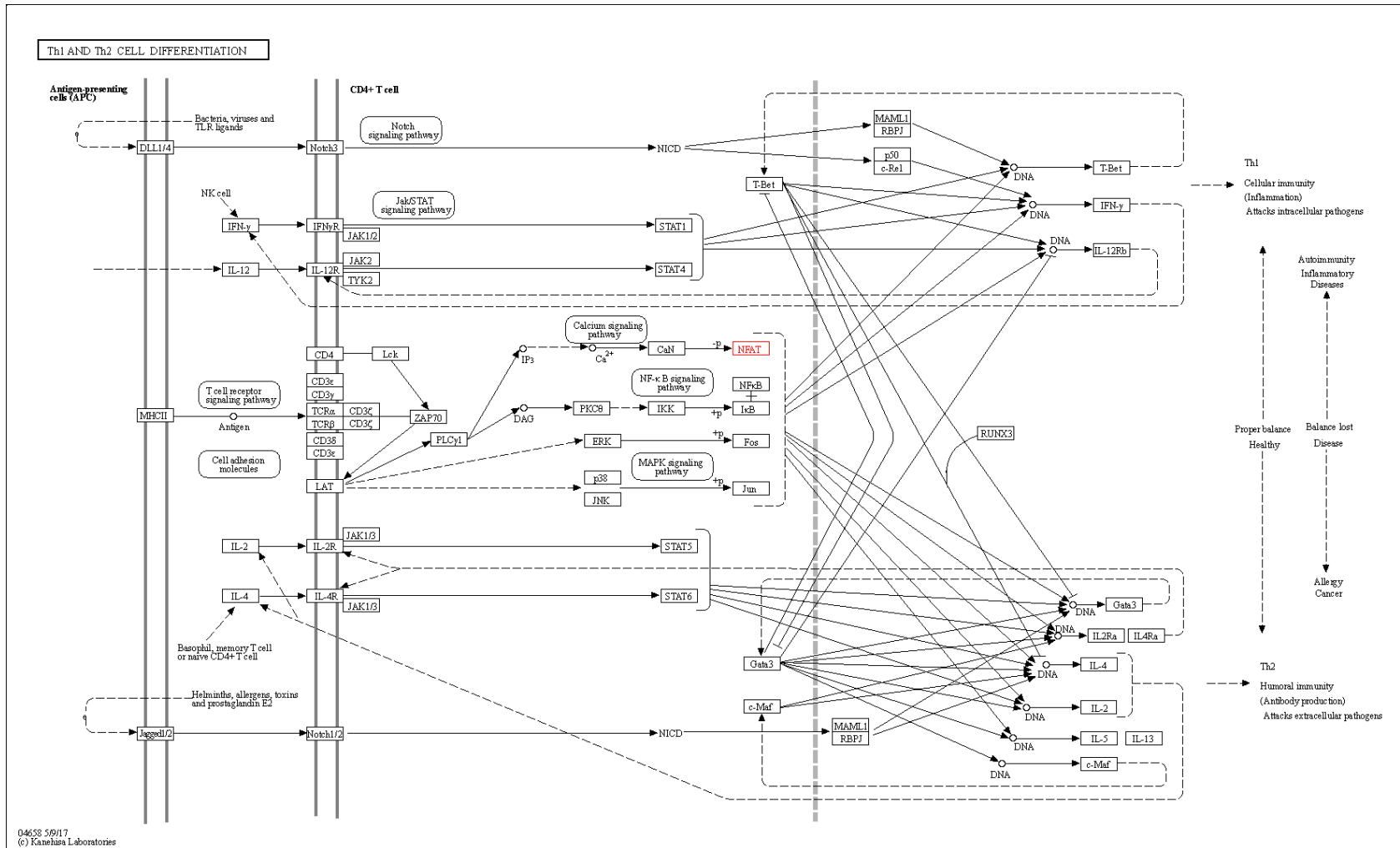


### ANEXO III.-Mapa de la vía de señalización de los receptores tipo TOLL-LIKE

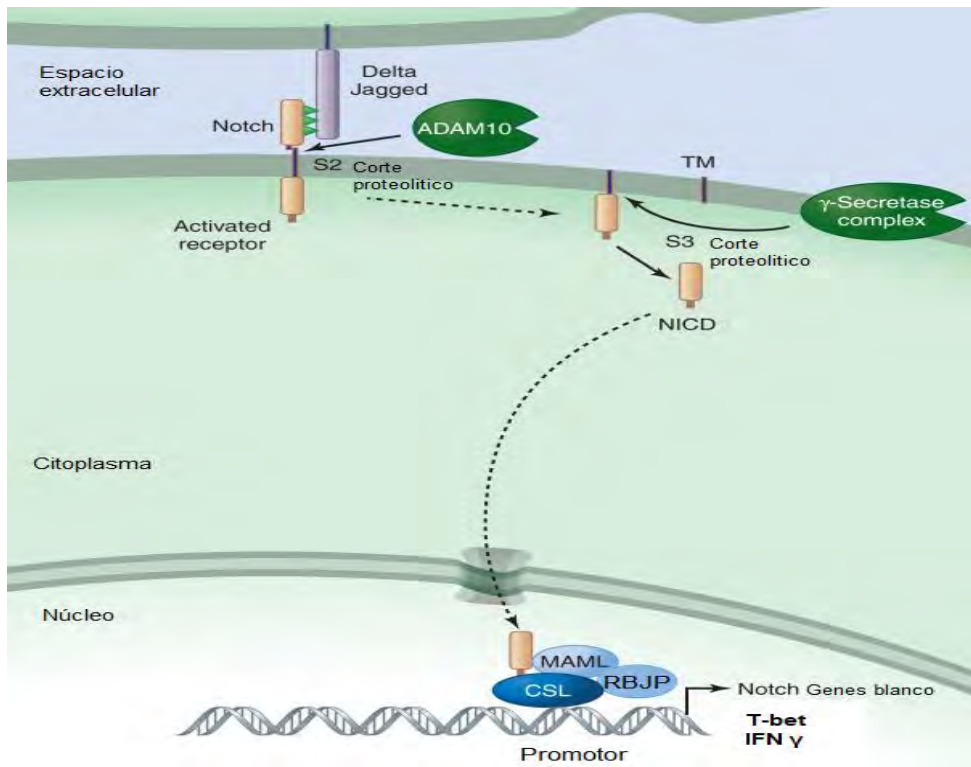




# ANEXO IV.-Mapa de la vía de señalización para la diferenciación de linfocitos Th1 y Th2



ANEXO V.-Vía de señalización NOTCH (vista simplificada). Modificado de Kopan, R. 2012.



ANEXO VI.-Encuesta aplicada a la granja control (PCV2-) y certificado de buenas prácticas pecuarias.

Datos de la granja

Nombre de la granja: \_\_\_\_\_

Ubicación: Dolores Hidalgo \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_ Fecha: 4/03/2019

¿Tiene algún certificado de salud y cuál?  
Si, Certificado de Buenas Prácticas Pecuarias en Granjas Porcícolas

¿Tiene algún comité de Bioética para el manejo y cuidado de los animales?  
No

¿Tiene algún certificado específico de ética animal?  
No

¿Qué pruebas hacen para garantizar que la granja está libre de PCV2 y PRRSV?  
PCR

¿Tiene sistema de vacunación y cuales vacunas se aplican?  
Si

Que punción se utilizara para la toma de muestra  
Yugular

