



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

**Desarrollo y evaluación de un prototipo de vacuna contra Circovirus
Porcino tipo 2 (PCV2) utilizando *Pichia pastoris***

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

AURA MILENA VILLAMIL PÉREZ
CHILLÁN - CHILE

Profesor guía: Dr. Álvaro Ruíz Garrido
Dpto. de Patología y Medicina Preventiva
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Patología y Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor guía

Dr. Álvaro Rafael Ruiz Garrido
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Profesor co-guía

Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora



Dr. Carlos Alonso Escudero Orozco
Facultad de Ciencias
Universidad del Bío Bío

Dr. Pedro Enrique Ábalos Pineda
Facultad de Cs. Vet. y Pecuarias
Universidad de Chile

Director de Programa

Dr. Fidel Ovidio Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción



A mi Fofó

A mi Juanjo

*Y especialmnete a mi Chino Nindo,
por todo el tiempo que no pude estar, pero que finalmente dió sus frutos.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, tanto los de lejos como los de cerca, porque siempre me impulsaron a continuar, por su apoyo y ayuda para facilitarme el tiempo de poder dedicarme al doctorado.

Agradezco al Dr. Fidel Castro por considerarme para ser parte de los inicios de este programa y por no perder la esperanza en mí a pesar del paso de los años.

A mi tutor, Dr. Álvaro Ruíz, por su guía, exigencia y dedicación para apoyarme en el desarrollo de esta investigación; por brindarme las facilidades para combinar el estudio con el trabajo, por sus siempre oportunas palabras de apoyo para instarme a seguir, incluso cuando estuve a punto de dar un paso al costado; pero sobretodo, un enorme agradecimiento por su eterna paciencia y voto de confianza.

A mi co-tutor, Dr. Jorge Toledo, por sus consejos y supervisión al trabajo realizado, por integrarme a su agradable grupo de trabajo y su patrocinio a través del proyecto asociado.

A la comisión evaluadora externa, Dr. Pedro Ábalos y Dr. Carlos Escudero, porque sus comentarios y correcciones fueron un gran aporte constructivo para la edición del documento final.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Emilio Lamazarez por su simpatía y generosidad en cuanto al conocimiento brindado, a Eddy González, Frank Camacho, Omar Farnós, Raquel Montesino, Joel Cabezas, por su amabilidad y constante ánimo.

A mis amigas Araceli Rivas, Cecilia Contreras y Alejandra Velásquez, por sus palabras de aliento y ayuda incondicional, por esos pequeños detalles que permitieron que el camino fuera menos engorroso.

A Don Carlos Morales y Don Carlos Cortéz, además de un especial agradecimiento al Dr. Manuel Quezada, quienes desinteresadamente estuvieron siempre dispuestos a ayudarme en los procedimientos con los cerdos y las necropsias, sin importar clima ni horario.

A Clara Castro, por su siempre buena disposición para solucionar cada detalle en estos largos años.

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma hicieron posible que, finalmente, culminara esta etapa académica: Gracias, porque cada granito de arena fue enormemente valioso.



TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiii
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xx
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVO GENERAL	2
CAPÍTULO I	
1. Revisión bibliográfica	3
1.1 Introducción	4
1.2 Industria porcina	7
1.3 Síndrome multisistémico postdestete (PMWS)	8
1.4 Etiología PCV2	12
1.5 Epidemiología	17
1.6 Transmisión	19
1.7 Patogenia y lesiones	21
1.8 Respuesta Inmune	26
1.9 Diagnóstico	30
1.10 Prevención y control	34



1.10.1 Vacunación	37
1.10.1.1 Vacunas recombinantes	41
1.10.1.2 Vacunas a partir de levaduras	43
1.10.1.3 <i>Pichia pastoris</i>	44
1.11 Impacto económico	47
1.12 Referencias bibliográficas	49

CAPITULO II

2. Preparación de un prototipo vacunal, a partir de la expresión un dominio antigénico de <i>Circovirus</i> porcino tipo 2 en clones de <i>Pichia pastoris</i>	70
2.1 Introducción	71
2.2 Objetivos específicos	74
2.3 Antecedentes técnicos	74
2.4 Materiales y métodos	75
2.4.1 Diseño experimental	75
2.4.2 Transformación	77
2.4.3 Cultivo discontinuo	81
2.4.4 Fermentación	82
2.4.5 Obtención de proteínas	84
2.4.6 Cuantificación de las proteínas	85
2.4.7 Preparación de las emulsiones	86

2.5 Resultados y Discusión	86
2.5.1 Obtención y evaluación de los clones	86
2.5.2 Fermentación	92
2.5.3 Preparación de las emulsiones	99
2.6 Conclusiones	101
2.7 Referencias bibliográficas	102

CAPITULO III

3. Evaluación de la efectividad de la formulación vacunal	105
3.1 Introducción	106
3.2 Objetivo específico	107
3.3 Materiales y métodos	107
3.3.1 Diseño experimental	108
3.3.2 Inmunización y toma de muestras	111
3.3.3 Cuantificación de carga viral	114
3.3.4 Medición de títulos de anticuerpos	115
3.3.5 Eutanasia	116
3.3.6 Análisis estadístico	117
3.4 Resultados y Discusión	117
3.4.1 Condición físico-clínica de los animales	117
3.4.2 Temperatura corporal	118
3.4.3 Ganancia de peso	123

3.4.4 Carga viral	127
3.4.5 Título de anticuerpos	131
3.4.6 Histopatología	136
3.5 Conclusiones	138
3.6 Referencias bibliográficas	139

CAPITULO IV

4. Evaluación de seguridad y potencia	143
4.1 Introducción	144
4.2 Objetivos específicos	146
4.3. Materiales y métodos	147
4.3.1 Diseño experimental	148
4.3.2 Análisis microbiológico	151
4.3.3 Inmunización y toma de muestras	151
4.3.4 Cuantificación de carga viral	154
4.3.5 Medición de títulos de anticuerpos	155
4.3.6 Eutanasia	156
4.3.7 Linfoproliferación	157
4.3.8 Análisis estadístico	158
4.4 Resultados y Discusión	158
4.4.1 Análisis microbiológico	159
4.4.2 Condición físico-clínica de los animales	161

4.4.3	Temperatura corporal	163
4.4.4	Ganancia de peso	166
4.4.5	Carga viral	170
4.4.6	Histopatología	172
4.4.7	Título de anticuerpos	173
4.4.8	Linfoproliferación	177
4.5	Conclusiones	181
4.6	Referencias bibliográficas	182
	DISCUSIÓN GENERAL	187
	CONCLUSIÓN GENERAL	193
	ANEXOS	194



INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.1	Principios de Madec para los planes de manejo especiales. Tomada de Madec (2008).	36
------------------	---	----



INDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 2.1	Descripción del diseño experimental, indicando los grupos con sus respectivos tratamientos y el número de clones en cada uno de ellos (n=80).	76
Figura 2.2	Representación esquemática de los vectores utilizados para la transformación y expresión conjunta de proteínas.	78
Figura 2.3	<i>Dot blot</i> realizado a los clones de cada uno de los grupos.	87
Figura 2.4	<i>Southern blot</i> de diferentes clones de levaduras transformados con los vectores.	89
Figura 2.5	<i>Western blot</i> de la quimera seleccionada (Q1).	92
Figura 2.6	Fermentador utilizado para el escalamiento en la producción de las proteínas (Q1, Cap e INF α).	94
Figura 2.7	Curva de crecimiento en le fermentador, registrada en peso húmedo (g/L) en el fermentador, para cada periodo de tiempo registrado.	99
Figura 3.1	Descripción del diseño experimental, indicando los grupos con sus respectivos tratamientos y el número de	109

animales en cada uno de ellos (n = 34).

Figura 3.2	Diseño cronológico del manejo de los animales, señalando los días del ensayo en el cual se realiza cada uno de los procedimientos: día 0 (vacunación), día 21 (booster), día 35 (desafío) y día 52 (eutanasia).	110
Figura 3.3	Valor promedio de las variaciones de temperatura (°C), obtenidas desde el momento de la vacunación (día 0) hasta el día 25 clasificadas por grupo experimental.	119
Figura 3.4	Valor promedio de las temperaturas (°C), obtenidas desde el momento de la vacunación (día 0) hasta el día 25 clasificadas por grupo experimental.	122
Figura 3.5	Valor promedio de las mediciones de peso en cada uno de los grupos desde día 0 hasta el día 52 del ensayo.	123
Figura 3.6	Valor promedio de ganancia de peso en cada uno de los grupos a los días 21 y 52 del ensayo, clasificados por grupo experimental.	125
Figura 3.7	Valores promedio de carga viral (No.copias/mL) de cada grupo a los días 0 (primovacunación), 21 (<i>booster</i>) 41 (7 días post desafío) y 52 (fin del ensayo).	128
Figura 3.8	Valores S/P promedio de las muestras de sangre analizadas por Elisa en las diferentes etapas del ensayo (día 0, día 21, 41 y 52) clasificadas por grupo	132

experimental.

- Figura 4.1** Descripción del diseño experimental, indicando los grupos con sus respectivos tratamientos y el número de animales para cada uno de ellos (n=40). 149
- Figura 4.2** Diseño cronológico del manejo de los animales, señalando los días entre cada uno de los procedimientos: día 0 (vacunación), día 21 (booster) y día 41 (necropsia). 150
- Figura 4.3** Valor promedio de las variaciones de temperatura (°C), obtenidas desde el momento de la vacunación (día 0) hasta el final del ensayo (día 41) clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). 164
- Figura 4.4.** Valor promedio de las mediciones de peso desde día 0 hasta el día 41 del ensayo clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). 167
- Figura 4.5** Valor promedio de ganancia de peso desde el día 0 hasta el día 41 del ensayo, clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control 168

negativo).

- Figura 4.6** Valores promedio de carga viral (No.copias/mL) de cada grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo) a los días 0 (primovacunación), 21 (*booster*) y 41 (fin del ensayo). 170
- Figura 4.7** Valores S/P promedio de las muestras de sangre analizadas mediante ELISA indirecta (Biocheck), en las diferentes etapas del ensayo (día 0, día 21 y día 41), clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). 174
- Figura 4.8** Valor de las medias del número de células a partir de las muestras de sangre en las diferentes etapas del ensayo (día 0, día 21 y día 41), clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). 177

RESUMEN

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) representa una preocupación crucial dentro de la industria porcina a nivel mundial y en Chile, específicamente, los sistemas intensivos de producción de cerdos se han visto obligados a ir a la vanguardia en la implementación de programas de vacunación que permitan mantener controlada la enfermedad. Sin embargo, así como las enfermedades asociadas a este patógeno generan pérdidas económicas importantes, las vacunas también conllevan costos elevados dentro de los planteles, por lo que en los últimos años, el desarrollo de vacunas recombinantes ha tomado fuerza, tendiendo en cuenta que se pueden utilizar microorganismos para la obtención de proteínas específicas. Es el caso de la levadura *Pichia pastoris* que, debido a sus ventajas productivas, se ha convertido en una herramienta llamativa para la producción eficaz de proteínas recombinantes. El objetivo de esta investigación consistió en generar una formulación vacunal que estimulara en los cerdos, bajo condiciones controladas, la respuesta celular y humoral contra PCV2.

Inicialmente, se evaluó la producción de las proteínas expresadas en la levadura *P.pastoris* MP36 analizando clones transformados y a partir de ellos, se obtuvieron dos proteínas: por una parte y en el interior de la célula, la proteína de una quimera de la cápside de PCV2, ya que es considerada como

dominante para la inmunogenicidad del virus en el animal; y por otra, el interferón alfa porcino (IFN α) en el medio extracelular, debido a su característica actividad antiviral y efecto inmunopotenciador. A partir de dichas proteínas, se preparó la formulación vacunal utilizando el adyuvante comercial Montanide 15AVG.

Posteriormente, se realizaron ensayos con cerdos provenientes de un plantel comercial chileno, para evaluar la efectividad del uso del IFN α en la preparación vacunal. Estos animales fueron trasladados a instalaciones de la Universidad de Concepción, campus Chillán, teniendo cuidado de no afectar su bienestar y normal desarrollo. Se llevaron a cabo las inmunizaciones para comparar la dosis de la formulación vacunal con respecto a su seguridad en cerdos y además, para determinar su potencia. Adicionalmente, se realizó un desafío con la finalidad de poner a los animales en contacto con el virus, replicar la enfermedad y comparar a los animales infectados clínicamente con los animales protegidos.

La formulación vacunal desarrollada, utilizando la quimera de la cápside (sin el IFN α), indujo en los cerdos una respuesta inmune contra PCV2, elevando los valores S/P y disminuyendo la carga viral; no obstante, la seroconversión no se dio de manera clara.

Palabras clave: Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), vacunas recombinantes, *Pichia pastoris*, cápside, interferón alfa (IFN α).



ABSTRACT

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) represents a crucial concern within the worldwide pig industry and specifically, Chilean intensive pig production systems have been forced to take the lead implementing vaccination programs that allow them to keep PCV2 associated diseases under control. However, the significant economic losses come from the associated diseases themselves and vaccines as well due to its high costs. In recent years, the development of recombinant vaccines has gained strength, taking into account that they can use microorganisms to obtain specific proteins. It is the case of the yeast *Pichia pastoris* that, due to its productive advantages, has become a striking tool for the efficient production of recombinant proteins. The objective of this research was to generate a vaccine formulation that stimulates the cellular and humoral response against PCV2 in pigs under controlled conditions.

Initially, the production of the proteins expressed in *P.pastoris* MP36 yeast was evaluated by analyzing transformed clones where two proteins were obtained: one and from inside the cell, the protein of a chimera of the capsid of PCV2, since it is considered as dominant for the immunogenicity of the virus in the animal; and on the other hand, the porcine interferon alfa (IFN α) from the extracellular medium, due to its characteristic antiviral activity and immunopotentiating effect. Using these two proteins, vaccine formulation was

prepared using the commercial adjuvant Montanide 15AVG. Subsequently, tests were carried out with pigs from a Chilean commercial farm to evaluate the effectiveness of using the IFN α in vaccine preparation. These animals were transferred to facilities of the Universidad de Concepción, Chillán campus, being careful not to affect their well-being and normal development. Immunizations were carried out to compare the dose of the formulation with respect to its safety in pigs and also to determine its potency. Additionally, a challenge was made in order to put the animals in contact with the virus, replicate the disease and compare the clinically infected animals with those protected animals.

The vaccine formulation developed, using the capsid chimera (without IFN α), induced an immune response against PCV2 in pigs, raising S/P values and decreasing the viral load; however, seroconversion did not occur clearly.

Keywords: Porcine circovirus type 2 (PCV2), recombinant vaccines, *Pichia pastoris*, capsid, interferon alfa (IFN α).

INTRODUCCIÓN

La infección generalizada con Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) causa grandes pérdidas en la producción porcina a nivel mundial. Actualmente, las estrategias de vacunación contra PCV2 se limitan a generar inmunógenos basados en virus atenuados o subunidades virales para inducir una respuesta detectable de anticuerpos, que si bien atenúan los efectos de la enfermedad clínica, no garantizan el control de la infección viral subclínica; además, no se dispone de vacunas combinadas con inmunógenos que activen una potente respuesta inmune del animal, lo cual permitiría, controlar y eliminar paulatinamente la infección con PCV2. Se hace necesaria, entonces, la generación de nuevas vacunas que garanticen una mayor eficacia y protección contra PCV2 y que sean más económicas y eficientes. Teniendo en cuenta que los programas de vacunación representan hasta un 50% de los costos de medicación asociados a la producción porcina, el desafío se centra en la obtención de proteínas a bajo costo, que puedan ser usadas en la producción de nuevas vacunas contra PCV2, y logren permitir así una disminución en el impacto económico dentro de los planteles de producción.

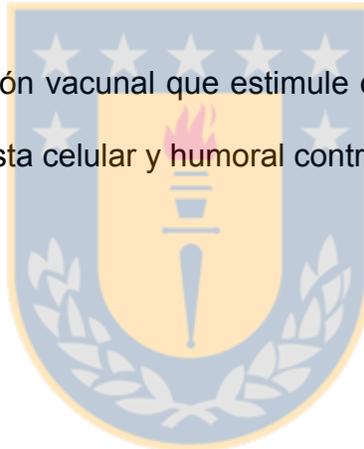
Con esta base, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS

Una formulación vacunal contra PCV2, donde se combinan dominios antigénicos de la cápside junto con el interferón alfa ($INF\alpha$) porcino, induce en los cerdos una respuesta inmune eficiente contra el virus.

OBJETIVO GENERAL

Generar una formulación vacunal que estimule en los cerdos, bajo condiciones controladas, la respuesta celular y humoral contra Circovirus Porcino tipo 2.



CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1.1 Introducción

La carne de cerdo ocupa un lugar importante dentro de la dieta humana, como fuente de proteínas, vitaminas del complejo B y otros nutrientes (Asprocer, 2019). Su preferencia ha evidenciado cambios en los patrones de consumo de la población, especialmente en países en vías de desarrollo que mantienen economías de rápido crecimiento, como es el caso de Chile, en donde su alta demanda ha favorecido el sector de la industria porcina (INE, 2019).

En los sistemas de producción porcina existentes, se evidencia una dualidad: por una parte, están los sistemas tradicionales de subsistencia a pequeña escala; y por otra, los sistemas industriales especializados conocidos como sistemas intensivos, que son los que precisamente, predominan en el país. En las últimas décadas, una serie de importantes mejoras en la crianza de cerdos ha transformado la producción porcina comercial en una industria de alto nivel y elevado rendimiento, aprovechando plenamente el potencial de las líneas genéticas utilizadas, para proporcionar así un ambiente estandarizado a sus animales. En Chile, el sistema productivo se maneja de forma intensiva en granjas multi-sitio, caracterizadas por emplear líneas genéticas mejoradas, que se adecuan continuamente a las tendencias de consumo, con la finalidad de entregar productos con una calidad homogénea, bajos índices de colesterol y gran porcentaje de carne magra. Este sistema requiere un manejo sanitario y

de bioseguridad muy eficiente y con personal altamente calificado, para garantizar así que los productos porcinos, comercializados en el mercado interno y de exportación, sean manejados bajo estrictos sistemas de calidad (Asprocer, 2019).

Estos altos estándares de calidad en la producción porcina deben darse siempre en paralelo con mejoras en la salud animal, ya que a pesar de los importantes resultados alcanzados en control y prevención, el sector porcino sigue estando amenazado por diferentes patógenos. Buena parte de las iniciativas en sanidad se han concentrado en minimizar el impacto de enfermedades virales, bacterianas o parasitarias; sin embargo, este esfuerzo necesitará redoblar en el futuro ya que el impacto que se genera incluye, además, efectos en la salud y bienestar de los consumidores.

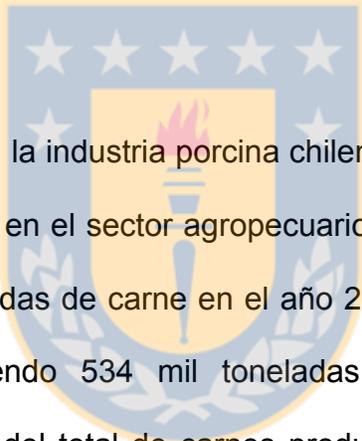
Algunas enfermedades presentes en los planteles de producción porcina son bastante costosas y, en algunos casos, difíciles de controlar eficientemente. Dentro de estas, el síndrome multisistémico postdestete (PMWS), producido por la infección con Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), se caracteriza por generar una disminución relevante en los niveles de producción, implicando enormes pérdidas económicas, ya que los animales afectados presentan una supresión importante de su sistema inmune, quedando susceptibles a contraer infecciones secundarias a la infección viral. El PCV2 se ha descrito en Chile desde hace un

par de décadas y se mantiene persistente en la población porcina como una infección subclínica asintomática (Segalés, 2012), en donde factores como el hacinamiento en sistemas intensivos y condiciones de estrés, gatillan la aparición del síndrome y el desarrollo de la enfermedad clínica. Por lo tanto, actualmente se manejan programas preventivos de vacunación para evitar la rápida propagación del virus y combatir así la infección clínica.

Actualmente, hay cuatro vacunas disponibles a nivel comercial, que si bien han sido efectivas en la disminución de las tasas de mortalidad y mejoramiento del crecimiento animal, llegan a ser bastante costosas, rodeando los US\$1.65 por dosis. Por lo tanto, en este trabajo se plantea la posibilidad de generar una vacuna contra PCV2 que mantenga bajos sus costos de producción, como una alternativa más económica que permita una penetración favorable en el mercado. Esta revisión bibliográfica inicial pretende contextualizar respecto al PCV2 y su importancia en los sistemas de producción porcina intensiva, presentando así un estado del arte sobre el uso de las vacunas para su prevención y control. Sobre esta materia, cabe resaltar que el desarrollo de vacunas se ha visto altamente favorecido con los avances científicos alcanzados en el área de microbiología e ingeniería genética, en donde los procesos biotecnológicos han permitido elevar notablemente su especificidad y productividad, logrando aplicaciones como la síntesis de una gran cantidad de productos como por ejemplo, las proteínas recombinantes. Esta investigación

busca estandarizar un sistema de expresión génica, utilizando la levadura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), a partir de una quimera de la proteína de la cápside de PCV2, para generar un prototipo de vacuna, que se evaluó en animales provenientes de un plantel comercial de producción intensiva, y demostrar así su seguridad, potencia y eficacia.

1.2 Industria porcina



En los últimos 30 años, la industria porcina chilena ha sido una de las industrias con mayor crecimiento en el sector agropecuario (Asprocer, 2019), pasando de producir 260 mil toneladas de carne en el año 2000 a duplicar dicha cifra en el año 2010 y produciendo 534 mil toneladas vara durante el año 2018, representando el 35% del total de carnes producidas a nivel nacional, con un consumo interno *per cápita* cercano a 16,6 kg (Asprocer, 2019).

Aunque en los últimos años se ha observado una mayor tendencia hacia el consumo interno, Chile sigue siendo un país con alto índice de exportación de carne de cerdo, siendo ésta, la principal carne de exportación, alcanzando un nivel récord en el año 2018, cercano a los US\$500 millones de dólares. (Asprocer, 2019). Así, Chile se mantiene como el sexto exportador de carne de cerdo en el ranking mundial, siendo sus principales destinos Japón (27%),

Corea del Sur (23%) y China (17%), lo cual representa más de las tres cuartas partes de las exportaciones (INE, 2019; Asprocer, 2019). Según el último censo agropecuario registrado en el primer semestre del año 2019, el número de cerdos existente en Chile fue de 2.566.782, de los cuales 2.338.327 estaban destinados a engorda y 228.455 corresponden a animales reproductores (INE, 2019).

1.3 Síndrome multisistémico postdestete (PMWS)

El síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete en cerdos (PMWS, por sus siglas en inglés de *Postweaning multisystemic wasting syndrome*) es una enfermedad viral y epizootica, de gran impacto y considerada emergente hace un par de décadas (Tucker, 2009), evolucionando rápidamente de epidémica a endémica (Alarcón *et al.*, 2011; Rose *et al.*, 2012). Esta enfermedad se caracteriza por ser lenta y progresiva (Harding y Clark, 1997), con un periodo de incubación relativamente largo (alrededor de 18 a 25 días), que afecta generalmente a cerdos entre las 6 y 15 semanas de edad (Harding y Clark, 1997; Tucker, 2009; Alarcón *et al.*, 2011), aunque se ha descrito también en animales de 4 a 20 semanas (Segalés y Domingo, 2002; Harding, 2004; Harding *et al.*, 2008). Tiene una alta prevalencia, sin embargo, la severidad y duración del síndrome varía dependiendo del tamaño y las condiciones particulares de cada granja (Harding y Clark, 1997; Madson y Opriessnig,

2011), por lo que para la evaluación de la enfermedad y sus signos clínicos se debe considerar siempre las valoraciones tanto a nivel individual como grupal (Tucker, 2009). Por consiguiente, la morbilidad y letalidad dependen de cada lote específico de animales, con rangos que varían entre 4 - 30% y 4 - 20%, respectivamente (Segalés y Domingo, 2002).

La mayoría de los cerdos de producción comercial suelen infectarse con el virus en algún momento de sus vidas, pero sólo cierta cantidad de animales (10 %) desarrollan PMWS (Darwich *et al.*, 2004), presentando lesiones en múltiples órganos (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999) y manifestaciones clínicas como pérdida de peso, disnea, ictericia, diarrea intermitente y linfonódulos (LN) visiblemente aumentados de tamaño (Clark, 1997; Harding y Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999; Krakowka *et al.*, 2004; Tucker, 2009). Según estos parámetros, se establece entonces que la carga viral es una de las principales diferencias entre la infección clínica y la infección subclínica y dado que su ciclo de replicación es relativamente largo (Segalés, *et al.*, 2013), es probable que el virus necesite un tiempo de incubación prolongado para alcanzar altos títulos de carga viral tanto en suero como en tejidos.

El Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) ha sido descrito como el agente responsable y necesario para causar el PMWS, aunque por sí solo no es suficiente para desencadenar los signos clínicos de este cuadro patológico

(Nayar *et al.*, 1997; Allan *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1998). Existen factores que son también necesarios y exacerbaban la expresión y severidad de la enfermedad multisistémica, tales como las prácticas de manejo inapropiadas, corrientes de aire de baja calidad, hacinamiento, condiciones de estrés y presencia de coinfecciones en los animales afectados (Harding y Clark, 1997; Madec, 2008; Finsterbusch y Mankertz, 2009). Bajo ciertas condiciones específicas, los cerdos infectados severamente con PCV2 pueden desarrollar además, infecciones secundarias con bacterias como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella* spp., y con virus responsables de enfermedades como la peste porcina clásica, el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), la enfermedad de Aujeszky, parvovirus porcino (PPV), virus de la influenza porcina y virus de la peste porcina africana (Roth, 1999). Por lo tanto, la falta de efectividad de una terapia antibiótica (Segalés *et al.*, 1997; Harding *et al.*, 1998) y la concurrencia de otras enfermedades secundarias (Clark, 1997; Segalés y Domingo, 2002; Rodríguez-Arriola *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2003; Madec, 2008) son aspectos característicos en los casos de animales afectados por el PMWS, que presentan inmunosupresión (Segalés *et al.*, 2004).

Los casos de PMWS se pueden definir según parámetros pertenecientes al animal o a la granja en general. Individualmente, se definen como la coexistencia de varios factores: i) pérdida de peso y retardo en el crecimiento

como signos clínicos, ii) lesiones histológicas que indiquen problemas en los órganos o tejidos linfoides y iii) infección con PCV2 dentro de las lesiones características (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999; Sorden, 2000; Harms *et al.*, 2001). A nivel de granja, se define como una alteración del estatus sanitario por aumentos excesivos de animales muertos y pérdida de peso post-destete en comparación con el nivel histórico del plantel, y también por la identificación de casos de PMWS, en por lo menos uno de los animales con los signos mencionados (Segalés *et al.*, 2003).

Se ha establecido que, aparte de generar un cuadro de PMWS, PCV2 se correlaciona con otros síndromes que, colectivamente, reciben el nombre de PCVAD (término aprobado por la Asociación Americana de Veterinarios de Cerdos por sus siglas en inglés de Enfermedades sistémicas asociadas a Circovirus Porcino) (Chae, 2012), incluyendo enfermedades tanto clínicas como subclínicas (Madson y Opriessnig, 2011) como por ejemplo, el complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC), enteritis, problemas reproductivos, síndrome dermatitis nefropatía porcina (PDNS) y casos de neumonía necrotizante (PNP) (Segalés *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2007). En el caso del Síndrome dermatitis nefropatía porcina, es característica la depresión y anorexia en los animales (Drolet *et al.*, 1999), aunque el signo clínico más obvio es la presencia de manchas rojizas irregulares y pápulas en la piel, principalmente hacia las extremidades posteriores y área perineal, pudiendo

dejar cicatrices debido a las lesiones cutáneas (Segalés *et al.*, 1998; Drolet *et al.*, 1999). Adicionalmente, el PCV2 puede replicarse en los fetos llegando a desencadenar su muerte, por lo que ha sido asociado también a casos de abortos (West *et al.*, 1999; Brunborg *et al.*, 2007), momificaciones (Madson *et al.*, 2009) y fallas reproductivas relacionadas a problemas en la implantación, con retornos irregulares al estro (West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Mateusen *et al.*, 2007; Madson y Opriessnig, 2011; Segalés, 2013).

Según esta información, es indispensable que el diagnóstico diferencial se realice con base en los hallazgos histopatológicos de tejidos linfoides, para no confundir las presentaciones clínicas de PCV2 con otras infecciones causadas por agentes como PRRS, PPV, herpesvirus porcino, enterovirus porcino, entre otros (Madson y Opriessnig, 2011; Segalés, 2013).

1.4 Etiología PCV2

Circovirus Porcino pertenece al género Circovirus, familia Circoviridae, siendo uno de los virus sin envoltura más pequeño, con una cápside icosaedra de un diámetro aproximado de 12 a 23 nm (Rodríguez-Cariño y Segalés, 2009). Posee ADN circular de cadena sencilla con una longitud de 1767-1768 nucleótidos en sentido negativo y covalentemente cerrado, de morfología similar

a picornavirus y capaz de replicarse en células de mamíferos sin efecto citopático (Tischer *et al.*, 1974; 1982; Meehan *et al.*, 1998; Tucker, 2009).

Según estudios evolutivos, se sugiere que PCV1 y PCV2 podrían tener un origen en común hace aproximadamente 100 años (Olvera *et al.*, 2007), siguiendo trayectorias evolutivas independientes desde aquella época (Firth *et al.*, 2009). Por su parte, no se ha descrito que PCV1 genere enfermedad alguna en los cerdos infectados, por lo que hasta el momento, se mantiene asociado a cultivo celular, mientras PCV2 sí es asociado a la enfermedad (Allan *et al.*, 1999; Tucker, 2009). Complementariamente, los análisis de secuencia de PCV2 que se han llevado a cabo con diferentes aislados alrededor del mundo, indican una relación filogenética cercana, con una identidad nucleotídica mayor a 93%, que generan la base para estudios moleculares y epidemiológicos, en cuanto a distribución de cepas y programas de vigilancia y control, según sus patrones de patogenicidad o inmunogenicidad. Hasta hace unos años, se conocían solamente dos subtipos de PCV2: a y b. Un tercer subtipo identificado en Dinamarca en los años 80's (Dupont *et al.*, 2008; Jacobsen *et al.*, 2009) se ha denominado PCV2c e incluso se ha propuesto un cuarto subtipo, que hasta el momento ha sido descrito solamente en China, denominado PCV2d (Ge *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2019). Finalmente, datos preliminares indican la existencia de un quinto subtipo tanto en granjas europeas como de América del sur, que sería PCV2e (Cheung, 2007; Gagnon *et al.*, 2007; Olvera *et al.*, 2007; Dupont *et*

al., 2008; Wang *et al.*, 2009; Segalés *et al.*, 2013). Con esta distribución, no es descartable la posibilidad de una infección concurrente con más de un genotipo en la misma granja (Segalés *et al.*, 2013). Adicionalmente, un nuevo virus PCV tipo 3 (PCV3), ha sido descrito recientemente en cerdos, asociado a cuadros de inflamación multisistémica, fallas reproductivas, PDNS y dermatitis porcina tanto en China (Shen, *et al.* 2017; Ku *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019) como en Estados Unidos (Palinski *et al.*, 2016) y algunos países de Europa, tanto en cerdos con y sin sintomatología clínica (Savic *et al.* 2019); y más recientemente, en abril del año 2019, se identificó un nuevo circovirus en varios cerdos con importantes signos clínicos en la provincia de Hunan, China, siendo éste último denominado PCV tipo 4 (PCV4), con un tamaño de aproximadamente 1770 nucleótidos (Zhang *et al.*, 2019). Así, se ha reportado entonces que existe una alta tasa de sustitución nucleotídica dentro del gen de la cápside, permitiendo una evolución continua y la emergencia de nuevas cepas (Yang *et al.*, 2018).

Los genotipos principales de PCV2 (PCV2a y PCV2b) han demostrado ser lo suficientemente virulentos para desencadenar PCV2-AD en cerdos (Allan *et al.*, 2004), siendo PCV2b el más exitoso patológicamente (Tomás *et al.*, 2008). La interacción entre el PCV2 y su hospedero natural es un proceso complejo que comienza con la unión y entrada a la célula hospedera, en donde tiene lugar la replicación viral que se da en varios tipos celulares, principalmente en células

epiteliales y endoteliales, al igual que en la línea monocítica (Nauwynck *et al.*, 2012).

PCV1 y PCV2 tienen además, una organización genómica similar con dos marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés de Open Reading Frame) antisentido que flanquean el origen de replicación (Finsterbusch y Mankertz, 2009) en direcciones opuestas: ORF1, denominado gen *rep*, que codifica dos proteínas de 37 kDa asociadas a la replicación denominadas Rep y Rep', producidas a partir del mismo transcrito pero con *splicing* diferente (Mankertz *et al.*, 1998; Mankertz y Hillenbrand, 2001; Cheung, 2003; Mankertz *et al.*, 2003; Finsterbusch y Mankertz, 2009); y ORF2, denominado gen *cap*, que codifica la proteína de cápside (Cap) de 27,8 kDa, y presenta mayor importancia inmunogénica (Cheung, 2003; Nawagitgul *et al.*, 2000; 2002). Adicionalmente, en los cultivos celulares llevados a cabo en células PK-15, se identificó una tercera proteína dentro de un ORF3, involucrada en la patogenicidad del virus durante la infección (Liu *et al.*, 2005; 2006).

PCV2 representa una estrategia de vida viral persistente ya que la infección es a largo plazo, rara vez causa una enfermedad aguda, y el virus como tal es genéticamente bastante estable (Villareal *et al.*, 2000). Después de la infección, el genoma viral utiliza factores celulares del hospedero para convertir su ssADN

(single stranded ADN) a su forma replicativa dsADN (doble stranded ADN), que sirve como templado intermediario para la replicación viral.

Debido a su genoma tan pequeño y su poca capacidad codificante, el ciclo de vida de PCV reside primordialmente en los factores del hospedero (Finsterbusch y Mankertz, 2009). Ya que PCV2 no codifica su propia polimerasa, su replicación depende de la polimerasa celular presente en el núcleo de la célula infectada durante la fase S del ciclo celular (Tischer *et al.*, 1982; Tucker, 2009). Las enzimas celulares expresadas durante esta fase favorecen la replicación de PCV2 (Tischer *et al.*, 1987), por lo tanto, las células más eficientes son aquellas que mantienen una alta actividad mitótica (Darwich *et al.*, 2004) y están generalmente en proceso de división, con su ADN polimerasa activa, como las PK-15. Por consiguiente, la acumulación de antígeno ORF1 y ORF2 en el núcleo de células PK-15 sirve como indicativo de su replicación (Gilpin *et al.*, 2003).

El PCV se replica por el modelo de círculo rodante (Stenger *et al.*, 1991; Ilyna y Koonin, 1992; Koonin e Ilyna, 1992; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000); además, utiliza glicosaminoglicanos como receptores de unión para que los mRNA de *rep* y *cap* sean transcritos y posteriormente, las proteínas sean sintetizadas e importadas desde el citoplasma. En las células PK-15, la cápside es la primera proteína detectable producida después de la infección, y se localiza en el área

perinuclear de la célula uniéndose a receptores específicos; luego de 12 horas de inoculación, tanto la proteína Cap como la proteína Rep pueden ser detectables en el núcleo. Finalmente, después de 36 horas, los títulos virales se estabilizan, indicando que el virus completó su replicación. Con esta base, y ya que todas las proteínas codificadas por PCV se encuentran localizadas principalmente en el núcleo, la replicación del ADN y la encapsidación del genoma circular de cadena sencilla ocurre probablemente en el núcleo y no en los compartimientos citoplasmáticos (Finsterbusch y Mankertz, 2009).

1.5 Epidemiología

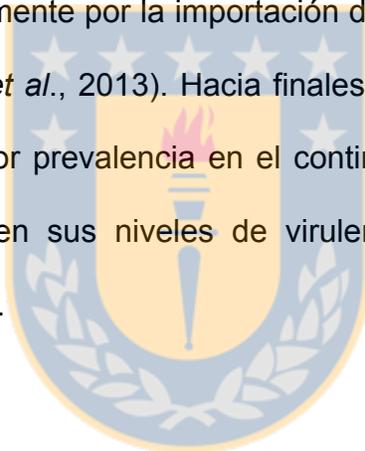
El PCV se describió hace casi 40 años, como principal contaminante de la línea celular de riñón porcino PK15 (ATCC-CCL-33) y se denominó en su momento, por el clínico Dr. John Harding y el patólogo Dr. Edward G. Clark, Circovirus Porcino (PCV) (Tischer *et al.*, 1982). Datos epidemiológicos plantean que PCV ha sido un agente ubicuo en la población porcina alrededor del mundo durante los últimos 50 años (Grau-Roma *et al.*, 2011; Rose *et al.*, 2012).

El PMWS se describió inicialmente en el año 1991 en Saskatchewan, provincia ubicada al oeste de Canadá, como una nueva enfermedad esporádica cuya patología clínica se caracterizaba por emaciación e ictericia, así como por pérdida de peso, palidez, complicaciones respiratorias y, ocasionalmente,

diarrea en cerdos de recría y engorda (Clark, 1996; Segalés *et al.*, 2005); aunque la primera evidencia de una infección con PCV2 data de 1962, en Alemania, y el primer diagnóstico de la enfermedad se remonta a los años 80's (Jacobsen *et al.*, 2009).

Con el tiempo, se ha observado una transición aparente desde una infección subclínica endémica hasta la ocurrencia de una enfermedad epidémica entre finales de los años 90's y comienzos de los años 2000's, quedando todavía dudas sobre la causa específica de este cambio (Segalés *et al.*, 2013). Los primeros brotes de la enfermedad en el Reino Unido se reportaron en Irlanda del Norte en 1997 (Kennedy *et al.*, 2000) y hacia el sur de Inglaterra a finales de 1999 (Done *et al.*, 2001). Desde entonces, la enfermedad ha evolucionado de tal forma que se han reportado cambios en la presentación y severidad del síndrome en los planteles de producción (Alarcón *et al.*, 2011), observándose un apogeo de la epidemia entre 2002 y 2003 (Anon, 2009). Posteriormente, desde el 2003, ha habido una drástica variación global en cuanto a la prevalencia de PCV2 en poblaciones comerciales de cerdos, así como un aumento clínico en la severidad de PCVAD (Lipej *et al.*, 2005; Gagnon *et al.*, 2007; Cheung, 2007; Carman *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Wiederkehr *et al.*, 2009; Chae y Choi, 2010; Cortey *et al.*, 2011b).