Que raza son los cerdos, linaje, línea o especie y si tienen algún estatus de modificación genética  
Híbridos Large White con Pietrain

¿Qué salud tienen los animales y que estatus inmune tienen, vacunas o medicación?  
mejor buena salud, sanos, vacunados si

¿A qué hora del día fue la toma de muestra?  
1:00 - 2:30 Pm

¿Dónde fue la toma de muestra (corral, laboratorio)?  
corral

Qué tipo de granja es (crecimiento o reproducción) Reproducción

Nivel de tecnificación  Bajo  Medio  Alto tiene:  sistema de drenaje,  automatización del alimento,  
 automatización del agua, forma de limpieza del suelo: intensivos de escoba y mangera

¿Tiene medidas de bioseguridad el recinto? ¿Cuales?  
Si

Tipo de jaulas para los cerdos (pared, rejilla)  
Rejilla de piso elevado



# OMECEGA

ORGANIZACIÓN MEXICANA DE CERTIFICACIÓN  
GANADERA Y ALIMENTARIA, A. C.  
Clave de aprobación OC-120816-09-BPP-003  
Yácatas No.484 Col. Narvarte Poniente C. P. 03020 Del. Benito Juárez  
OMECEGA-003-PD-11-19-155  
Ciudad de México a 1 de febrero de 2019  
Certifica a la persona moral:

**Agroalimentos la Concepción, S.A. de C.V.**

Y a su Unidad de Producción:

**Granja El Dapo**

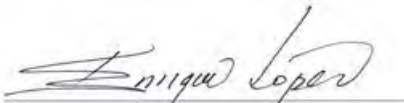
Por la Aplicación de Buenas Prácticas Pecuarias en  
Granjas Porcícolas

**Dolores Hidalgo, Guanajuato**

Dirección

Lat. N 21°18'23.91" Long.O 100°52'27.1"

Coordenadas

  
Ing. Enrique López López  
Director General

1 de febrero de 2020  
Vigencia



*"Con fundamento en los artículos 113, 115, 118 y 119 de la Ley Federal de Sanidad Animal, artículos 7 y 13 de su Reglamento y en cumplimiento de las disposiciones establecidas en el manual de "Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en la Producción de Granjas Porcícolas", se expide el presente certificado con clave OMECEGA-003-PD-11-19-155 para la persona moral denominada Agroalimentos la Concepción, S.A. de C.V., con domicilio fiscal en: Av. Padre Hidalgo No. 410-3, Santa Ana Pacueco, Mpio. Pénjamo, Guanajuato, C.P. 36910; conforme las facultades conferidas por el SENASICA para la certificación de las Buenas Prácticas Pecuarias mediante la aprobación No. OC-120816-09-BPP-003.*

*Asimismo, hago de su conocimiento que será sujeto de visitas de verificación e inspección oficial, con la finalidad de constatar el cumplimiento de las disposiciones aplicables en materia de Buenas Prácticas Pecuarias"*



ORGANIZACIÓN MEXICANA DE CERTIFICACIÓN  
GANADERA Y ALIMENTARIA, A.C.  
Yácatas No. 484 Colonia Narvarte Poniente  
Delegación Benito Juárez C.P. 03020 México, D.F.  
Tel: (5255) 5639 3076 Fax: 5639 3075  
www.omecega.org.mx

ANEXO VII.- Encuesta realizada a la granja infectada (PCV2+)

Datos de la granja

Nombre de la granja: \_\_\_\_\_

Ubicación: Alvaro Obregón \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

¿Tiene algún certificado de salud y cuál?  
No

¿Tiene algún certificado o norma para el manejo y cuidado de los animales?  
No

¿Tiene algún certificado específico de ética animal? (comité de bioética)  
No

¿Qué pruebas hacen para garantizar que la granja está libre de PCV2 y PRRSV?  
Ninguna

¿Tiene sistema de vacunación y cuales vacunas se aplican?  
No, sólo se aplica Bacterina mixta porcina (E.coli, P.multocida, S.tholozani)

Que punción se utilizará para la toma de muestra  
Punción en arteria Yagular

Que raza son los cerdos, linaje, línea o especie y si tienen algún estatus de modificación genética  
Hembras Landrace/York y machos Pietrain

¿Qué salud tienen los animales y que estatus inmune tienen, vacunas o medicación?  
Malas salud, estatus inmune enfermas, vacunación predesteteo y posterior sólo bacterina porcina, medicación Ketopolaro.

¿A qué hora del día fue la toma de muestra?  
9am - 12pm

¿Dónde fue la toma de muestra (corral, laboratorio)?  
corral

Que tipo de granja es (crecimiento o reproducción) crecimiento y reproducción

Nivel de tecnificación  Bajo  Medio  Alto, tiene:  sistema de drenaje,  automatización del alimento,  
 automatización del agua, forma de limpieza del suelo: a mano con pala y agua

¿Tiene medidas de bioseguridad el recinto? ¿Cuales?  
No

Tipo de jaulas para los cerdos (pared, rejilla)  
Pared para los cerdos en crecimiento y rejilla para los de predestete e inicio

ANEXO VII.- Resultado de los análisis enviados al laboratorio de un tercero para la identificación de microorganismos del CRP presentes en la granja experimental

FP-DMZC-MV-05-15 Rev 3



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE CERDOS

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO



Reporte de caso MZC: 20-006  
Fecha de ingreso: 14.01.2020  
Identificación:

Especie: Porcino  
Muestra: 12 sueros

Propietario: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Procedencia: Tarimbaro, Michoacan  
Clínico: Dra. Rosa Elvira Nuñez/ Fernando C. Rico