PCV2 ha sido clasificado según su genotipo, derivando en PCV2a y PCV2b, entre otros. Antes de 2003, PCV2a y PCV2b estaban presentes en Europa y China, mientras que en Estados Unidos y Canadá existía solamente PCV2a (Allan *et al.*, 2007; Dupont *et al.*, 2008; Chae y Choi, 2010). Europa y Norteamérica han sido las áreas de mayor diseminación del virus alrededor del mundo; incluso, se sospecha que el genotipo PCV2b fue introducido en Norteamérica desde Europa (Vidigal *et al.*, 2012). En Cuba se detectó recién en el año 2005, probablemente por la importación de cerdos desde Canadá (Pérez *et al.*, 2011; Segalés *et al.*, 2013). Hacia finales de la década del año 2000, el PCV2b fue el de mayor prevalencia en el continente americano, evidenciando un aumento notable en sus niveles de virulencia (Franzo, G. *et al.*, 2016, Constans, *et al.*, 2015).



1.6 Transmisión

PCV2 puede ser transmitido por diferentes vías ya que se excreta en las heces y orina, así como en las secreciones respiratorias y orales (Segalés *et al.*, 2005; Patterson *et al.*, 2011), tanto de animales clínicamente afectados, como de animales infectados pero aparentemente saludables. Teniendo en cuenta que PCV2 posee una alta resistencia ambiental y a los tratamientos químicos y térmicos, no es sorprendente que sea persistente y con una distribución ubicua, presente en prácticamente todos los lugares donde se crían cerdos (López-

Soria y Segalés, 2013). Sin embargo, su ruta principal de contagio es el contacto oro-nasal con heces infectadas, contacto con orina infectada, o contacto directo con cerdos infectados; por lo tanto, la carga ambiental del virus es entonces un indicador importante del estatus sanitario de los planteles (Beach y Meng, 2012).

Aparte de esta transmisión horizontal, PCV2 puede ser transmitido también de manera vertical a través de la placenta porque es capaz de atravesarla e infectar los fetos presentes en el útero, generando lechones con cuadros de PMWS durante el periodo postnatal (Ha *et al.*, 2008). La infección fetal que tiene lugar en los oocitos y embriones, se da debido a la unión del virus a la zona pelúcida de los oocitos de cerdo (Singh y Thomas, 1987; Bielanski *et al.*, 2004); por lo que el tracto reproductivo se reconoce como una fuente de contaminación microambiental potente, previo a la fecundación (Madson y Opriessnig, 2011). Esta infección fetal con PCV2 ocurre antes de la mineralización ósea en el feto (Kim *et al.*, 2004), resultando en la muerte embrionaria temprana con reabsorción fetal en donde, si la camada no es muy grande y hay pérdida de todos los fetos, la hembra puede volver a su ciclo estral (Madson y Opriessnig, 2011). Las camadas que se ven afectadas están compuestas habitualmente por un número alto de fetos no viables, ya sean momificados o nacidos muertos con lo que de manera frecuente, la única

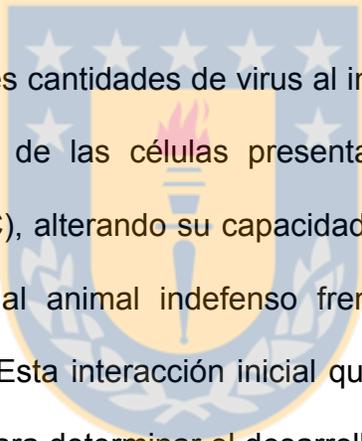
indicación de una infección en el útero son los elevados casos de pérdidas y momificaciones (Madson y Opriessnig, 2011).

Después del parto, tanto el calostro como la leche pueden contener PCV2, según lo reportado por primera vez por Shibata *et al.* (2003) a partir de una investigación llevada a cabo en tres planteles de cerdos japoneses. En aquel momento, se demostró la presencia de PCV2 en muestras de calostro obtenidas 24 horas después del nacimiento en hembras seronegativas, inoculadas experimentalmente con PCV2 en el día 93 de gestación, diseminación que se mantuvo en la leche materna hasta por lo menos 27 días después del parto (Madson y Opriessnig, 2011).

1.7 Patogenia y lesiones

La patogénesis depende fundamentalmente del estado inmunológico del animal infectado y de la presencia de otros patógenos concomitantes. En un principio, se postuló que el PCV2 se encuentra asociado a células de la línea monocítica y células dendríticas y se ha postulado incluso, que el virus podría usar estas últimas como mecanismo de replicación y diseminación viral (Vincent *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2000; Krakowka *et al.* 2000). Posteriormente, se estableció que las partículas virales encontradas en estos tipos celulares corresponden principalmente a fracciones víricas fagocitadas (Steiner *et al.*,

2007). El virus es detectable en macrófagos en distintas partes del organismo, incluyendo las células de Kupffer del hígado, en los macrófagos alveolares e intersticiales del pulmón y en otras células como hepatocitos, células epiteliales y endoteliales siendo éstas últimas, las células más importantes en la replicación viral (Krakowka *et al.*, 2001). Por su parte, Sánchez *et al.* (2004) ha descrito la presencia de PCV2 en linfocitos, pero en niveles muy bajos, por lo que la tasa de replicación en ellos suele ser muy escasa.



Se han descrito grandes cantidades de virus al interior de las células de la línea monocito-macrófago y de las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas (DC), alterando su capacidad de reconocimiento de señales de peligro, dejando al animal indefenso frente a infecciones secundarias (Vincent *et al.*, 2005). Esta interacción inicial que se da entre el patógeno y el hospedero es crucial para determinar el desarrollo de la infección. No está claro hasta el momento, por qué algunos animales son capaces de eliminar eficientemente la infección viral, mientras que otros fallan en desarrollar una respuesta inmune efectiva y desarrollan signos clínicos de la enfermedad (Beach y Meng, 2012); por el contrario, sí hay evidencia de los desórdenes inmunes inducidos por PCV2, debido al silenciamiento de las señales de peligro, asociados a patógenos, en las células dendríticas. Así, la infección con PCV2 genera entonces una pérdida en la conexión entre el sistema inmune

innato y adquirido (Vincent *et al.*, 2007), aunque solamente un porcentaje de los animales que se infectan terminan enfermándose.

PCV2 es capaz de sobrepasar los mecanismos degradativos normales de las células monocíticas y permanecer indetectable por el sistema inmune. *In vivo* se ha demostrado que al recibir una señal inmunológica apropiada, se estimula la replicación y liberación de PCV2 en los monocitos y macrófagos, teniendo como resultado la acumulación del antígeno viral (Gilpin *et al.*, 2003). En las lesiones histopatológicas de los cerdos afectados con PMWS, los antígenos de PCV2 y su ADN son normalmente encontrados en el citoplasma de las células monocíticas en varios estados de diferenciación, aunque también podrían encontrarse en otros tipos celulares, dependiendo del estado de avance de la enfermedad (Gilpin *et al.*, 2003). Las células epiteliales y endoteliales son el primer tipo celular permisivo para la replicación de PCV2, pero posteriormente el virus puede infectar otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y linfocitos activados (Harding *et al.*, 1998). Las células dendríticas y los macrófagos son los encargados de censar los patógenos invasores, mediando la respuesta inmune innata para suprimir la replicación de los mismos mediante citoquinas, fagocitosis y liberación tanto de oxígeno reactivo como de nitrógeno. Como células presentadoras de antígeno profesionales, las células dendríticas no solo inician la respuesta inmune adaptativa, sino que también controlan y regulan la actividad de las células T a través de la producción de

citoquinas estimuladoras o inhibidoras, mientras que los macrófagos relevan su importancia a la eliminación fagocítica, reacciones inflamatorias y al control de la homeóstasis de los tejidos (Segalés *et al.*, 2001).

El PCV2 afecta directamente las células en división incluyendo linfocitos B y macrófagos, e induce apoptosis directamente en los linfocitos B individuales durante la infección celular; sin embargo, no puede inducir apoptosis o necrosis de macrófagos. Los cuerpos linfocíticos apoptóticos con PCV2, quedan entonces atrapados dentro de los macrófagos y las células gigantes en los centros germinales, y sirven como una fuente de infección para las células que residen o migran a lo largo de los LN durante el curso de la infección (Shibahara *et al.*, 2000). Así, cuando los macrófagos fagocitan ávidamente las células apoptóticas, se favorece la producción de nuevos viriones (Stevenson *et al.*, 1999).

Dentro de los signos clínicos relevantes en los cuadros de PMWS se incluyen palidez, fiebre, y una pérdida progresiva de peso, junto a desórdenes respiratorios y digestivos, entre otros; adicionalmente, el aumento de tamaño de los LN es una de las principales características observadas en los animales afectados por PCV2. En el análisis histopatológico de los LN es característico observar una disminución del tejido linfoide, junto a una infiltración difusa de células histiocíticas, lo cual indica que la respuesta inmune está altamente

involucrada (Allan *et al.*, 1999). Una posible explicación para esta disminución linfoide puede ser la infección y destrucción de precursores de linfocitos en la médula ósea y/o timo (Allan, *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2000; Magar *et al.*, 2000; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002; Darwich *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2007a; b), evidenciando una disminución simultánea de linfocitos en otros tejidos.

Las lesiones histológicas más comunes en animales afectados con Circovirus post-destete ocurre en los nódulos linfáticos, manifestándose principalmente una depleción linfoide y una pérdida de la estructura normal del folículo linfático. Además de la disminución de linfocitos dentro de los folículos linfoides, éstos son reemplazados por células histiocíticas, ya sea de carácter multifocal y/o difusa y en menor proporción, se observa también la aparición de células gigantes mononucleadas; siendo la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, basófilos y esféricos en las células histiocíticas, característicos en los cuadros de circovirus porcina (Segalés *et al.*, 2004).

Existe una fuerte correlación positiva entre la severidad de las lesiones, la carga viral presente en los tejidos linfoides y la manifestación clínica de la enfermedad (Krakowka *et al.*, 2001). Segalés *et al.* (2004) describe las siguientes lesiones macroscópicas como las más frecuentes según estudios de campo: emaciación (80,3%), ictericia (3,03%), linfadenopatía regional o generalizada (52,78%), necrosis del parénquima de nódulos linfáticos (2,27%), poliserositis (25%),

serositis fibrinosa (10.35%), serositis fibrosa (14,65%), ausencia de colapso pulmonar (64,39%), consolidación pulmonar cráneo-ventral (59,34%), neumonía necrotizante (2,02%), atrofia serosa de la grasa (22.73%), úlcera gástrica en la parte esofágica (28,54%), puntos blanquecinos en riñones (18,43%), atrofia hepática (3,28%), hepatomegalia (0,51%), diarrea y colitis catarral (11,11%) y colitis fibrino-necrótica (3,28%). En todo caso, se ha establecido que los cuadros clínicos resultantes de la infección con PCV2 dependen básicamente de un balance entre las coinfecciones presentes en el animal, la genética, condiciones de su sistema inmune y de las características propias del virus presente (Darwich y Mateu, 2012).

Los animales que desarrollan enfermedades asociadas a PCV2 presentan definitivamente, alteraciones en su capacidad de montar una respuesta inmune protectora, generando cuadros con alteraciones hematológicas como anemia, linfopenia, monocitosis y neutrofilia (Darwich *et al.*, 2003; Segalés *et al.*, 2004).

1.8 Respuesta Inmune

El sistema inmune constituye la principal barrera que poseen los animales superiores para protegerse de las infecciones en general. La inmunidad inespecífica es aquella que actúa contra cualquier material extraño que invade al organismo; este tipo de inmunidad es innata y en ella participan barreras

físicas como la piel y las membranas mucosas; barreras químicas como el ácido clorhídrico del jugo gástrico o el ácido láctico presente en el sudor; proteínas que inactivan a los agentes infecciosos o destruyen a las células infectadas, como la lisozima presente en las lágrimas y secreciones mucosas, las enzimas del sistema de complemento y los interferones (DeWeerd *et al.*, 2007).

En general, la primera fase de la respuesta inmune se gatilla directamente después del reconocimiento de las estructuras virales, por células del sistema inmune innato, incluyendo macrófagos y células dendríticas. Estas células producen factores antivirales como interferón alfa/beta y citoquinas pro-inflamatorias tales como interleuquinas, factor de necrosis tumoral alfa y quimoquinas, para atraer más leucocitos al sitio de infección. Por su parte, la respuesta inmune adaptativa que se da en la fase II y que incluye células B y T, solamente puede ser detectada algunos días después de la respuesta inmune innata, ésto como consecuencia del tiempo necesario para la expansión clonal de los linfocitos específicos de antígeno durante la fase III. Después de la eliminación del patógeno, la respuesta inmune adaptativa baja para mantenerse en niveles estables durante la fase IV, lo cual resulta de la apoptosis de los linfocitos específicos de patógeno y la activación de las células reguladoras del sistema inmune (Segalés *et al.*, 2001).

Los interferones () son una familia de citoquinas presentes solamente en vertebrados y entre sus actividades biológicas se destacan la actividad antiviral, actividad antitumoral y efectos inmunopotenciadores (Isaacs y Lindenmann, 1957; Pestka *et al.*, 1987; De Maeyer y De maeyer-Guignard, 1988; Vicek y Sen, 1996), mediante su unión a receptores en la superficie de las células infectadas, activando diferentes vías de señalización. Son considerados como moduladores de la respuesta inmune, ya que al interferir en la infección vírica, son capaces de proteger el animal frente a la acción viral, actuando como un agente antivírico directo (Isaacs y Lindermans, 1957); es una proteína natural, producida por una variedad de células durante la infección viral, que logra activar la transcripción de múltiples genes funcionales en las células, regular la sinergia entre varias vías de señalización y mediar funciones biológicas como la actividad antiviral, la regulación inmune y el crecimiento celular (Liu *et al.*, 2019).

Se ha descrito que el IFN no sólo es capaz de restringir la infección produciendo un estado antivírico en la célula sino además, incrementando la susceptibilidad de las células infectadas a la lisis, favoreciendo de esta forma la diferenciación de los linfocitos T (Tc) y ejerciendo una acción reguladora sobre la producción de anticuerpos (Chen, *et al.*, 1986). Los IFN, aumentan entonces la actividad citotóxica de los Tc ya que reconocen el antígeno asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) e inducen la expresión de estas

moléculas (Wong *et al.*, 1984); este incremento de MHC aumenta la asociación de las proteínas víricas, favoreciendo el reconocimiento de las células T citotóxicas y como resultado, ocurre el reconocimiento y se incrementa la actividad citotóxica contra las células infectadas (Blackman, *et al.*, 1986).

Existen dos tipos principales de interferón: los tipo 1 están representados por el interferón alfa (IFN α) y el interferón beta (IFN β); ambos tienen una actividad biológica muy similar siendo ejemplos de la llamada respuesta inmune inespecífica y sus estructuras moleculares son muy parecidas. El IFN α es producido principalmente por los leucocitos infectados por virus, generando activación de células natural killer (NK), macrófagos y células dendríticas (CD), esenciales en la respuesta inmune innata; mientras que el IFN β es producido por fibroblastos infectados por virus (Pestka *et al.*, 1987; De Maeyer y De maeyer-Guignard, 1988; Brion *et al.*, 1999). El IFN α también estimula la síntesis de proteínas clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-clase 1), estas moléculas están presentes en las membranas de todas las células con núcleo y participan en la presentación de antígenos (en particular de antígenos virales) para que sean reconocidos por el sistema inmune (DeWeerd *et al.*, 2007).

Algunas características de los IFN como su propiedad antiproliferativa y la antivírica han producido un gran interés para estudiar su posible aplicación

clínica (Stringfellow, 1986). El uso de IFN α , específicamente, como inmunoestimulador de la producción de citoquinas ha sido demostrada previamente en el desarrollo de vacunas recombinantes contra el virus de la influenza humana (Bracci *et al.*, 2006), virus de la fiebre aftosa (Cheng *et al.*, 2007) virus del PRRS (Brockmeier *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2019) y más recientemente contra el virus de la fiebre porcina clásica (Toledo *et al.*, 2010) y virus de la influenza H1N1 en cerdos (Liu *et al.*, 2019); por lo que se ha planteado como un candidato llamativo para potenciar la respuesta inmune en animales vacunados frente a patógenos virales.

1.9 Diagnóstico

Es importante tener claro que el diagnóstico de las enfermedades asociadas a PCV2 debe basarse no sólo en la detección del virus y/o de anticuerpos, sino en una valoración inicial tanto de los signos clínicos cuando comienza su manifestación (Segalés, 2012), como de las alteraciones en los parámetros productivos que tenga el plantel (Segalés y Domingo, 2002; Opriessnig *et al.*, 2007). Deben evaluarse entonces, parámetros como tiempo de infección, cantidad de animales con viremia y número de fetos o animales infectados, teniendo claro que no es común que las hembras preñadas presenten signos clínicos, aparte de ser seropositivas y presentar o no viremia, lo que no siempre

se correlaciona con una infección fetal en los casos reproductivos (Madson *et al.*, 2008; 2009).

Se han desarrollado pautas para establecer un diagnóstico a nivel de granja, las cuales se basan en dos elementos: (i) un aumento significativo en la mortalidad post-destete asociada a la presencia de signos clínicos compatibles con PCV2-AD, con respecto al historial de la granja y (ii) un diagnóstico individual de PCV2-AD en al menos 1 de 3 cerdos a la necropsia, de manera simultánea, al aumento de la mortalidad mencionada (Segalés, 2012; Tucker, 2009). En los casos de diagnóstico clínico a nivel individual, el enfoque aceptado actualmente se basa en las observaciones realizadas por Sorden (2000), que incluyen: signos clínicos como pérdidas de lechones al momento del destete, hallazgos patológicos como emaciación, neumonía intersticial y linfadenopatía y, finalmente, una demostración de la presencia de PCV2 en lesiones patológicas; además de una evaluación de la viremia para detectar si las estrategias de vacunación están funcionando correctamente (Wozniak *et al.*, 2019).

El diagnóstico se basa entonces en los signos clínicos y en la presencia de antígeno en las lesiones de más de un tejido linfoide, o un tejido linfoide y algún otro órgano como pulmón, hígado, riñón e intestino, o, en dos órganos sistémicos. Para ello, se ha desarrollado un sistema de puntaje de 0 a 9 para estimar la severidad de la enfermedad con base en la extensión de tejido

linfático involucrado en los siete tejidos linfoides que son evaluados para este propósito: LN traqueo bronquiales, LN mesentérico, LN mediastínico, LN superficial inguinal, LN iliaco externo, tonsilas y bazo (Opriessnig *et al.*, 2004).

La inmunohistoquímica (IHQ) (Ellis *et al.*, 1998; Sorden *et al.*, 2000) y la hibridación *in situ* (HIS) (Kim *et al.*, 2003) son consideradas las técnicas estándar de oro para la detección de antígenos de PCV2 o de ADN en tejidos y fetos sospechosos; teniendo en cuenta que en el último caso, el miocardio es el tejido más apropiado para la detección del virus, ya que contiene antígeno tanto en el citoplasma como en el núcleo de células infectadas (Madson y Opriessnig, 2011). En los órganos linfoides y especialmente en los nódulos linfáticos, se suele detectar una gran cantidad de ácido nucleico y antígeno viral, utilizando las técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, respectivamente (Rosell *et al.*, 1999).