Lote: BIONOTE 4417PO010

Prueba de ELISA para Circovirus Porcino

Identificación	M/P	Interpretación
1 Sem 4	0.800947867	Positivo
2 Sem 4	1.196682464	Positivo
3 Sem 4	1.395734597	Positivo
4 Sem 4	1.63507109	Positivo
5 Sem 8	2.030805687	Positivo
6 Sem 8	2.450236967	Positivo
7 Sem 8	3.575829384	Positivo
8 Sem 8	1.55450237	Positivo
9 Sem 14	2.158767773	Positivo
10 Sem 14	4.213270142	Positivo
11 Sem 14	0.613744076	Positivo
12 Sem 14	3.447867299	Positivo

Muestras < 0.4 Negativas  
Muestras > 0.4 Positivas

ATENTAMENTE

MC. Rosalbá  
Responsable D

Vo.Bo.

MCV. Gerardo  
Jefe de D

Este resultado ampara solo las muestras analizadas y no podrá ser modificado sin autorización del Jefe de Departamento. Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento.



Av. Universidad 3000, Col. UNAM, C.U., Alcaldía Coyoacán, Cd. Mx., CP 04510.  
Tel.: 01 (55) 5622 5869 al 71.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Reporte de caso MZC: 20-006  
Fecha de ingreso: 14.01.2020  
Identificación:

Especie: Porcino  
Muestra: 12 sueros

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE CERDOS

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO

FP-DMZC-MV-05-15 Rev 3



Propietario: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Procedencia: Tarimbaro, Michoacan  
Clínico: Dra. Rosa Elvira Nuñez/ Fernando C. Rico

Lote: BIONOTE 4404PO077

Prueba de ELISA para PRRS

Identificación	M/P	Interpretación
1 Sem 4	0.294403893	Negativo
2 Sem 4	0.318734793	Negativo
3 Sem 4	1.316301703	Positivo
4 Sem 4	1.218978102	Positivo
5 Sem 8	2.250608273	Positivo
6 Sem 8	1.99756691	Positivo
7 Sem 8	0.571776156	Positivo
8 Sem 8	1.401459854	Positivo
9 Sem 14	1.895377129	Positivo
10 Sem 14	2.394160584	Positivo
11 Sem 14	2.479318735	Positivo
12 Sem 14	2.858880779	Positivo

Muestras < 0.4 Negativas  
Muestras > 0.4 Positivas

ATENTAMENTE

MC. Rosalba C  
Responsable

Vo.Bo.

MCV. Gerardo  
Jefe de Dep

Este resultado ampara solo las muestras analizadas y no podrá ser modificado sin autorización del Jefe de Departamento. Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento.



Av. Universidad 3000, Col. UNAM, C.U., Alcaldía Coyoacán, Cd. Mx., CP 04510.  
Tl.: 01 (55) 5622 5869 al 71.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE CERDOS

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO

FP-DMZC-MV-05-15 Rev 3



Reporte de caso MZC: 20-006  
Fecha de ingreso: 14.01.2020  
Identificación:

Propietario: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Procedencia: Tarimbaro, Michoacan  
Clínico: Dra. Rosa Elvira Nuñez/ Fernando C. Rico

Especie: Porcino  
Muestra: 12 sueros

Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación para la Enfermedad de Influenza Porcina

Identificación	Título H1N1	Título H3N2
1 Sem 4	1:80	1:10
2 Sem 4	1:80	1:10
3 Sem 4	1:80	1:10
4 Sem 4	1:320	1:10
5 Sem 8	1:160	1:10
6 Sem 8	1:160	1:10
7 Sem 8	1:320	1:20
8 Sem 8	1:80	1:10
9 Sem 14	1:160	1:20
10 Sem 14	1:160	1:10
11 Sem 14	1:80	1:10
12 Sem 14	1:80	1:10

La muestra se considera positiva a partir de un título de 1:80

ATENTAMENTE

Vo.Bo.

MC. Rosalba G  
Responsable Dia

MCV. Gerardo  
Jefe de D

Este resultado ampara solo las muestras analizadas y no podrá ser modificado sin autorización del Jefe de Departamento. Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento.



Av. Universidad 3000, Col. UNAM, C.U., Alcaldía Coyoacán, Cd. Mx., CP 04510.  
Tel.: 01 (55) 5622 5869 al 71.