Debido a la ubicuidad del virus, se han propuesto otras vías para un diagnóstico efectivo que no implique la eutanasia animal. Según esto, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es otro método para la detección de PCV2 en tejidos o suero, incluso se puede utilizar un conglomerado de muestras (Cortey *et al.*, 2011a) en donde es recomendable que se incluya el miocardio, en el caso de los fetos. Adicionalmente, varios estudios han propuesto la técnica de PCR en tiempo real como método cuantitativo para el diagnóstico de PCV2 según los

umbrales determinados en suero como indicativos de PCV2-AD, valores que varían entre diferentes autores con rangos que oscilan entre $10^{4,7}$ y $10^{7,43}$ copias virales/mL (Brunborg *et al.*, 2004; Olvera *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2005; Fort *et al.*, 2007; Harding *et al.*, 2008; Grau-Roma *et al.*, 2009; Segalés, 2012). La carga viral de PCV2 en sangre se usa para categorizar a los cerdos como infectados subclínicamente con PCV2 ($<10^6$ copias ADN/mL), sospechosos (10^6 - 10^7 copias ADN/mL) o positivos para PCV2-AD ($>10^7$ copias ADN/mL) (Liu *et al.*, 2000; Olvera *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2009). Así, aunque la PCR no resulta ser una técnica suficiente para diagnosticar la enfermedad en el animal, sí es una herramienta valiosa para determinar el estatus sanitario de una granja (Grau-Roma *et al.*, 2009).

Adicionalmente, la serología es también un método conveniente para detectar la exposición a PCV2 en un lote grande de cerdos, con ensayos que incluyen inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa en monocapa, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (Elisa) y seroneutralización viral. La mayoría de los plantales son seropositivos y es muy probable que las madres transfieran el virus y los anticuerpos a su progenie a través del calostro. Es importante resaltar entonces, que los niveles de anticuerpos de la madre y aquellos transferidos a la progenie pueden variar incluso entre individuos del mismo rebaño, así como entre diferentes plantales. Tres semanas es el promedio aproximado de vida media para que los anticuerpos maternos se mantengan en

los lechones (Opriessnig *et al.*, 2004) pero pueden durar hasta las 18 semanas de vida, dependiendo de los títulos iniciales (Opriessnig *et al.*, 2009). Esta variabilidad del tiempo de permanencia y mantenimiento de los anticuerpos maternos en la progenie, hace que sea tan difícil predecir las infecciones por PCV2 en las poblaciones porcinas (Madson y Opriessnig, 2011).

En general, al realizar el diagnóstico es necesario determinar si la enfermedad en un plantel es significativamente importante como problema o si es una enfermedad esporádica. Un problema importante se refiere a un aumento en la mortalidad que sea mayor o igual a la media de los datos históricos más 1,66 veces la desviación estándar. Cuando no hay datos históricos de mortalidad, se define entonces como un aumento en la mortalidad que exceda el 50% de los niveles nacionales o regionales. Sin embargo, si menos del 50% de los cerdos se diagnostican con PCV2-AD y presentan aumento en la mortalidad, o si hay más de 50% de los cerdos diagnosticados pero no aumenta la mortalidad, entonces se considera un problema esporádico (Segalés, 2012).

1.10 Prevención y control

El control del PMWS es difícil y depende en gran medida del flujo de animales dentro de cada plantel, así como del estatus sanitario y del reconocimiento temprano del cuadro para la oportuna segregación de los cerdos afectados. La

implementación estricta de un sistema ‘todo dentro todo fuera’ favorece la reducción de la presión infectiva, siempre que se acompañe de un buen sistema de desinfección de áreas, división de grupos por edades y eutanasia de los animales enfermos, para prevenir la transmisión viral a cerdos susceptibles (Harding *et al.*, 1998). En las granjas afectadas, la mortalidad puede disminuir a través de la implementación de planes de manejo especiales como los principios de Madec (Tabla 1.1).

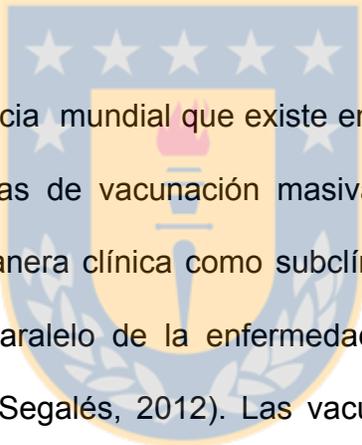


Tabla 1.1. Principios de Madec para los planes de manejo especiales. Tomada de Madec (2008)

Sitio	Medida
Maternidad	Todo dentro - todo fuera, con vaciado, limpieza y desinfección
	Lavar y desparasitar a las cerdas antes del parto
	Limitar la homogenización de camadas a solamente lo estrictamente necesario y dentro de las primeras 24 horas
Recría	Corrales pequeños con sólidas divisiones
	Todo dentro - todo fuera, con vaciado, limpieza y desinfección
	Baja densidad animal, menor o igual a 3 cerdos/m ²
	Amplio espacio de comedero, mayor a 7cm/cerdo
	Mejorar la calidad de aire (NH ₃ menor a 10ppm, CO ₂ menor a 0,1%, humedad relativa menor a 85%)
	Mejorar el control de la temperatura
	No mezclar animales de distintos lotes
Engorda	Corrales pequeños con sólidas divisiones
	Todo dentro - todo fuera, con vaciado, limpieza y desinfección
	No mezclar animales provenientes de distintos corrales de recría
	No mezclar animales dentro de los corrales de engorda
	Baja densidad animal, 0,75m ² /cerdo
Generales	Mejorar la calidad del aire y la temperatura
	Programa de vacunación adecuado
	Flujo acorde a las construcciones
	Estricta higiene (corte de colmillos, cola, inyecciones)
	Rápida remoción de cerdos enfermos a corrales de enfermería o eutanasia

Como se observa, en dicha tabla se recapitula la forma correcta para manejar una granja según el sitio de producción y que, con el tiempo, ha pasado a la historia como el sistema más consistente que permite, en ausencia de otras posibilidades y en el desconocimiento de la etiología del proceso, tratar de controlar la enfermedad (Madec, 2008).

1.10.1 Vacunación



Actualmente, la tendencia mundial que existe en los sistemas de salud porcina se basan en programas de vacunación masiva de lechones en las granjas afectadas, tanto de manera clínica como subclínica, y su éxito se debe a que favorecen el control paralelo de la enfermedad, así como la prevención de lesiones (Chae 2012; Segalés, 2012). Las vacunas comerciales utilizadas se desarrollaron inicialmente para controlar el PMWS, pero actualmente se usan también contra otras PCV2-AD y varían tanto en sus tipos de antígeno y adyuvantes, como en los tipos de animales recomendados para su uso (madres, lechones, o ambos), y la dosis (Chae, 2012).

Como estrategias de vacunación se manejan dos tipos e opciones: (i) vacunación de las hembras para una traspaso pasivo de anticuerpos maternos y (ii) vacunación de lechones para inducir una respuesta inmune activa. La efectividad de la vacunación de las hembras puede ser complicada por varios

factores: primero, la protección que confieren los anticuerpos derivados de la madre (ADM) es solamente parcial contra PCV2; segundo, estos anticuerpos contra PCV2 tienen una vida corta (2 a 8 semanas) y varían considerablemente incluso entre animales del mismo grupo, sin perdurar hasta las 7-15 semanas de vida que es el periodo de alto riesgo para el cuadro de PMWS; y tercero, aunque los ADM poseen la capacidad de neutralización viral, ésto por sí solo no es suficiente ya que tanto la inmunidad humoral como la inmunidad celular son esenciales para poder combatir la infección contra PCV2 (Lakshman *et al.*, 2012). Por lo tanto, la vacunación de los lechones puede ser usada como una alternativa benéfica en poblaciones donde la infección con PCV2 ocurre entre la etapa tardía de lactancia y la primera fase de recría (Chae, 2012).

La vacunación de las hembras reproductoras es importante para prevenir las infecciones intrauterinas y las fallas reproductivas asociadas a PCV2 (Madson y Opriessnig, 2011), y sirve además para disminuir la cantidad de virus diseminado tanto en el calostro como en la leche materna; sin embargo, no elimina completamente esta vía como fuente de infección para los lechones recién nacidos (Madson *et al.*, 2009; Gerber *et al.*, 2011) ya que, si bien reduce la carga viral sistémica, la protección que se obtiene es parcial (Opriessnig *et al.*, 2008; Gerber *et al.*, 2011). Aún así, la inmunidad pasiva, en la forma de anticuerpos maternos, sí protege parcialmente a los lechones contra la infección (McKeown *et al.*, 2005; Ostanello *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2008).

La primera vacuna comercial contra PCV2 (Circovac®) se usó inicialmente en Francia y Alemania en el año 2004 y en los últimos años, se han reportado otras vacunas comerciales bajo condiciones experimentales (Fort *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2009; Opriessnig *et al.*, 2009; 2010; Shen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Hemann *et al.*, 2012) y bajo condiciones de campo (Cline *et al.*, 2008; Fachinger *et al.*, 2008; Horlen *et al.*, 2008; Kixmoller *et al.*, 2008; Pejsak *et al.*, 2010; Kurmann *et al.*, 2011; Lyoo *et al.*, 2011; Fraile *et al.*, 2012). Actualmente, estas son las vacunas autorizadas a nivel mundial que se mantienen en el mercado: Circovac®, CircoFLEX®, Circuvent® y FosterTM PCV.

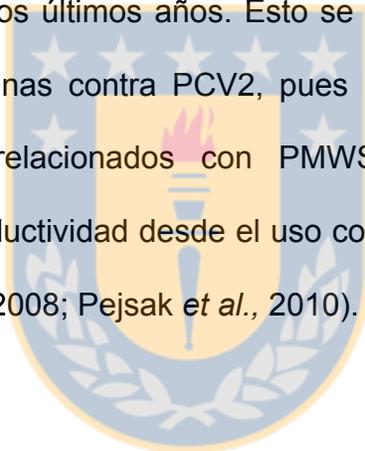
En un principio, Circovac® (Merial) fue introducida en el mercado para su uso sólo en hembras reproductoras (dosis de 2mL), aunque posteriormente, se aprobó también su uso en lechones, utilizando una dosis más reducida (0,5mL) (Fraile *et al.*, 2012). Esta vacuna está compuesta por un virus inactivado de PCV2a y está indicada actualmente tanto para lechones sanos mayores a tres semanas de edad como para hembras sanas en edad reproductiva: la vacunación de lechones requiere una única inyección intramuscular, mientras que la vacunación de hembras requiere dos inyecciones, una inmunización inicial y un refuerzo 3 semanas después (Beach y Meng, 2012).

Por otro lado, se encuentran también aquellas vacunas basadas en la expresión de la cápside, ya que se ha descrito el potencial de esta proteína para inducir una respuesta inmune protectora (Nawagitgul *et al.*, 2002; Blanchard *et al.*, 2003). Entre estas vacunas se encuentran Ingelvac CircoFLEX® (Boehringer Ingelheim) y Circumvent® PCV (MSD Salud Animal) (Beach y Meng, 2012). Adicionalmente, FosterTM PCV (Zoetic) fue introducida recientemente en el mercado y a diferencia de las anteriores, consiste en una quimera de virus atenuado e inactivado, en donde el gen *cap* de PCV2a se clonó en un esqueleto genómico de PCV1 no patogénico (Beach y Meng, 2012). Esta última, se trata de una reformulación de la antigua vacuna Suvaxyn® PCV One DoseTM (FortDodge Animal Health Care Inc.) y está indicada para lechones mayores a tres semanas, en la forma de monodosis intramuscular para prevenir tanto la viremia como la infección.

Generalmente, las vacunas que utilizan vectores vivos tienen el potencial de inducir una respuesta inmune fuerte frente a PCV2 sin el riesgo de una posible infección. Sin embargo, existen algunas preocupaciones relacionadas con la inmunidad preexistente contra el vector y su interferencia con la vacunación, además del potencial de reversión a un estado virulento en campo (Beach y Meng, 2012). Por lo tanto, la nueva era de desarrollo de vacunas sugiere la posibilidad de expresión de dominios antigénicos novedosos sobre la superficie de virus PCV2 infecciosos y virus quiméricos PCV1-2a y PCV2b, los cuales han

sido estudiados como una alternativa para usar en la producción de vacunas, debido a su prevalencia predominante y continua en campo. Estas tecnologías novedosas deben enfocarse al desarrollo de una inmunidad humoral y celular, disminuyendo al mismo tiempo los costos de los programas de vacunación en cada plantel (Beach y Meng, 2012).

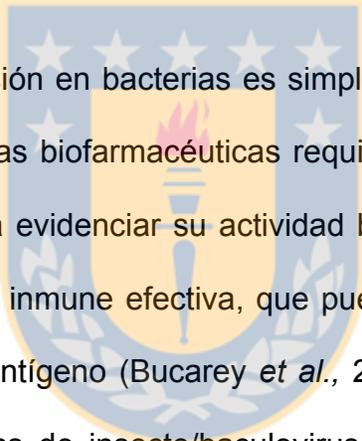
Se ha observado que el rol de la enfermedad subclínica pudo haber estado subestimado durante los últimos años. Esto se evidencia con los altos efectos benéficos de las vacunas contra PCV2, pues incluso las granjas que tenían escasos problemas relacionados con PMWS, han logrado un aumento significativo en su productividad desde el uso comercial de vacunas contra este virus (Kixmoller *et al.*, 2008; Pejsak *et al.*, 2010).



1.10.1.1 Vacunas recombinantes

La cápside es la proteína inmunogénica más importante del virus y es la que presenta los principales epítopes específicos de cada subtipo (Nawagitgul *et al.*, 2002); está compuesta por 233-234 aminoácidos, siendo la proteína estructural que está directamente relacionada con la replicación y patogenicidad del virus (Hu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018)). Teniendo en cuenta que el genoma de PCV2 tolera la inserción de por lo menos 27 aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína de la cápside (Beach *et al.*, 2011), se ha propuesto la

utilización de vacunas basadas en el genotipo de PCV2b debido a su alta y continua prevalencia en campo (Beach y Meng, 2012). Recientemente, los diferentes sistemas de expresión *in vitro* se han centrado en investigaciones para la producción de esta proteína como vacuna de subunidad inmunogénica de PCV2, incluyendo aquellas producidas con vectores bacterianos (*Escherichia coli*) y vacunas con vectores de virus recombinantes (baculovirus, virus de la pseudorabia) (Liu *et al.*, 2001; Ju *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2007).



Por su parte, la expresión en bacterias es simple y permite altos rendimientos, pero el uso de proteínas biofarmacéuticas requiere además de modificaciones postraduccionales para evidenciar su actividad biológica y estabilidad para así generar una respuesta inmune efectiva, que puede ser variable y determinada por la naturaleza del antígeno (Bucarey *et al.*, 2009). En contraste, el sistema de expresión en células de insecto/baculovirus es altamente efectivo para la expresión heteróloga de múltiples proteínas virales, favoreciendo su autoensamblaje a partículas tipo virus (Volpers *et al.*, 2004; Galarza *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2006). Todas estas vacunas son costosas, requieren bastante tiempo para su administración y sus modificaciones postraduccionales no ocurren de forma correcta en todo tipo de células (Toledo *et al.*, 2008).

1.10.1.2 Vacunas a partir de levaduras

Los sistemas de expresión en levaduras proporcionan un mecanismo alternativo para su expresión, siendo una de las células hospedero más comúnmente empleadas para la producción de proteínas heterólogas (Poutou *et al.*, 2005). Al ser eucariota, la levadura tiene varias ventajas como por ejemplo que las proteínas producidas tienden a ser procesadas con el plegamiento apropiado y las modificaciones químicas necesarias; incluso, hay varios reportes que confirman que la levadura es capaz de mantener el autoensamblaje de proteínas virales (Valenzuela *et al.*, 1982; Rossi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007; Farnos *et al.*, 2009). La proteína Cap de PCV2 derivada de levadura, se autoensambla en partículas tipo virus que son similares morfológica y antigénicamente a las partículas tipo virus derivadas de células de insecto (Bucarey *et al.*, 2009). Adicionalmente, los cultivos de levaduras son fáciles de mantener, lo cual hace que sea más rápido y el proceso menos costoso que otros sistemas eucariotas de expresión, tales como insectos o cultivos celulares de mamíferos (Bucarey *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2019).

Entre las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) han sido utilizadas como vehículos para entregar el antígeno PCV2 en ensayos preliminares enfocados en el desarrollo de un piloto de una vacuna oral (Bucarey *et al.*, 2009). Debido a que es un organismo no patogénico, no

invasivo y considerado seguro, es una herramienta llamativa para la entrega de antígenos y moléculas terapéuticas (Chen *et al.*, 2005; Garrait *et al.*, 2007).

1.10.1.3 *Pichia pastoris*

La levadura *P. pastoris* ha sido empleada como vehículo para la producción eficaz de más de 100 proteínas diferentes hasta la fecha (Cereghino y Cregg, 2000; Córdoba *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016). Es una célula eucariota capaz de llevar a cabo muchas de las modificaciones postraduccionales que realizan los eucariotas superiores; además, presenta reproducción sexual y tiene la ventaja de ser más estable en su estado vegetativo haploide, lo cual facilita la selección de características fenotípicas en los mutantes. Taxonómicamente, pertenece a la familia Saccharomycetaceae, orden Saccharomycetales, clase Saccharomycetes, filum Ascomycota, reino Fungi (Poutou *et al.*, 2005).

Entre las ventajas para la utilización de *P. pastoris* como vector de expresión se encuentran que: (i) el costo de los medios, equipo e infraestructura de los cultivos de las levaduras en general son mucho más económicos que los de las células de mamíferos e insectos, (ii) el sistema de expresión de proteínas diseñado es inducido por adición de metanol y generalmente es integrado al cromosoma de la levadura para ganar estabilidad en la construcción genética,

(iii) realiza modificaciones postraduccionales como procesamiento proteolítico, doblamiento, formación de puentes disulfuro y glicosilación, (iv) tienen la posibilidad de secretar de forma directa la proteína clonada lo que significa, en términos prácticos, un paso de pre-purificación y finalmente, (v) no produce endotoxinas y por lo mismo, se considera bastante seguro (Cregg *et al.*, 1993; Georgiou y Valax, 1996; Cereghino y Cregg, 2000; Córdoba *et al.*, 2003;).

Al ser descrita como una levadura metilotrófica, *P. pastoris* es capaz de utilizar el metanol como única fuente de energía, llegando a ser uno de los hospederos preferidos para la expresión de genes foráneos (Gellisen, 2000). Para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, normalmente se emplea entonces el esquema de tres fases en cultivos de alta densidad. En la primera fase, la levadura recombinante se cultiva en medios salinos suplementados con un azúcar no fermentable como el glicerol (cultivo discontinuo) y una vez que éste es consumido, se inicia la segunda fase de transición en la que se suministra glicerol, en cantidades que mantengan el crecimiento exponencial limitado por sustrato (Poutou *et al.*, 2005). En la tercera fase, generalmente se adiciona metanol en concentraciones limitadas, lo que resulta en la expresión de la proteína recombinante (Inan y Meagher, 2001). Así, la prioridad de utilización de las diferentes fuentes de carbono se da de la siguiente manera: glicerol > metanol (Lekcharoensuk *et al.*, 2004).

La levadura *P. pastoris* tiene dos genes alcohol oxidasa (*aox1* y *aox2*), que presentan un promotor fuerte inducible de manera postranscripcional con metanol, y reprimible con glucosa. Es posible entonces insertar el gen de la proteína de interés bajo el control del promotor *aox1* lo cual permite que los genes foráneos puedan ser mantenidos en un modo apagado o encendido y así inducir la producción de la proteína adicionando metanol. El metanol es oxidado, en presencia de oxígeno, por la enzima alcohol oxidasa produciendo formaldehído y peróxido de hidrógeno, pero este último es tóxico para la célula y por tanto es retenido en el peroxisoma hasta que la catalasa lo convierte en agua y oxígeno (Poutou *et al.*, 2005).