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE CERDOS

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO



Reporte de caso MZC: 20-006  
Fecha de ingreso: 14.01.2020  
Identificación:

Propietario: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Procedencia: Tarimbaro, Michoacán  
Clínico: Dra. Rosa Elvira Nuñez/ Fernando C. Rico

Especie: Porcino  
Muestra: 12 sueros

Lote: CIVTEST SUIS MHYO CMH.6W02

Prueba de ELISA para *Mycoplasma hyopneumoniae*

IRPC	Interpretación	Identificación
15.5720339	Negativo	1 Sem 4
17.16101695	Negativo	2 Sem 4
20.12711864	Negativo	3 Sem 4
40.25423729	Positivo	4 Sem 4
132.309322	Positivo	5 Sem 8
128.6016949	Positivo	6 Sem 8
78.1779661	Positivo	7 Sem 8
47.88135593	Positivo	8 Sem 8
65.14830508	Positivo	9 Sem 14
58.36864407	Positivo	10 Sem 14
44.06779661	Positivo	11 Sem 14
65.25423729	Positivo	12 Sem 14

Muestras < 30 Negativas  
Muestras entre 30 -35 Sospechosas  
Muestras > 35 Positivas

ATENTAMENTE

Vo.Bo.

MC. Rosalba  
Responsable

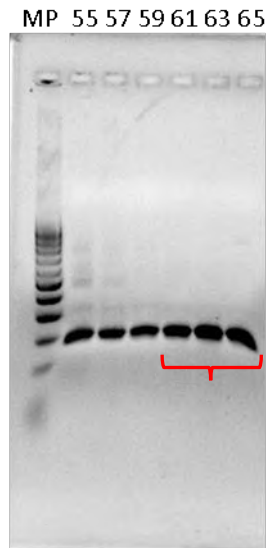
MCV. Gerardo  
Jefe de Dep

Este resultado ampara solo las muestras analizadas y no podrá ser modificado sin autorización del Jefe de Departamento.  
Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento.



Av. Universidad 3000, Col. UNAM, C.U., Alcaldía Coyoacán, Cd. Mx., CP 04510.  
Tel.: 01 (55) 5622 5869 al 71.

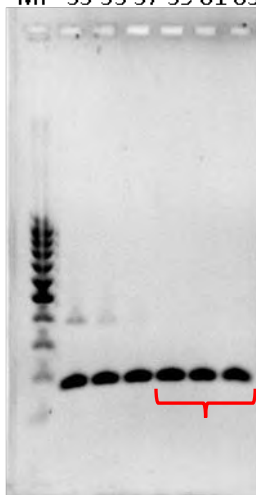
ANEXO VIII.- Gradiente de temperatura para conocer la temperatura optima de hibridación de GAPDH



Las temperaturas óptimas se observaron entre 61, 63 y 65 grados centígrados marcados en corchete de color rojo, MP marcador de peso molecular 1Kb, mix de cDNA.

ANEXO IX.- Gradiente de temperatura para conocer la temperatura optima de hibridación de IFN $\gamma$

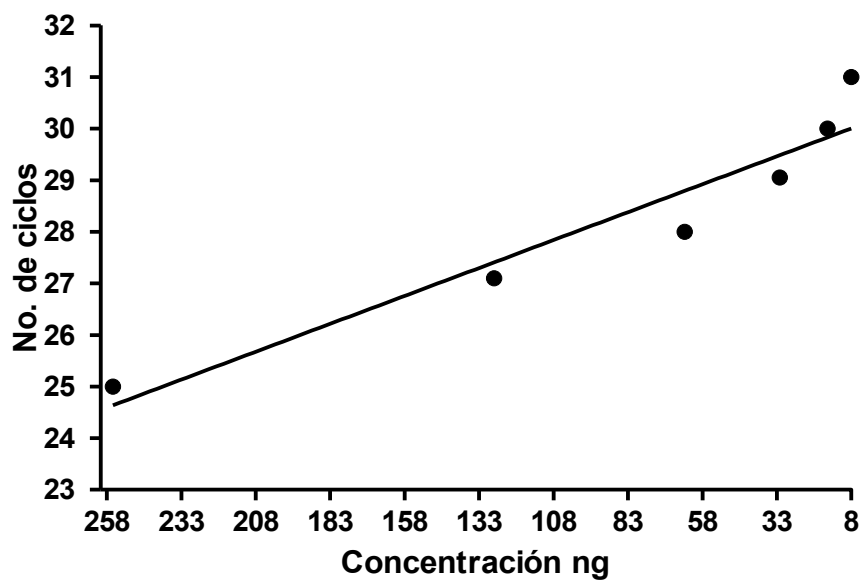
MP 53 55 57 59 61 63



Las temperaturas óptimas se observaron a 59, 61 y 63 grados centígrados, MP marcador de peso molecular 1KB, mix de cDNA.