Dado que *P. pastoris* no presenta plásmidos nativos (Cregg *et al.*, 1987; Romanos *et al.*, 1992; Cregg *et al.*, 1993; Córdoba *et al.*, 2003), el uso de vectores, que contengan el gen *aox* y el gen que codifica para la proteína de interés, es útil para la recombinación homóloga con el genoma de la levadura. Además, se integra también el gen de histidina deshidrogenasa (*his4*) como marcador de selección y complementación autotrófica; de esta forma, se producen entonces mutantes diferentes dependiendo del sitio de integración (*aox1* o *his* respectivamente) (Clare *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 2000). El fenotipo Mut⁺ es el fenotipo nativo y le permite a las células crecer rápidamente en medio con metanol (Cregg *et al.*, 1985; Vedvick, 1991; Romanos *et al.*, 1992; Cregg *et al.*, 1993; Invitrogen, 1996;); el fenotipo Mut^s utiliza lentamente el

metanol por lo que tiene baja tasa de crecimiento, y Mut^- es aquél fenotipo que no crece en presencia de metanol (Cregg *et al.*, 1985; 1987). Así, cuando la levadura crece en glucosa, glicerol o etanol, no es posible detectar la alcohol oxidasa en la célula (Cregg *et al.*, 1987; 1989; Clare *et al.*, 1991; Cregg *et al.*, 1993); sin embargo, cuando crece en presencia de metanol, esta enzima llega a ser el 35% del total de la proteína total producida por la célula (Gellisen, 2000; Ellis *et al.*, 1998; Cregg *et al.*, 1989).

1.11 Impacto económico

Durante los primeros años de la epidemia con PCV2, se estimó los costos de la enfermedad en US\$57 millones por año en el Reino Unido, y alrededor de US\$760 y US\$1.200 millones a lo largo de la Unión Europea, con base en el número de cerdos muertos y no enviados a matadero (Armstrong y Bishop, 2004; Tucker, 2006). Es importante resaltar que estas estimaciones se hicieron solamente a nivel industrial durante el periodo de la epidemia, sin considerar las pérdidas y costos implicados por los animales que mantienen infecciones subclínicas. Según análisis económicos, se estima que en Europa el desmedro asociado a PCV2 causa pérdidas cercanas a los US\$ 650 millones por año (Segalés *et al.*, 2012).

Un modelo económico y epidemiológico asume que la infección por PCV2 en un cerdo puede llevar a presentar tres situaciones: signos clínicos típicos de PMWS, un crecimiento reducido pero sin evidencia de signos clínicos o un crecimiento normal sin presencia de signos clínicos. Se calcula que los cerdos infectados con PCV2 que desarrollan signos clínicos tienen una reducción considerable en su promedio de ganancia diaria de peso, comparado con los cerdos que no se encuentran infectados. Estos animales enfermos no son capaces de recuperarse debido a la reducción en su tasa de crecimiento y el consumo de alimento, retrasando su llegada a matadero porque requieren días extra en la granja para alcanzar el peso óptimo (Alarcon *et al.*, 2013). Con esta base, el impacto económico en Chile se asocia además a los altos costos de las vacunas por animal, lo que representa hasta un 50% de los costos de medicación asociado a la producción porcina, siendo una de las vacunas en cerdos más costosas del mercado.

1.12 Revisión bibliográfica

1. Alarcon, P., Velasova, M., Werling, D., Stark, K., Chang, Y., Nevel, A., Pfeiffer, D., Wieland, B. (2011). Assessment and quantification of post-weaning multi-systemic wasting syndrome severity at farm level. *Prev Vet Med.* 98: 19-28.
2. 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. *Prev Vet Med.* 110 (2): 88-102.
3. Allan, G., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., McNeilly, F., Ellis, J., Clark, E.G., Harding, J., Espuna, E., Botner, A., Charreyre, C. (1998). Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec.* 142: 467-468.
4. Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 121 (1): 1-11.
5. Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Botner, A., McCullough, K., Nauwynck, H., Kennedy, S., Meehan, B., Charreyre, C. (2004). PMWS: experimental model and co-infections. *Vet. Microbiol.* 98: 165-168.
6. Allan, G.M., McNeilly, F., McMenemy, M., McNair, I., Krakowka, S.G., Timmusk, S., Walls, D., Donnelly, M., Minahin, D., Ellis, J., Wallgren, P., Fossum, C. (2007). Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest.* 19 (6): 668-673.
7. Anon., GB. (2009). Surveillance Pig diseases quarterly report, Q1. Veterinary Laboratories Agency.

	Página	web:
http://www.defra.gov.uk/la/reports/docs/rep_survrep	qtlyp0109.pdf.	

 (Consultado el 12-12-2019).
8. Armstrong, D., Bishop, S.C. (2004). Does genetics or litters effect influence mortality in PMWS. In: Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Hamburg, Germany: 809.

9. Asprocer. 2019. Reporte anual de la Asociación gremial de productores de cerdos. Página web: www.asprocer.cl. (Consultado el 11-12-2019).
10. Beach, N., Meng, X. (2012) Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*. 164: 33-42.
11. Beach, N., Smith, S., Ramamoorthy, S., Meng, X. (2011). Chimeric porcine circoviruses (PCV) containing amino acid epitope tags in the C terminus of the capsid gene are infectious and elicit both anti-epitope tag antibodies and anti-PCV type 2 neutralizing antibodies in pigs. *J Virol*. 85 (9): 4591-4595.
12. Bielanski A., Larochelle, R., Magar, R. (2004). An attempt to render oocytes and embryos free from the porcine circovirus type 2 after experimental in vitro exposure. *Can J Vet Res*. 68: 222-225.
13. Blackman, M., Morris, A. (1985). The effect of interferon treatment of targets on the susceptibility to cytotoxic T lymphocyte killing: augmentation of allogeneic killing and virus-specific killing relative to viral antigen expression. *Immunology*. 56: 451-457.
14. Blackman, M., Yague, J., Kubo, R., Gay, D., Coleclough, C. (1986). The T cell repertoire may be biased in favor of MHC recognition. *Cell* 47:349-357.
15. Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordioli, P., Albina, E., Jestin, A. (2003). Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*. 21 (31): 4565-4575.
16. Bracci, L., Canini, I., Venditti, M., Spada, M., Puzelli, S., Donatelli, I., (2006). Type I IFN as a vaccine adjuvant for both systemic and mucosal vaccination against influenza virus. *Vaccine* 24:56-57.
17. Brockmeier, S., Lager, K., Grubman, M., Brough, D., ETTYREDDY, D., SACCO, R. (2009). Adenovirus-mediated expression of interferon- α delays viral replication and reduces disease signs in swine challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol*. 22. 173-180.
18. Brunborg, L., Moldal, T., Jonassen, C. (2004). Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic syndrome using a Taqman-based-real-time PCR. *J Virol Methods*. 122: 171-178.

19. Brunborg, I., Jonassen, C., Moldal, T., Bratberg, B. Lium, B., Koenen, F., Schonheit, J. (2007). Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J Vet Diagn Invest.* 19: 368-375.
20. Bucarey, S., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Saenz, L., Zuniga, A., Tobar, J. (2009). The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine.* 27 (42): 5781-5790.
21. Carman, S., Cai, H., DeLay, J., Youssef, S., McEwen, B., Gagnon, C.A., Tremblay, D., Hazlett, M., Lulis, P., Fairles, J., Alexander, H., Van Dreumel, T. (2008). The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease 2004-2006. *Can J Vet Res.* 72 (3): 259-268.
22. Cereghino, J., Cregg, J. (2000). Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 45-66.
23. Chae, C. (2012). Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *Vet J.* (194): 151-157.
24. Chae, J., Choi, K. (2010). Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from pigs in Republic of Korea. *Res Vet Sci.* 88 (2): 333-338.
25. Chen, L., Tourvielle, B., Burns, G., Mathieu-Mahual, D., Sasportes, M., Bensussan, A. (1986). Interferon: a cytotoxic T lymphocyte differentiation signal. *Eur J Immunol.* 16: 767-770.
26. Chen, F., Chen, X., Chen, Z., Jiang, H., Pan, X., Hu, Z. (2005). Construction and application of a yeast expression system for thymosin alpha1. *Biocell.* 29 (3): 253 -259.
27. Chen, X., Chen, J., Zhang, Y. (2016). Secreted expression of truncated capsid protein from porcine circovirus type 2 in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* 38: 959 - 967.
28. Chen, Y., Xu, Q., Chen, H., Luo, X., Wu, Q., Tan, C., Pan, Q., Chen, J. (2019). Evolution and genetic diversity of Porcine Circovirus 3 in China. *Viruses.* 11(9): 786.
29. Cheng, G., Zhao, X., Yan, W., Wang, W., Zuo, X., Huang, K. (2007). Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against

foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of in vivo immune response. *Vaccine* 25: 5199–5208.

30. Cheung, A. (2003). The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*. 313 (2): 452-459.
31. Cheung, A. (2007). A stem-loop structure, sequence non-specific, at the origin of DNA replication of porcine circovirus is essential for termination but not for initiation of rolling-circle DNA replication. *Virology*. 363 (1): 229-235.
32. Clare J., Rayment F., Ballnathine S., Sreekrishna K., Romanos, M. (1991). High-level expression of tetanus toxin fragment C and *Pichia pastoris* Systems containing multiplety tandem integrations of the Gene. *Bio Technol*. 9: 445-60.
33. Clark. E. (1996). Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc West Can Assoc Swine Prac*. 27: 19-20.
34. Clark, E. (1997). Post-weaning multisystemic syndrome. *Proc Annu Meet Am Asso Swine Prac*. 28: 499-501.
35. Cline, G., Wilt, V., Diaz, E., Edler, R. (2008). Efficacy of immunizing pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. *Vet Rec*. 163: 737-740.
36. Constants, M., Ssemadaali, Kolyvushko, O., Ramamoorthy, S. (2015). Antigenic determinants of possible vaccine escape by porcine circovirus subtype 2b viruses. *Bioinform Biol Insights*. 9 (2):1-12.
37. Córdoba H., Algecira N., Poutou R., Barrera L. (2003). *Pichia pastoris* una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. *Rev Col Biotecnol*. 5 (2): 73-84.
38. Cortey, M., Napp, S., Alba, A., Pileri, E., Grau-Roma, L., Sibila, M., Segalés, J. (2011a). Theoretical and experimental approaches to estimate the usefulness of pooled serum samples for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest*. 23: 233-240.
39. Cortey, M., Pileri, E., Sibila, M., Pujols, J., Balasch, M., Plana, J., Segales, J., (2011b). Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J*. 187 (3): 363–368.

40. Cregg, J., Barringer, K., Hessler, A., Madden, K. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol.* 5 (12): 3376-3385.
41. Cregg J., Tschopp J., Stillman C., Siegel R., Akong M., Craig W., Buckholz R., Madden K., Kellaris P., Davis G., Smiley B., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G., Thill, G. (1987). High-level expression and efficient assembly of Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio Technol.* 5: 479-485.
42. Cregg, J., Madden, K., Barringer K., Thill, G., Stillman, C. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 1989; 9 (3): 1316-1323.
43. Cregg J., Vedvick, T., Raschke, W. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio Technol.* 11: 905-910.
44. Darwich, L., Segalés, J., Mateu, E. (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch Virol.* 149 (5): 857-874.
45. Darwich, L., Pie, S., Rovira, A., Segalés, J., Domingo, M., Oswald, I.P., Mateu, E. (2003). Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* 84 (8): 2117–2125.
46. Darwich, L., Mateu, E. (2012) Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research.* 164: 61-67.
47. De Weerd, N., Samarajiwa, S., Hertzog, P. (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem.* 282: 20053-20057.
48. Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I., Lang, A., Viret, J. (2003). Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine.* 21: 678-683.
49. Done, S., Gresham, A., Potter, R., Chennells, D., (2001). PMWS and PDNS- two recently recognised diseases of pigs in the UK. *Practice.* 23: 14–21.
50. Drolet, R., Thubault, S., D’Allaire, S., Thomson, J., Done, S. (1999). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *J Swine Health Prod.* 7: 283-285.
51. Duan, J., Yang, D., Chen, L., Yu, Y.m Zhou, J.m Lu, H. (2019). Efficient production of porcine circovirus virus-like particles using the

nonconventional yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103(2): 833-842.

52. Dupont, K., Nielsen, E., Baekbo, P., Larsen, L. (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol.* 128: 56-64.
53. Ellis, J., Hassard, L., Clarck, E., Harding, J., Allan, G., Wilson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNelly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D. (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J.* 39: 44-51.
54. Fan, H., Ju, C., Tong, T., Huang, H., Lv, J., Chen, H. (2007). Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet Res Commun.* 31 (4):487-496.
55. Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmuller, A., Elbers, K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 26, 1488–1499.
56. Farnos O, Fernandez E, Chiong M, Parra F, Joglar M, Mendez L. (2009). Biochemical and structural characterization of RHDV capsid protein variants produced in *Pichia pastoris*: advantages for immunization strategies and vaccine implementation. *Antiviral Res.* 81(1): 25–36.
57. Finsterbusch, T., Mankertz, A. (2009). Porcine circoviruses - small but powerful. *Virus Res.* 143 (2): 177–183.
58. Firth, C., Charleston, M, Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E. (2009). Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J Virol.* 83: 12813-12821.
59. Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segalés, J., Mateu, E. (2007). Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) -affected and non PMWS affected pigs -. *Vet Microbiology.* 125: 244-255.
60. Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., Segalés, J., (2008). Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine.* 26, 1063–1071.
61. Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Mateu, E., Segalés, J. (2009). One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine

administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine*. 27 (30): 4031-4037.

62. Fraile, L., Grau-Roma, L., Sarasola, P., Sinovas, N., Nofrarias, M., Lopez-Jimenez, R., Lopez-Soria, S., Silbila, M., Segalés, J. (2012). Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameter. *Vaccine*. 30 (11): 1986-1992.
63. Franzo, G., Cortey, M., Segalés, J., Hughes, J., Drigo, M. (2016). Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. *Mol Phylogent Evolut*. 100: 269-280.
64. Gagnon, C., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M., Hpude, A., Elahi, S. (2007). The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J*. 48: 811-819.
65. Galarza, J., Latham, T., Cupo, A. (2005). Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol*. 18 (2): 365–372.
66. Garrait, G., Jarrige, J., Blanquet, S., Beyssac, E., Alric, M. (2007). Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a model cytochrome P450 in the rat digestive environment: viability and bioconversion activity. *Appl Environ Microbiol*. 73 (11): 3566-3574.
67. Ge, X., Wang, F., Guo, X., Yang, H. (2012). Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China. *Virus Res*. 164: 100–106.
68. Gellisen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *App Microbiol Biotechnol*. 54: 741-750.
69. Georgiou, G., Valax, P. (1996). Expression of Correctly Folded Proteins in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 7: 190-197.
70. Gerber, P., Garrocho, F., Lana, A., Lobato, Z. (2011). Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J*. 188: 240-242.
71. Grau-Roma, L., Hjulsager, C., Sibila, M., Kristensen, C., Lopez-Soria, S., Enoe, C., Casal, J., Botner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., Larsen, L. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from

post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol.* 135: 272-282.

72. Gilpin, D., McCullough, K., Meehan, B., McNeilly, F., McNair, I., Stevenson, L., Foster, J., Ellis, J., Krakowka, S., Adair, B., Allan, G. (2003). In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 94: 149-161.
73. Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J. (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J.* 187: 23–32.
74. Ha, Y., Lee, Y., Ahn, K., Kim, B., Chae, C. (2008). Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Vet Pathol.* 45: 842-848.
75. Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S., Orozco, B., Nagar, S., Robertson, D. (2000). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 35 (2): 105–140.
76. Harding, J., Clark, E., Strokappe, J., Willson, P., Ellis, J. (1998). Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *J Swine Health Prod.* 6: 249–254.
77. Harding, J., Clark, E. (1997) Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod.* 5: 201-203.
78. Harding, J. (2004). The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol.* 98: 131–135.
79. Harding, J. Baker, C., Tumber, A., McIntosh, K., Parker, S., Middleton, D., Hill, J., Ellis, J., Krakowka, S. (2008). Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest.* 20: 274-282.
80. Harms, P., Sorden, S., Halbur, P., Bolin, S., Lager, K., Morozov, I., Paul, P. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol.* 38: 528–539.
81. Hemann, M., Beach, N., Meng, X., Halbur, P., Opriessnig, T., (2012). Vaccination with inactivated or live-attenuated chimeric PCV1-2 results in

decreasing viremia in challenge-exposed pigs and may reduce transmission of PCV2. *Vet Microbiol.* 158: 180-186.

82. Horlen, K., Dritz, S., Nietfeld, J., Henry, S., Hesse, R., Oberst, R., Hays, M., Anderson, J., Raymond, R., Rowland, R. (2008). A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc.* 232: 906–912.
83. Hou, Z., Wang, H., Feng, Y., Song, M., Li, Q., Li, J. (2019). Genetic variation and phylogenetic analysis of Porcine circovirus type 2 in China from 2016 to 2018. *Acta Virol.* 63(4): 459-468.
84. Hu, G., Wang, N., Yu, W., Wang, Z., Zou, Y., Zhang, Y., Wang, A., Deng, Z., Yang, Y. (2016). Generation and immunogenicity of porcine circovirus type 2 chimeric virus-like particles displaying porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 epitope B. *Vaccine:* 34: 1896–1903.
85. Ilyina, T., Koonin, E. (1992). Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archae bacteria. *Nucleic Acids Res.* 20 (13): 3279–3285.
86. Inan, M., Meagher, M. (2001). The Effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *J Biosc Bioeng.* 92 (4): 337-341.
87. INE. 2019. Encuestas Intercensales agropecuarias 2017-2019. Instituto Nacional de Estadísticas. www.ine.cl (consultado el 11-12-2019).
88. Invitrogen. (1996). *Pichia* Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *P. pastoris*. Cat. No. K1710-01. 1996. California: Invitrogen.
89. Isaacs y Lindenmann. (1957). Virus interference, The Interferon. *Sci.* 147: 258-267
90. Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segalés, J., Baumgaertner, W. (2009) Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiology.* 138: 27-33.
91. Ju, C., Fan, H., Tan, Y., Liu, Z., Xi, X., Cao, S., Wu, B., Chen, H. (2005). Immunogenicity of a recombinant pseudo rabies virus expressing ORF1–ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 109 (3–4): 179–190.

92. Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 122 (1): 9–24.
93. Kim, J., Han, D., Choi, C., Chae, C. (2003). Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci.* 65: 741-744.
94. Kim, J., Jung, K., Chae, C. (2004). Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and still born piglets. *Vet Rec.* 155: 489-492.
95. Kim, S., Jeong, H., Park, S., Kim, H. (2007) Purification and immunogenicity study of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol Methods.* 139 (1): 24-30.
96. Kim, T., Toan, N., Seo, J., Jung, B., Lee, J., Lee, B. (2009). *Bordetella bronchiseptica* aroA mutant as a live vaccine vehicle for heterologous porcine circovirus type 2 major capsid protein expression. *Vet Microbiol.* 138:318-324.
97. Kim, D., Kim, C., Han, K., Seo, H., Oh, Y., Park, C., Kang, I., Chae, C. (2011). Comparative efficacy of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus 2 (PCV2) vaccines in pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* and PCV2. *Vaccine.* 29, 3206–3212.
98. Kixmoller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmuller, A., Elbers, K., Fachinger, V. (2008). Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine.* 26: 3443–3451.
99. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., Ohmura, T. (2000). High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng.* 89 (1): 55-61.
100. Koonin, E., Ilyina, T. (1992). Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *J Gen Virol.* 73: 2763–2766.
101. Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G. (2000). Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of

postweaning multi systemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by co-infection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol.* 37 (3): 254–263.

102. Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D., Allan, G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol.* 38 (1):31-42.
103. Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Meehan, B., Oglesbee, M., Alldinger, S., Allan, G. (2004). Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of porcine circovirus-2-associated postweaning multi systemic wasting disease. *Vet Pathol.* 41: 471-481.
104. Ku, X., Chen, F., Chen, P., Li, Y., Wang, X., Yu, S. (2017). Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound Emerg Dis.* 64 (3): 703-708.
105. Kurmann, J., Sydler, T., Brugnera, E., Buergi, E., Haessig, M., Suter, M., Sidler, X. (2011). Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clin Vaccine Immunol.* 18: 1644–1649.
106. Ladekjaer-Mikkelsen, A., Nielsen, J., Stadejek, T., Storgaard, T., Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Allan, G., Bøtner, A. (2002). Reproduction of post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and nonimmunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* 89 (2): 97–114.
107. Lakshman, G., McIntosh, K., Parker, S., Harding, J., Krakowka, S., Ellis, J. (2012). Efficacy of parenteral vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in seropositive piglets. *The Can J Vet Res.* 76: 301-307.
108. Lauterslager, T., Stok, W., Hilgers, L. (2003). Improvement of the systemic prime/oral boost strategy for systemic and local responses. *Vaccine.* 21 (13): 1391-1399.
109. Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W., Meng, X. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol.* 78 (15): 8135-8145.

110. Lipej, Z., Segales, J., Toplak, I., Sostaric, B., Roic, B., Lojkic, M., Hostnik, P., Grom, J., Barlic-Maganja, D., Zarkovic, K., Oraic, D. (2005). Post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Croatia: detection and characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Acta Vet Hung.* 53 (3): 385-396.
111. López-Soria, S. y Segalés, J. (2013). Circovirus porcino tipo 2. Página web: <http://virusberriosteche garay.blogspot.com/2013/09/circovirus-tipo-2-3-s-lopez-soria-y-j.html>. (Consultado el 12-12-2019).
112. Liu, Q., Wang, L., Willson, P., Babiuk, A. (2000). Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with post weaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 38: 3474–3477.
113. Liu, Q., Willson, P., Attoh-Poku, S., Babiuk, L. (2001). Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Express Purif.* 21 (1): 115–120.
114. Liu, J., Chen, I., Kwang, J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2 infected cells and its role in virus induced apoptosis. *J Virol.* 79 (13): 8262–8274.
115. Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J. (2006). The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J Virol.* 80 (10): 5065–5073.
116. Liu, I., Fan, W., Zhang, H., Zhang, S., Cui, L., Wang, M., Bai, L., Yang, W., Sun, L., Yang, L., Liu, W., Li, J. (2019). Interferon as a mucosal adjuvant for an influenza vaccine in pigs. *Virologica Sinica.* 34:324–333.
117. Lyoo, K., Joo, H., Caldwell, B., Kim, H., Davies, P.R., Torrison, J. (2011). Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. *Vet J.* 189: 58-62.
118. Madec F., N. Rose, B. Grasland, R. Cariolet, A. Jestin A. (2008). Post-weaning multi systemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12 year experience. *Transbound Emerg Dis.* 55 (7): 273-283.
119. Madson, D., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X., Halbur, P., Opriessnig, T. (2008). Characterization of shedding patterns of porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. *J Vet Diagn Invest.* 20: 725–734.

120. Madson, D., Patterson, A., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X., Opriessnig, T. (2009). Effect of natural or vaccine induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. *Theriogenology*. 72 (6): 747–754.
121. Madson, D., Opriessnig, T. (2011). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostic and vaccination. *Anim Health Res Rev*. 12: 47-65.
122. Magar, R., Larochele, R., Thibault, S., Lamontagne, L. (2000). Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J Comp Pathol*. 123 (4): 258–269.
123. Mankertz, A., Mankertz, J., Wolf, K., Buhk, H. (1998). Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol*. 79 (2): 381-384.
124. Mankertz, A., Hillenbrand, B. (2001). Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology*. 279 (2): 429–438.
125. Mankertz, A., Mueller, B., Steinfeldt, T., Schmitt, C., Finsterbusch, T. (2003). New reporter gene-based replication assay reveals exchange ability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *J Virol*. 77 (18): 9885–9893.
126. Mateusen, B., Maes, D., Van Soom, A., Lefebvre, D., Nauwynck, H. (2007). Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology*. 68: 896-901.
127. McKeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P., Meng, X. (2005). Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 12 (11): 1347–1351.
128. Meehan, B., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V., Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Haines, D., Allan, G. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol*. 79: 2171–2179.
129. Nauwynck, H., Sanchez, R., Meerts, P., Lefebvre, D., Saha, D., Huang, L., Misinzo, G. (2012). Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res*. 164: 43–45.

130. Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S., Harms, P., Sorden, S., Paul, P. (2000). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol.* 81 (9): 2281–2287.
131. Nawagitgul, P., Harms, P., Morozov, I., Thacker, B., Sorden, S., Lekchorensuk, C., Paul, P. (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2) based enzyme linked immune sorbent assay for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 33–40.
132. Nayar, G., Hamel, A., Lin, L. (1997). Detection and characterization of porcine circovirus associated with post weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J.* 38: 385–386.
133. O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E., Konoby, C., Allan, G., Ellisa, J. (2001). Multiple porcine circovirus 2 associated abortions and reproductive failure in a multisites wine production unit. *Can Vet J.* 42: 551-553.
134. Ogra, P., Faden, H., Welliver, R. (2001). Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin Microbiol Rev.* 14 (2): 430-445.
135. Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Domingo, M. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in post weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods.* 117: 75–80.
136. Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J. (2007). Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology.* 357: 175-185.
137. Opriessnig, T., Yu, S., Thacker, E., Halbur, P. (2004). Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *J Swine Health Prod.* 12: 186-191.
138. Opriessnig, T., Meng, X., Halbur, P.G. (2007). Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest.* 19 (6): 591–615.
139. Opriessnig, T., Patterson, A., Elsener, J., Meng, X., Halbur, P. (2008). Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2

(PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clin Vaccine Immunol.* 15: 397–401.

140. Opriessnig, T., Patterson, A., Madson, D., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J., Juhan, N., Meng, X., Halbur, P. (2009). Difference in severity of porcine circovirus type 2 (PCV2) induced pathological lesions between Landrace and Pietra in pigs. *J Anim Sci.* 87: 1582-1590.
141. Opriessnig, T., Patterson, A., Madson, D., Pal, N., Ramamorthy, S., Meng, X., Halbur, P. (2010). Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol.* 142: 177-183.
142. Ostanello, F., Caprioli, A., Di Francesco, A., Battilani, M., Sala, G., Sarli, G., Mandrioli, L., McNeilly, F., Allan, G.M., Prosperi, S. (2005). Experimental infection of 3-week old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol.* 108 (3): 179–186.
143. Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, F., Yuan, R., Guo, Y., Fang. (2016). A Novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol.* 91(1): 1879-1816.
144. Patterson, A., Ramamoorthy, S., Madson, D.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T. (2011). Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Vet Microbiol.* 149: 91-98.
145. Pejsak, Z., Podgórska, K., Truszczyn, M., Karbowski, P., Stadejek, T. (2010). Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33: e1-e5.
146. Pérez, L., de Arce, H., Cortey, M., Dominguez, P., Percedo, M., Perera, C., Tarradas, J., Frias, M., Segalés, J., Ganges, L., Nunez, J. (2011). Phylogenetic networks to study the origin and evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Cuba. *Vet. Microbiol.* 151: 245–254.
147. Pestka, S., Langer, J., Zoon, K., Samuel, C. (1987). Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem.* 56: 727-777.

148. Poutou, R., Quevedo, B., Córdoba, H., Saenz, H., Barrera, L. (2005). Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA*. 3: 75-87.
149. Rodríguez-Arrijoja, G., Segalés, J., Rosell, C., Rovira, A., Pujols, J., Plana-Duran, J., Domingo, M. (2003). Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 50: 99–101.
150. Rodríguez-Cariño, C., Segales, J. (2009). Ultrastructural findings in lymph nodes from pigs suffering from naturally occurring post weaning multi systemic wasting syndrome. *Vet Pathol*. 46: 729-735.
151. Romanos, M., Scorer, C., Claret, J. (1992). Foreign Gene Expression in yeast: A review. *Yeast*. 8: 423-488.
152. Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*. 164: 78–89.
153. Rosell, C., Segalés, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrijoja, G., Kennedy, S., Allan, G., McNeilly, F., Latimer, K., Domingo, M. (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol*. 120: 59-78.
154. Rossi, J., Gissmann, L., Jansen, K., Muller, M. (2000). Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Gene Ther*. 11 (8): 1165–1176.
155. Roth, J. (1999). The immune system. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Iowa. pp. 799–820.
156. Sánchez, R., Meerts, P., Nauwynck, H., Ellis, J., Pensaert, M. (2004). Characteristics of porcine circovirus-2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. *J Vet Diagn Invest*. 16: 175-185.
157. Savic, B., Milicevic, V., Radanovic, O., Zdravkovic, N., Stevancevic, O., Kureljusic, B., Nestic, K. (2019). Identification and genetic characterization of porcine circovirus 3 on pig farms in Serbia. *Arch Virol*. En impresión.

158. Segalés, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., Del Pozo, M., Noval, R., Sacristan, C., De las Heras, A., Ferro, A., Latimer, S. (1997). First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec.* 141 (23): 600-601.
159. Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu-de-Antonio, E., Espuna, E., Domingo, M. (1998). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec.* 142: 483–486.
160. Segalés, J., Alonso, F., Rossel, F., Pastor, J., Chianini, F., Campos, E., López-Fuenrtas, L., Quintana, J., Rodríguez-Arriola, G., Calsamiglia, M., Pujols, J., Domínguez, J., Domingo, M. (2001). Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigas with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunop.* 81: 37-44.
161. Segalés, J., Domingo, M. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q.* 24: 109–124.
162. Segalés, J., Calsamiglia, M., Domingo, M. (2003). How we diagnose post weaning multisystemic wasting syndrome. *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Rome.
163. Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M. (2004). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 98 (2): 137–149.
164. Segalés, J., Allan, G., Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res Rev.* 6: 119–142.
165. Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164: 10-19.
166. Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol.* 165 (1): 13-20.
167. Shen, H., Beach, N., Huang, Y., Halbur, P., Meng, X., Opriessnig, T. (2010). Comparison of commercial and experimental porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines using a triple challenge with PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and porcine parvovirus (PPV). *Vaccine.* 28: 5960–5966.

168. Shen, H., X. Liu, P. Zhang, L. Wang, Y. Liu, L. (2017). Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China. *Transbound Emerg Dis.* 64: 703–708.
169. Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y., Kadota, K. (2000). Porcine Circovirus Induces B Lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Sci.* 62 (11): 1125-1131.
170. Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., Hidejima, I. (2003). PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci.* 65: 405–408.
171. Silva, J., Coimbra, E., Jesus, A., Mariz, F., Silva, K., Lobato, Z., Coutinho, L., Castro, R., Freitas, A. (2014). Secretory expression of Porcine Circovirus type 2 capsid protein in *Pichia pastoris*. *J Virol Methods.* 207_226-231.
172. Singh, E., Thomas, F. (1987). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IX. The in vitro exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to swine vesicular disease virus. *Theriogenology.* 27: 443-449.
173. Sorden, S. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemicwasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 8: 133–136.
174. Steiner, E., Balmelli, C., Cincint, E., Summerfield, A., McCullough, K. (2007). Multipotent cell targeting by PCV2. *J Virol.*
175. Stenger, D., Revington, G., Stevenson, M., Bisaro, D. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 88 (18): 8029–8033.
176. Stevenson, G., Kiupel, M., Mittal, M., Kanitz, C. (1999). Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol.* 36 (5): 368-378.
177. Stringfellow, D. (1986). Measurement of hyporesponsiveness to interferon and interferon induction with prostaglandins. *Methods Enzymol.* 119: 707-712.

178. Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 295: 64-66.
179. Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G. (1974). Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*. 226: 153-167.
180. Toledo, J., Sánchez, O., Montesino, R., Farnos, O., Rodríguez, M., Alfonso, P., Oramasa, N., Rodríguez, E., Santana, E., Vega, R., Ganges, L., Frias, M., Cremata, J., Barrera, M. (2008). Highly protective E2–CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *J Biotechnol*. 133: 370–376.
181. Toledo, R., Barrera, M., Farnós, O., Gómez, S., Rodríguez, M., Agüero, F., Ormazabal, V., Parra, N., Suárez, L., Sánchez, O. (2010). Human α FN co-formulated with milk derived E2-CSFV protein induce early full protection in vaccinated pigs. *Vaccine* 28: 7907–7914
182. Tomás, A., Fernández, L., Valero, O., Segalés, J. (2008). A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol*. 132: 260–273.
183. Tucker, A.W. (2006). Porcine multi-systemic wasting syndrome (PMWS): a review. Página web: <http://www.thepigsite.com/pigjournal/articles/1630/porcine-multisystemic-wasting-syndrome-mws-a-review> (Consultado el 12.12.2019).
184. Tucker, D. (2009). Porcine multi-systemic wasting syndrome (PMWS): a review. *Veterinary Public Health and Pig Medicine*. University of Cambridge UK and MeritxellDonadeu, PIC Europe.
185. Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W., Ammerer, G., Hall, B. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 298: 347–350.
186. Vedvick, T. (1991). Gene Expression in yeast: *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotech*. 2: 742-745.
187. VICEK, J., SEN, G. (1996). Interferons and other cytokines. *Fields' Virology*, 3rd ed. Lippincott–Raven Publishers, Philadelphia. 13: 375–400.
188. Vidigal, P., Mafra, C., Silva, F., Fietto, J., Silva, A., Almeida, M. (2012). Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical

approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Res.* 163: 320–327.

189. Villarreal, L., Defilippis, V., Gottlieb, K. (2000). Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology.* 272: 1–6.
190. Vincent, I., Carrasco, C., Herrmann, B., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K. (2003). Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol.* 77 (24): 13288–13300.
191. Vincent, I., Carrasco, C., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K. (2005). Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115 (3): 388–398.
192. Vincent, I., Balmelli, C., Meehan, B., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C. (2007). Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology.* 120 (1): 47–56.
193. Volpers, C., Schirmacher, P., Streeck, R., Sapp, M. (2004). Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology.* 1994 (2): 504–12.
194. Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H. (2009). Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145 (1): 151–156.
195. Wang, T., Du, Q., Wu, X., Niu, Y., Guan, L., Wang, Z., Zhao, X., Liu, S. (2018). Porcine MKRN1 modulates the replication and pathogenesis of porcine circovirus Type 2 by inducing capsid protein ubiquitination and degradation. *J Virol.* 92: e100-e118.
196. West, K., Bystrom, J., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G., Haines, D., Clark, E., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J. (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest.* 11: 530-532.
197. Wiederkehr, D., Sydler, T., Buergi, E., Haessig, M., Zimmermann, D., Pospischil, A., Brugnera, E., Sidler, X. (2009). A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Vet Microbiol.* 136 (1): 27-35.

198. Wong, G., Clark, I., Harris, A., Schrader, J. (1984). Effect of cloned interferon-gamma on expression of H-2 and Ia antigens on cell lines of hemopoietic, lymphoid, epithelial, fibroblastic and neuronal origin. *Eur J Immunol.* 14: 52-56.
199. Wozniak, A., Milek, D., Matyba, P., Stadejek, T. (2019). Real-Time PCR Detection Patterns of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) in Polish Farms with Different Statuses of Vaccination against PCV2. *Viruses.* 11 (12): 1112-1135.
200. Yang, S., Yin, S., Shang, Y., Liu, B., Yuan, L., Zafar Khan, M.U., Liu, X. and Cai, J. (2018). Phylogenetic and genetic variation analyses of porcine circovirus type 2 isolated from China. *Transbound Emerg Dis.* 65: e383-e392.
201. Ye, L., Lin, J., Sun, Y., Bennouna, S., Lo, M., Wu, Q. (2006). Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology.* 351 (2): 260–270.
202. Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G., Thacker, E. (2007a). Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 115 (3): 261–272.
203. Yu, S., Vincent, A., Opriessnig, T., Carpenter, S., Kitikoon, P., Halbur, P.G., Thacker, E. (2007b). Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet Microbiol.* 123 (1): 34–42.
204. Yu, H., Qu, M., Zhang, J., Gan, L., Zhao, Y., Zhou, W., Xia, B., Chen, J., Wang, M., Zhao, J. (2019). Recombinant Porcine Interferon Alpha Enhances Immune Responses to Killed Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccine in Pigs. *Viral Immunol.* 32. 383-392.
205. Zhang, H., Hu, W., Li, J., Liu, T., Opriessnig, T., Zhou, J., Xiao, C. (2019). Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis*

CAPITULO II

**PREPARACIÓN DE UN PROTOTIPO VACUNAL, A PARTIR DE LA
EXPRESIÓN DE UN DOMINIO ANTIGÉNICO DE CIRCOVIRUS PORCINO**

TIPO 2, EN CLONES DE *Pichia pastoris*



2.1 Introducción

El Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) es un virus icosaédrico no envuelto, con una cadena de ADN simple y circular de 1,76 -1,77 kb (Tischer *et al.*, 1982), cuyos marcos abiertos de lectura ambisentido ORF1 y ORF2 codifican para las proteínas de replicación (Rep y Rep') y para la proteína estructural de la cápside (Cap), respectivamente. La cápside de PCV2 se une al receptor de la célula del hospedero (Mahe *et al.*, 2000; Lekcharoensuk *et al.*, 2004; Khayat *et al.*, 2011;) y se ha descrito como la principal proteína en inducir una respuesta humoral y celular efectiva (Mahe *et al.*, 2000; Blanchard *et al.*, 2003); por consiguiente, ha sido blanco para el desarrollo de vacunas comerciales contra este virus (Huang *et al.*, 2011; Nawagitgul *et al.*, 2002; y Patterson *et al.*, 2011).

Autores como Marcekova *et al.*, (2009), Fan *et al.*, (2007) y Bucarey *et al.* (2009) han publicado resultados con respecto a la producción de proteínas de PCV2 usando sistemas de expresión como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Lactobacillus* (Tseng *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020) y baculovirus; sistemas que sin embargo, presentan desventajas. En *E.coli*, por ejemplo, ocurre un plegamiento incorrecto de proteínas además de una contaminación con exotoxinas bacterianas; mientras que en baculovirus, aunque tiene un mejor

plegamiento de proteínas, no tiene un alto rendimiento y sus costos son muy elevados.

Por su parte, el sistema de producción de proteínas en levaduras ha sido de gran interés porque ofrece altas tasas de crecimiento a bajos costos, es de fácil manipulación genética y tiene la capacidad de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales como glicosilación, formación de enlaces disulfuro y plegamiento de proteínas; adicionalmente, secreta bajos niveles de proteínas endógenas por lo que es útil para secretar al medio proteínas recombinantes, generando integraciones génicas estables. Entre las levaduras, *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ha sido utilizada consistentemente para la expresión de proteínas heterólogas (Silva *et al.*, 2014). Este sistema ofrece varias ventajas: i) fácil manipulación genética, (ii) el uso de un promotor fuerte derivado del gen de alcohol oxidasa (AOX) 1, (ii) la capacidad de las células de ser cultivadas en altas densidades con altos niveles de producción de las proteínas de interés, tanto intra como extracelularmente, y (iii) la posibilidad de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales en las proteínas recombinantes, similares a las llevadas a cabo en los organismos eucariontes superiores (glicosilación, puentes disulfuro y procesado proteolítico) para generar un plegamiento correcto de la proteína (Silva *et al.*, 2014).

Con esta base, en esta tesis se utilizó la levadura *P. pastoris* para la producción paralela de tres proteínas de interés (la cápside de PCV2 como control positivo, las quimeras en estudio y el interferón (INF) alfa (α) porcino como inmunopotenciador). La proteína Cap se caracteriza por ser dominante para la inmunogenicidad del virus (Mahé *et al.*, 2000), mientras que los INF son considerados como una familia de citoquinas que dentro de sus funciones biológicas se destaca la actividad antiviral, actividad antitumoral y efectos inmunopotenciadores mediante su unión a receptores en la superficie de las células infectadas, activando diferentes vías de señalización. Adicionalmente, el uso de interferones se ha evidenciado como una herramienta efectiva para ser utilizada frente a infecciones virales en mamíferos (Gresser *et al.* 1975; 1976; Virelizier y Gresser, 1978), específicamente en cerdos, se ha demostrado una síntesis intensa de interferón tipo I (LaBonnardii y Laude, 1981) posterior a las infecciones virales que despierta interés para ser utilizado dentro de una propuesta de formulación vacunal.

Teniendo en consideración la antigenicidad de Cap y la capacidad de IFN α para aumentar su potencia inmune, y a partir del trabajo adelantado que no hace parte de esta tesis (generación de quimeras), en este capítulo se plantea el desarrollo de un prototipo de vacuna contra PCV2 mediante la expresión de proteínas en la levadura *P. pastoris*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Evaluar la producción recombinante del antígeno Cap intracelular y la secreción al medio de IFN α , expresados en clones de *P. pastoris*.

2.2.2 Preparar una formulación vacunal utilizando las proteínas de interés y un adyuvante comercial.

2.3 Antecedentes técnicos

Se caracterizó genéticamente un aislado de PCV2 obtenido desde cerdos con signos característicos de un brote de PMWS asociado a altas mortalidades ocurridas en el año 2007, en una empresa productora porcina ubicada en la sexta región de Chile. Posteriormente, se generó un vector dual que contuviera dos *cassettes* de expresión para los genes Cap de PCV2 e IFN α porcino. Este vector se diseñó manteniendo estos genes bajo el control de promotores idénticos al del gen de la enzima AOX1, para garantizar una expresión similar de ambos genes. Además, se generaron otros 3 vectores que contuvieran variantes moleculares de *cap*; estos vectores fueron denominados en esta tesis como quimera 1 (Q1), quimera 2 (Q2) y quimera 3 (Q3).

Según lo expuesto, esta tesis se inicia con los 3 vectores generados previamente, en estudios que no forman parte de esta tesis, correspondientes a cada quimera (Q1, Q2 y Q3).

2.4 Materiales y métodos

Los experimentos correspondientes de este capítulo se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad de Concepción, campus Concepción.

2.4.1 Diseño experimental

Se trabajó con 4 grupos, cada uno con 20 cepas de *P. pastoris* MP36. En los primeros 3 grupos habían cepas transformadas con uno de los vectores (Q1, Q2 o Q3); mientras que el último grupo correspondió al control positivo, según se muestra en la figura 2.1. Posteriormente, se seleccionó el clon con mayor expresión de las proteínas de interés: quimera e interferón alfa (INF α).

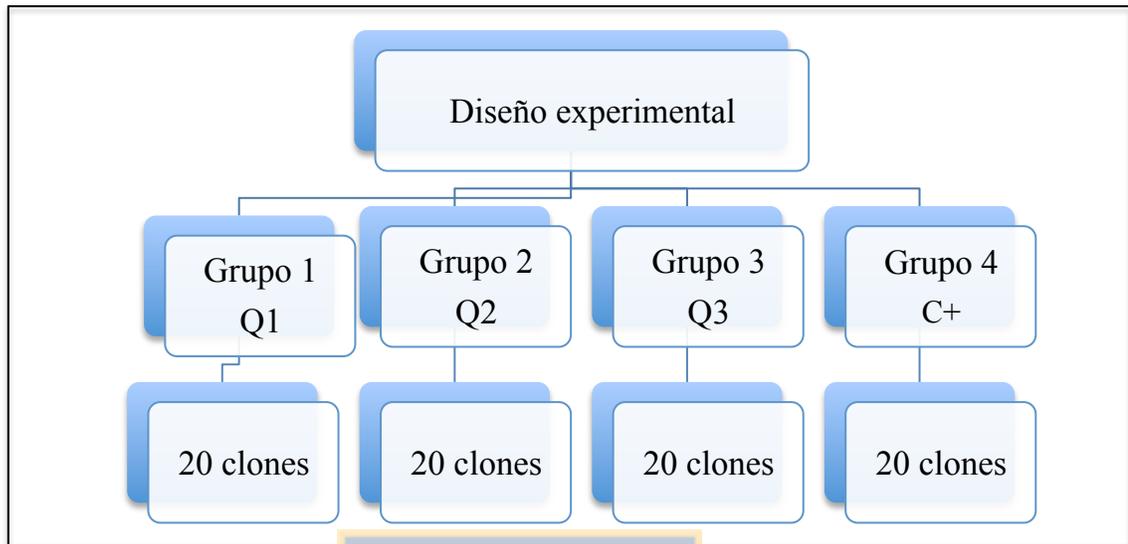


Figura 2.1 Descripción del diseño experimental, indicando los grupos con sus respectivos tratamientos y el número de clones en cada uno de ellos (n=80). Grupos 1 al 3 corresponden a diferentes quimeras (Q) expresadas en *P.pastoris* y el grupo 4 corresponde al control positivo (C+), transformado con el plásmido que contiene el gen que codifica las proteínas Cap e INF α . Fuente: Elaboración propia

Según este esquema, el diseño experimental se basó entonces, en el análisis de los clones transformados de *P. pastoris*. Los clones que insertaron el gen del *infa* porcino, se clasificaron con la técnica *Dot blot* de ADN para detectar posteriormente, mediante la técnica *Southern blot*, la presencia de la región codificante correspondiente a cada quimera y a la proteína Cap nativa de PCV2. De esta forma se determinaron cuáles eran los clones que habían integrado el gen exitosamente. Una vez seleccionados los clones, se realizó una fermentación a mayor escala, para obtener así una mayor producción de las proteínas de interés y, a partir de ellas, preparar la emulsión vacunal.

2.4.2 Transformación

En la figura 2.2 se muestran los esquemas de diseño de los cuatro vectores de transformación con los que se trabajó, los cuales contenían dos *cassettes* de expresión: uno para el gen de la proteína Cap del PCV2 y otro para el IFN α , ambos bajo el promotor de la enzima AOX1; además de dos genes de selección: *his* y *kanR*.

Cada una de estas 4 construcciones genéticas se transformó en la cepa MP36 de la levadura *P. pastoris* y los clones obtenidos fueron seleccionados mediante crecimiento en medio mínimo sin histidina. La constitución genética de cada uno de los clones fue analizada mediante técnicas de *Dot-blot* de ADN, hibridando con sondas específicas para los dos genes de interés. Las colonias positivas de cada clon fueron analizadas posteriormente mediante *Southern-blot* para determinar el patrón de integración. Con base en la característica de múltiple integración de los genes, se seleccionó el clon que entregó niveles superiores de producción de estas proteínas.

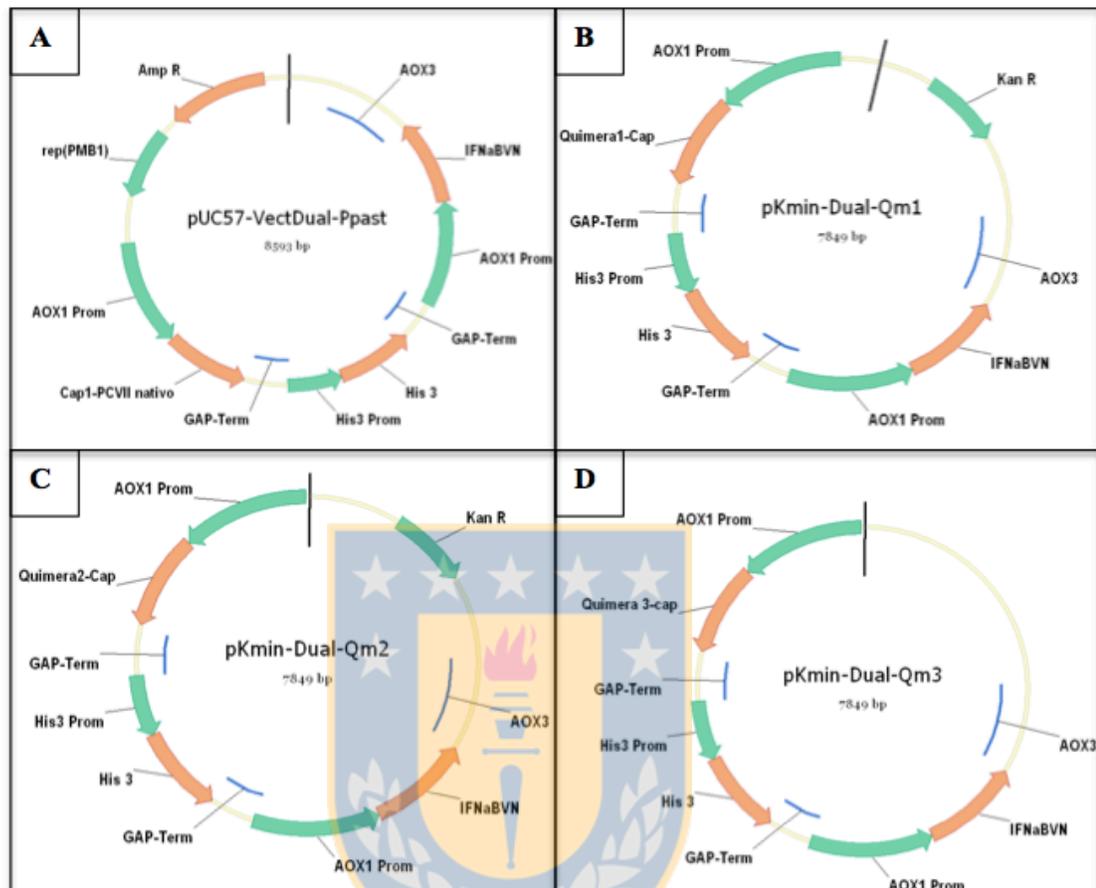


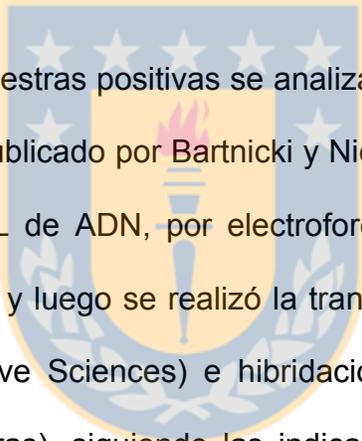
Figura 2.2 Representación esquemática de los vectores utilizados para la transformación y expresión conjunta de proteínas. En color verde se detallan los promotores y en color naranja las proteínas a expresar en cada fragmento. A. Inserción de Cap-PCV2 e INF α . B. Inserción de Q1 e INF α . C. Inserción de Q2 e INF α . D. Inserción de Q3 e INF α . Fuente: Elaboración propia

La integración genética estable en las cepas de *P. pastoris* MP36 (*his⁻*) (Yong *et al.*, 1992) transformadas, se corroboró mediante técnicas de análisis de ADN (*Southern* y *Dot blot*) y posteriormente se evaluó la expresión de la proteína (*Western blot*). Se tomaron 4 grupos de 20 clones cada uno, correspondientes a las 3 quimeras utilizadas y el grupo control, transformado con el plásmido que

contenía el gen que codifica para la proteína Cap nativa de PCV2. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo estándar del fabricante.

Para la técnica de *Dot blot* se tomaron 10 µg/µL de cada muestra y se desnaturalizaron en una solución de NaOH 0,3M a 65°C por 1 h, mantenida después en hielo con 1 volumen de la solución SSC 20x (3M NaCl, 0,3M Citrato de Na) enfriada previamente. Con ayuda del equipo para *Dot blot*, cada muestra se depositó en espacios circulares sobre una membrana Hybond N+ (GE Healthcare Live Sciences), aspirada al vacío; la cual se secó posteriormente a 80°C por 10 min y se fijó finalmente con luz UV por 5 min. Se realizó un bloqueo de sitios no específicos, sobre la membrana, mediante una incubación con búfer de hibridación (NaCl 0,5M; Reagente de bloqueo 4% p/v) (Abcam) por 15 min a 55°C. El fragmento de ADN utilizado como sonda para la detección de los genes de interés (*cap*, *infa* y *aox1*) se marcó previamente con fosfatasa alcalina según recomendaciones del fabricante del kit Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare Live Sciences). Para la hibridación, se incubó con 10 ng/mL de sonda en horno a 55°C durante 16 h. Pasado este tiempo, se utilizó búfer primario (Urea 2M; SDS 0,1% p/v; NaH₂PO₄*H₂O 0,5M pH 7,0; NaCl 150mM; MgCl₂ 1M; Reagente de bloqueo 4% p/v) para realizar 2 lavados de la membrana, de 10 min cada uno a 55°C; se realizaron luego dos lavados posteriores de 5 min a temperatura ambiente, con

búfer secundario (Tris base 1M; NaCl 2M; pH10) en dilución 1:20 (MgCl₂ 2mM). Finalmente, la detección de señal se obtuvo mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Prime). Se utilizó un control positivo (plásmido utilizado para la transformación) y dos controles negativos (cepa MP36 sin transformar y cepa MP36 transformada con el plásmido pero sin el gen de interés) (Yong *et al.*, 1992). Se consideraron positivas entonces, las muestras cuya señal fue más intensa que la de los controles negativos.



Posteriormente, las muestras positivas se analizaron por la técnica de *Southern blot* según protocolo publicado por Bartnicki y Nickerson *et al.* (1962). Para ello, se separaron 10 µg/µL de ADN, por electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 50 min a 60 V y luego se realizó la transferencia a membrana Hybond N+ (GE Healthcare Live Sciences) e hibridación con sonda para el gen de interés (INFα y quimeras), siguiendo las indicaciones de GE Healthcare Live Science, descritas anteriormente. La detección final de la señal se obtuvo mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Prime). Para estos ensayos se utilizó un control positivo (plásmido utilizado para la transformación) y dos controles negativos (cepa MP36 sin transformar y cepa MP36 transformada con el plásmido pero sin el gen de interés) (Yong *et al.*, 1992). Se consideraron positivas las muestras cuya señal, a la altura de la banda de interés, fue más intensa que la de los controles negativos. De esta forma, se seleccionó el clon que, efectivamente, insertó y expresó exitosamente el gen.

2.4.3 Cultivo discontinuo

Una vez seleccionado este clon, se llevó a cabo su producción en cultivo *batch* o discontinuo, así como de los clones Cap (control positivo) y MP36 (control negativo). Estas cepas se sembraron en caldo de cultivo YPG (extracto de levadura 0.3 %; peptona 1 %; glucosa 2 %; H₂O; pH 4.5 (Bartnicki y Nickerson, 1962) durante 24 h con agitación orbital (10 x g) a 28°C, en volúmenes de 100 mL. Para esto, se inició el cultivo a partir de inóculos correspondientes a los clones seleccionados y crecidos previamente durante 16 h a 30°C en 10 mL de caldo YPG, agregando posteriormente 100 µL de este cultivo a un volumen final de 100 mL de caldo. Se dejó crecer en cultivo discontinuo durante 24 h con agitación orbital (10 x g) a 30°C, hasta el agotamiento del glicerol y posteriormente se inició la fase de inducción de la expresión génica, adicionando 1 % de metanol al medio de cultivo garantizando la activación del promotor *aox1* y, por consiguiente, la expresión del gen de interés, según técnica descrita por Cos *et al.* (2006). Se realizaron análisis en cultivos previos en volúmenes de 500 mL de medio YP + Glicerol 2%, dejando crecer los cultivos hasta una DO de 1,3 a 1,5; valores que fueron tomados como referencia para comenzar la inducción con metanol al 1 % cada 12 horas durante 3 días. Así, durante 72 h se mantuvieron los mismos niveles de metanol y las mismas condiciones de crecimiento. Posteriormente, se realizó la

separación del medio de cultivo y el precipitado celular, centrifugando a 7.600 x g por 10 min.

Para la obtención de la citoquina, se tuvo en cuenta que según el diseño de clonamiento, la citoquina es secretada al medio de cultivo, por lo que fue necesario un paso previo de precipitación del medio de cultivo con TCA 10 % (Ácido Tricloroacético) para después realizar análisis por medio de *Western Blot*. Por otra parte, y teniendo en cuenta que tanto el antígeno Cap como la quimera seleccionada, son sintetizados y retenidos en el interior de las células, se realizaron ensayos con diferentes procedimientos de extracción y solubilización de las proteínas para comprobar su expresión, en donde finalmente los mejores resultados se obtuvieron utilizando un único búfer para la ruptura y posterior extracción (Búfer fosfato 25mM pH 7,2 35% Sacarosa, 0,7% Tween 20). La ruptura de biomasa húmeda se realizó en un homogenizador de alta presión, manteniendo entre 6 y 8 pases por la prensa mecánica. Las proteínas se obtuvieron en el sobrenadante de ruptura, después de una centrifugación a 7000 x g por 30min.

2.4.4 Fermentación

Una vez estandarizados los protocolos para la producción y extracción de las proteínas de interés, se iniciaron los procesos de fermentación en un

fermentador de 5L. Se definieron los medios de cultivo óptimos a utilizar durante el proceso de fermentación, según se detalla en los anexos 1-4.

Para la inoculación inicial, se prepararon 2 tubos con 10 mL de medio YPG y se inició el crecimiento en agitación (10 x g) en termostato a 30 °C durante 24 h. Este inóculo se escaló después a matraces de 1 L con 150 mL de medio YPG, continuando el cultivo en agitación a 10 x g durante 24 h más. Posteriormente, este cultivo se centrifugó a 2500 x g durante 10 min y el precipitado se inoculó en 500 mL de medio fresco YPG en matraces de 2 L, dejándolo crecer bajo las mismas condiciones por las siguientes 24 h. Este cultivo se centrifugó a 2500 x g por 10 min y la biomasa se resuspendió en 500 mL, de medio fresco YPG, como volumen para inocular el fermentador de 5 L, volumen final.

En el fermentador se establecieron las siguientes condiciones: temperatura 30 °C, pH 4,75, agitación 55 x g y aireación 1,5 vvm. El control de pH se realizó automáticamente adicionando amoníaco (25 %) o ácido fosfórico 3 M según fuese necesario. Una vez iniciada la fermentación, se tomó una muestra inicial en tiempo cero (t_0) para conocer el peso húmedo, estableciendo como rango óptimo para el inicio de este proceso entre 12 g/L y 18 g/L.

Posteriormente, se comenzó una fase con adición de glicerol 50 %, vitaminas y sales trazas a un flujo de 18 mL/h/L de cultivo inicial, para favorecer su

crecimiento. Se tomaron registros del peso húmedo periódicamente para confirmar un crecimiento exponencial de la biomasa, y una vez alcanzado un peso húmedo entre 120-140 g/L, se comenzó la inducción. Se detuvo entonces la adición de glicerol y se adicionó un volumen de metanol puro equivalente al 0,5 % v/v. Este periodo de inducción duró entre 72 y 100 h.