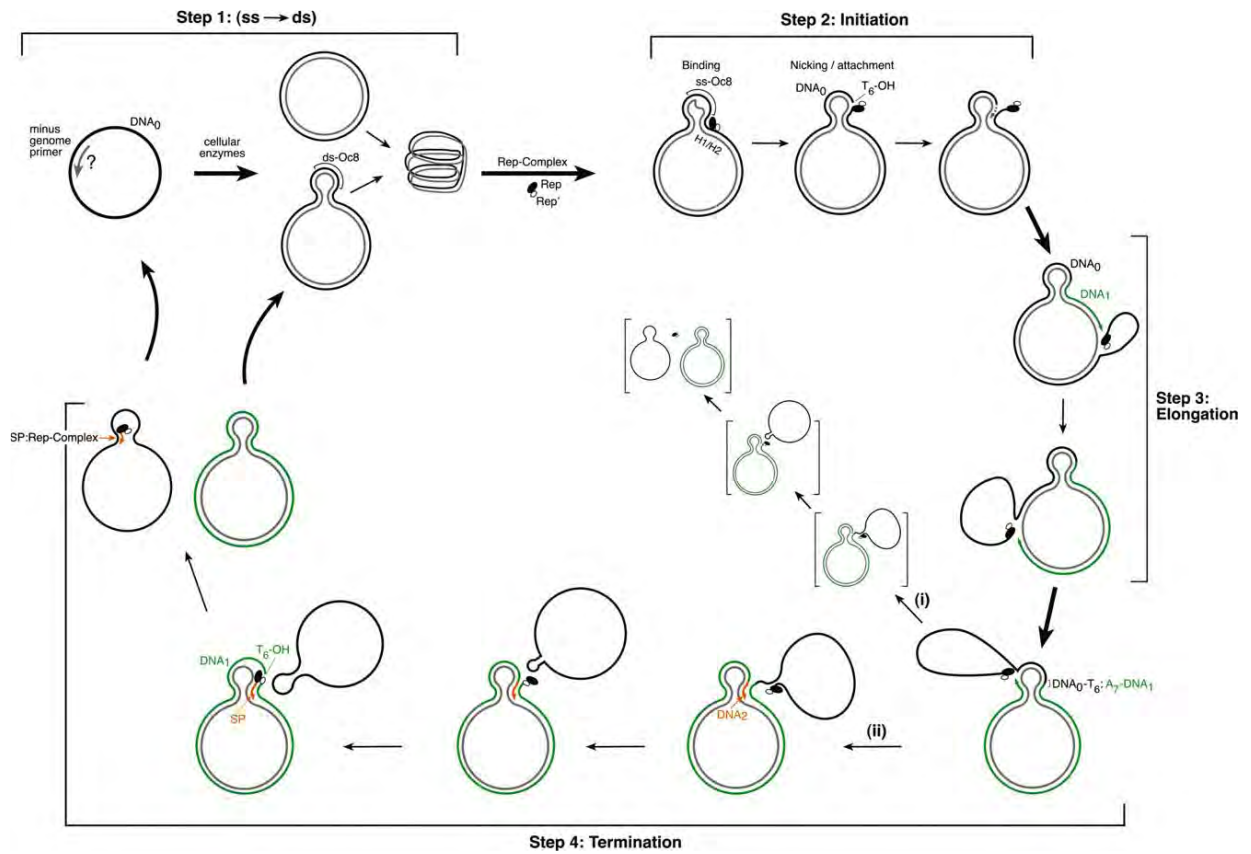
ANEXO X.- Curva de concentración de GAPDH de mix de cDNA de los dos grupos PCV2+ y PCV2- para conocer la concentración optime de amplificación.

### Curva de concentración de GAPDH



Relación de concentraciones de cDNA y su ciclo de amplificación obtenidos con el programa Graph Pad Prisma V.5, Análisis de regresión lineal  $r^2=0.91$ .

## ANEXO XI.- Modelo de replicación de PCV2



Recuperado de Cheung K. A. 2011.