2.4.5 Obtención de proteínas

Para lograr detectar las dos proteínas de interés y teniendo en cuenta que solamente el INF α es secretado al medio debido a su bajo peso molecular (19 kDa), las células de levadura se rompieron por medio de una prensa mecánica, posteriormente se centrifugaron 10 min a 15.300 x g para obtener por separado, la fase soluble (a partir de la cual se obtendría la porción correspondiente a Cap o quimera) y el precipitado de ruptura insoluble. La concentración de proteínas fue determinada mediante curva estándar, según protocolo descrito por Bradford (1976). Las proteínas de interés en los clones seleccionados, se detectaron mediante la técnica *Western blot*, separando inicialmente 100 μ g/ μ L de cada muestra por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % durante 1 h a 100 V. Para verificar la presencia de proteínas en el gel, se utilizaron 2 geles en duplicado: uno para realizar tinción con azul de Coomasie por 1 h y otro para realizar la transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Thermo Scientific 0,45 μ m) a

2,5 mA/cm² durante 10 min. Se realizó un bloqueo de los sitios no específicos, incubando la membrana con leche descremada al 5 % en PBS (Búfer fosfato salino, pH 7,4) durante 1 h a temperatura ambiente, manteniendo siempre la membrana en agitación suave. Se realizó después una incubación durante 1 h con anticuerpo primario policlonal mono específico anti-Cap (GenScript), en una dilución 1:1000, seguido de 3 lavados con PBS-Tween al 1%. El anticuerpo secundario anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc), en dilución 1:10000 y conjugado con peroxidasa, se incubó de igual manera, seguido de los mismos lavados. La detección final de señal se obtuvo mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Prime). Para estos ensayos se utilizaron el control positivo y los controles negativos descritos anteriormente (Yong *et al.*, 1992). Se consideraron positivas las muestras cuya señal, a la altura de la banda de interés, fue detectable. De esta forma, se seleccionaron los clones que estaban expresando las proteínas de interés en el cultivo: INF α en el sobrenadante y Cap en el precipitado.

2.4.6 Cuantificación de las proteínas

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (1976) utilizando una curva de calibración estándar con albúmina sérica bovina (BSA), según las indicaciones del fabricante (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Se tomaron 9 tubos para la curva estándar con

concentraciones conocidas desde 31,25 $\mu\text{g/mL}$ hasta 2000 $\mu\text{g/mL}$. A las lecturas de absorbancia obtenidas (leídas contra blanco de agua) se les restó el blanco de reactivo. Con estos valores se realizó una curva de concentración estándar vs absorbancia a 595 nm, a partir de la cual se interpolaron los valores de las muestras

2.4.7 Preparación de las emulsiones

Se utilizó un adyuvante oleoso comercial como parte de la formulación vacunal: Montanide 15AVG (Seppic, Francia), en proporción 80/20, según recomendaciones del fabricante. La estabilidad de la emulsión se evaluó durante los cinco días posterior a la preparación de la misma, manteniéndose en refrigeración (2-5 °C). Se tuvieron en cuenta parámetros como las características físicas, organolépticas y la esterilidad.

2.5 Resultados y Discusión

2.5.1. Obtención y evaluación de los clones

A partir de las construcciones genéticas establecidas en cada vector, y transformadas en la cepa MP36 de la levadura *P. pastoris*, se obtuvieron más

de 300 clones, que fueron analizados mediante técnicas de *Dot-blot* de ADN, hibridando con sondas específicas para los dos genes de interés, como se muestra en la figura 2.3.

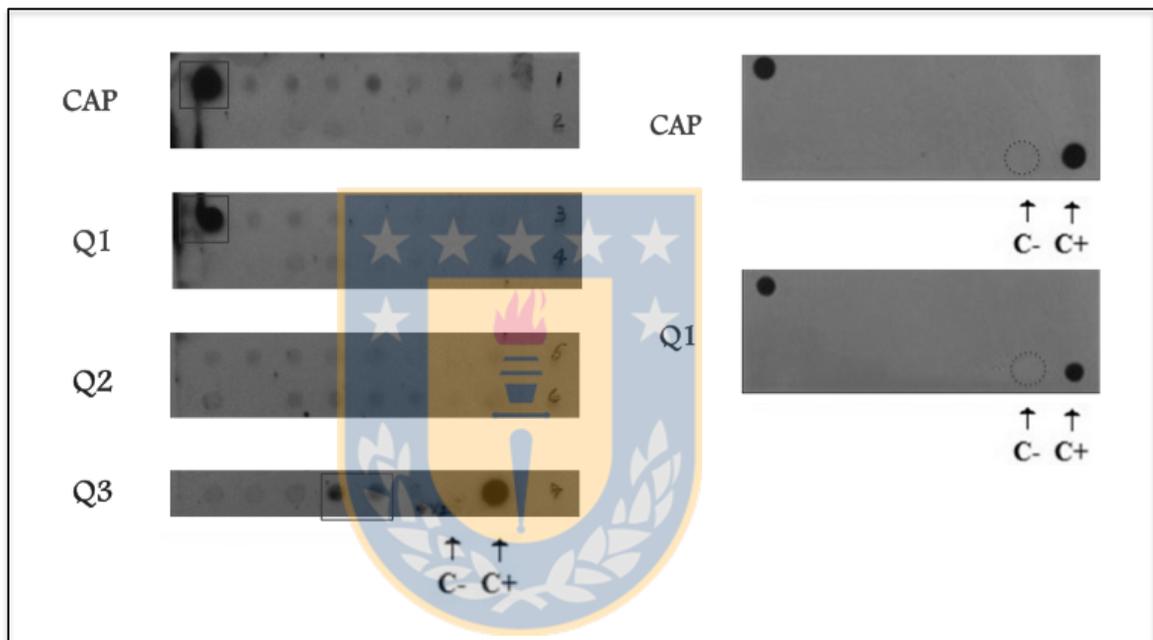
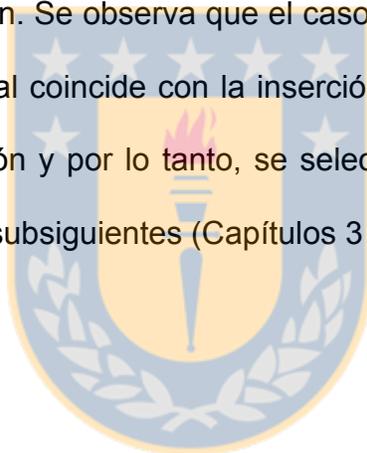


Figura 2.3. *Dot blot* realizado a los clones de cada uno de los grupos. Grupo 1 = Q1, grupo 2 = Q2, grupo 3 = Q3 Grupo 4 = Cap, control positivo). C- = control negativo. Fuente: Elaboración propia

Esta cantidad de clones transformantes obtenidos depende, según lo descrito por Tu *et al.*, (2013), de factores como la toxicidad de la proteína, la falta de disponibilidad de tRNAs, la toxicidad asociada al ADN y/o algunas fallas en la secreción de la proteína. En la figura anterior se muestran los clones que mayor intensidad revelaron por medio de la técnica de *Dot blot*, para cada uno de los

grupos; siendo el grupo 1 (Q1) el que mostró mayor intensidad, similar al control positivo.

Se obtuvieron varios clones con patrones de integración múltiple, resultando especialmente llamativo uno de los clones dentro del grupo 1 (Q1), que presentó más de 6 bandas de integración, como se muestra en la figura 2.4, lo que coincide con un patrón multicopia que incrementa notablemente la capacidad de expresión. Se observa que el caso de este clon, hay un patrón de bandas múltiple, lo cual coincide con la inserción de varios números de copias del inserto de expresión y por lo tanto, se seleccionó este clon para continuar con los experimentos subsiguientes (Capítulos 3 y 4 de esta tesis).



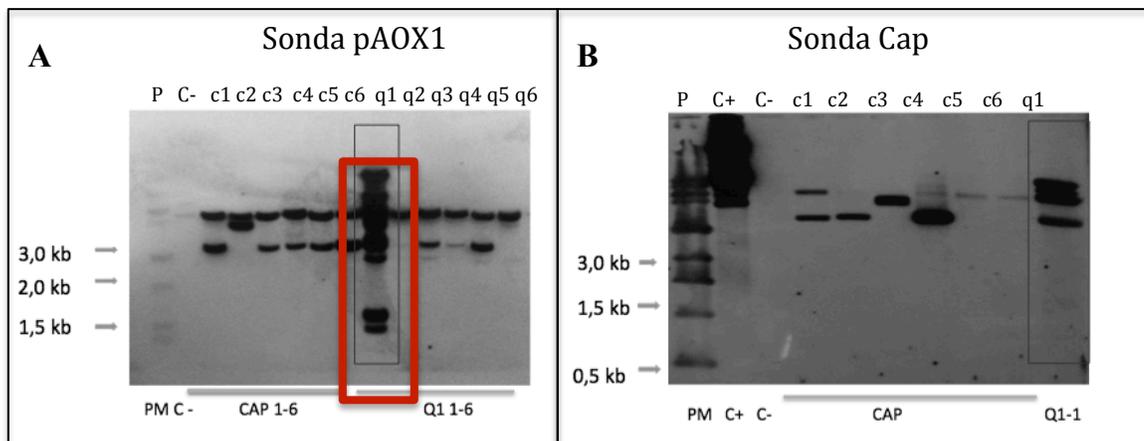


Figura 2.4 *Southern blot* de diferentes clones de levaduras transformados con los vectores. A. *Southern blot* con sonda pAOX1,. B. *Southern blot* con sonda Cap. El rectángulo rojo señala el clon q1 que muestra un patrón de bandas múltiple. P: patrón de peso molecular, q1-q6: clones diferentes del grupo 1 (Q1). c1-c6: clones diferentes del grupo 4 (control positivo). C+: control positivo, plásmido usado en la transformación conteniendo Cap, C-: control negativo, Cepa de *P. pastoris* MP36. Fuente: Elaboración propia

Es importante resaltar, tal y como lo propone Sawers *et al.* (1996) que para que la proteína se produzca, el promotor debe venir del hospedero y ser funcional en él para que así, logre regular ciertas condiciones como por ejemplo: cuándo, en qué cantidad y con qué frecuencia el gen es transcrito. En este estudio, el promotor utilizado fue el del gen de AOX, y según lo reportado por Ruiz *et al.* (2008), en el genoma de *P. pastoris* este tipo de patrones de integración por recombinación se ven favorecidos debido a la presencia de estos dos genes (AOX1 y AOX2), dando origen a cepas con fenotipos diferentes y con genotipos que presenten copias múltiples del gen, bajo el mismo promotor seleccionado,

lo cual se evidencia en los patrones de integración múltiple observados en dicho clon.

El proceso de recombinación genética se llevó a cabo eficientemente; mediante este proceso, las dos moléculas de ADN involucradas (plásmido y levadura) se alinearon e intercambiaron secuencias; de tal forma que el plásmido recombinó con el genoma de la levadura, reemplazando el gen AOX1. Según lo descrito por Sawers *et al.* (1996), mientras que las inserciones simples son más comunes, los eventos de inserción múltiple ocurren espontáneamente entre un 1-10 %. De tal forma, *P. pastoris* es capaz de integrar múltiples copias del ADN transformante por medio de la recombinación en los sitios de homología.

A partir del *Southern blot*, se obtuvo una banda de aproximadamente 5,3 kb; ésta se genera por la ubicación del sitio de corte de la enzima de restricción *EcoRI*, ubicado al final del gen Cap. Cuando se digiere el genoma de los clones Cap con la enzima *EcoRI*, se generan 2 fragmentos de aproximadamente 5,3 kb, ambos fragmentos contienen, cada uno, un promotor AOX: uno de estos fragmentos contiene el promotor AOX1 5', el gen Cap y ADN genómico 5' de *Pichia pastoris*, mientras que el segundo fragmento contiene el promotor HIS, el segundo promotor AOX1, el gen de INF α , la región 3' del *cassette* AOX1 y el ADN genómico 3' de la levadura *P. pastoris*. Según el patrón de integración multicopia, las señales provienen del promotor AOX1, típico de una adición en

P. pastoris llamada Mut⁺, en donde el gen de interés se inserta aleatoriamente y más de una vez en diversos sitios del genoma de la levadura, con la posibilidad de reemplazar el *cassette* genético AOX1. Esta complementariedad entre el plásmido y el genoma de la levadura, según Sawers *et al.* (1996), permite su manipulación para poder producir la proteína de la cápside como si ésta fuera nativa; proceso que resulta similar al utilizado por los bacteriófagos para reproducirse en las bacterias, utilizando toda su maquinaria de expresión.

Los mayores niveles de expresión de la proteína de interés, se obtuvieron en este clon q1, que también demostró expresión de la citoquina inmunopotenciadora IFN α . La proteína IFN α se identificó utilizando un anticuerpo policlonal específico, mientras que las variantes de Cap se detectaron mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo policlonal específico contra el dominio de Cap nativo producido en conejo y suero policlonal derivado de cerdos previamente infectados con PCV2 (su elaboración no hace parte de este trabajo), como se muestra en la figura 2.5.

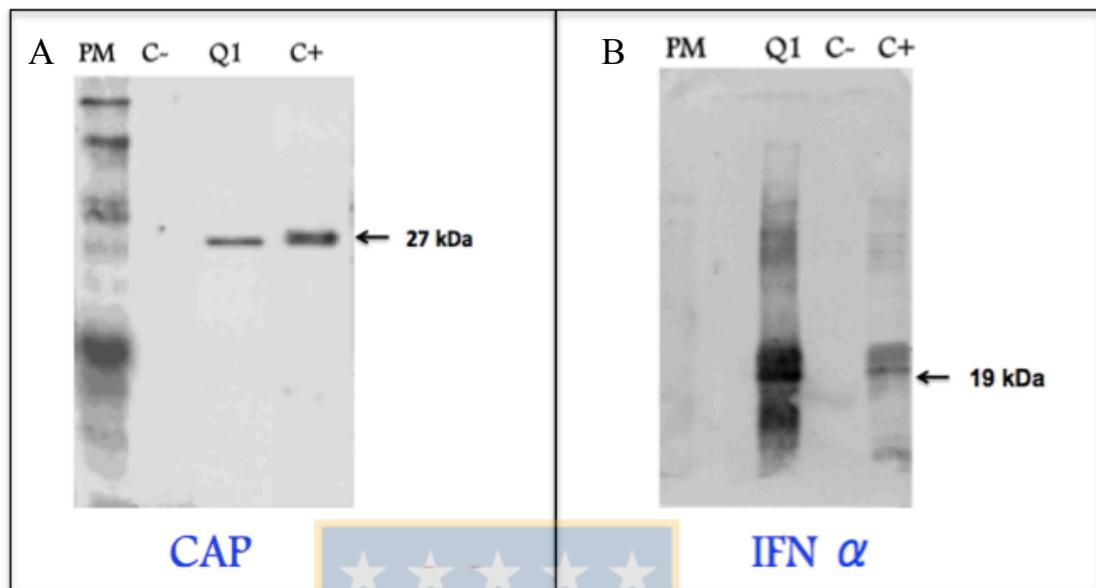


Figura 2.5 *Western blot* de la quimera seleccionada (Q1). A: Detección con anticuerpo primario anti-C. B. Detección con anticuerpo primario anti-IFN α . C+: control positivo (Cap, 27 kDa e IFN α 19 kDa), C-: control negativo (*P. pastoris* cepa MP36). Fuente: Elaboración propia

Este clon de la levadura (Q1), que tuvo mayor expresión de la proteína, se seleccionó entonces como candidato a estudios de preparación de las emulsiones y ensayos de inmunización.

2.5.2 Fermentación

Según Almuzara *et al.* (2002), el crecimiento de *P. pastoris* puede ser optimizado sobre una amplia variedad de fuentes de carbono tanto en medios

líquidos como sólidos, así que para establecer el proceso tecnológico, se realizaron ensayos con cultivos discontinuos, previos al proceso de fermentación, con las siguientes cepas seleccionadas: Q1, Cap (control positivo) y MP36 (control negativo). Cuando se realizó el crecimiento inicial en matraces, la tasa de crecimiento fue más baja, pero fue mejorando con el paso al fermentador. Esto se debe a que en el medio ambiente controlado del fermentador, es posible que la levadura crezca en altas densidades celulares; adicionalmente, el nivel de transcripción iniciado por el promotor de AOX1 es superior en células de *P. pastoris* alimentadas en condiciones controladas, con metanol (Almuzara *et al.*, 2002). Este clon Q1 se llevó a condiciones de cultivo agitado en 10 mL y 150 mL consecutivamente, e inducción seriada con metanol cada 12 h, para analizar el contenido de proteínas intra y extracelulares. Los tiempos de duplicación observados en este ensayo coinciden con los observados por Wolf (1996), manteniéndose en aproximadamente 90 min sobre glucosa y 6 h sobre metanol.

El proceso de fermentación tuvo lugar en un volumen final de 5 L, como se observa en la figura 2.6, adicionando el glicerol para ser utilizado como fuente de carbono, garantizando un crecimiento exponencial.



Figura 2.6. Fermentador utilizado para el escalamiento en la producción de las proteínas (Q1, Cap e INF α). Fuente: Elaboración propia

En esta fase, interesaba alcanzar rápidamente una alta concentración celular y rendimiento máximo en biomasa, manteniendo las mismas condiciones de cultivo no limitado por

oxígeno, ya que como describe Inan *et al.* (2001), *P. pastoris* puede acumular etanol o acetato en el medio de cultivo, metabolitos que resultan fuertes represores de la AOX. Así, acorde a lo publicado por Files *et al.* (2001), la concentración inicial de sustrato establece una velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de biomasa, alcanzando entre 80 y 120 g/L de peso húmedo después de 20-24 h, dependiendo de la concentración del inóculo inicial. Teniendo en cuenta que la concentración del producto resulta ser aproximadamente proporcional a la concentración de células en el cultivo, la inducción del promotor AOX1 mediante la adición de metanol se inició una vez alcanzada la densidad celular establecida.

Después de terminado el sustrato principal en el fermentador, se agregó el sustrato limitante de cultivo, dependiendo de los requerimientos específicos como indican Jahic *et al.* (2002). Una vez obtenido el rango óptimo entre 180-

220 g/L de peso húmedo; se comenzaron a adicionar además las sales trazas y vitaminas. El monitoreo de oxígeno durante esta etapa fue muy relevante porque permitió definir en qué momento se debía efectuar la inducción, ya que una vez agotada la fuente primaria de carbono, la concentración de oxígeno aumentaba notablemente; probablemente, porque el metabolismo del metanol emplea oxígeno a altas velocidades, favoreciendo la expresión de los genes foráneos. De forma similar, cuando el metanol comenzó a ser utilizado como fuente de carbono, el oxígeno disuelto disminuyó. Por lo tanto, si esta inducción se hace antes de agotarse la fuente primaria de carbono o mucho tiempo después, o si el suministro de metanol es excesivo o muy limitado, la respuesta puede ser muy lenta, afectando el desarrollo del cultivo y por consiguiente, la expresión de la proteína recombinante expresada bajo el promotor AOX, lo que coincide con los resultados publicados por Rodríguez *et al.* (2007).

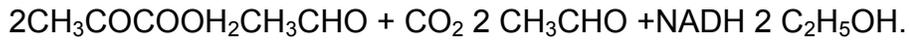
El primer paso metabólico de esta levadura en la utilización del metanol, fue su oxidación a formaldehído y peróxido de hidrógeno, como han descrito Cereghino *et al.* (2000), el cual fue catalizado por la enzima alcohol oxidasa. Una vez en el fermentador, el medio óptimo para el crecimiento de *P. pastoris* consistió en una fuente pura de carbono (glicerol o metanol), biotina, sales, trazas de elementos y agua. Cregg *et al.* (1989) han descrito que cuando la levadura está creciendo sobre metanol, lo utiliza como fuente de carbono y la enzima alcohol oxidasa llega a ser el 35 % total de la proteína celular, y ya que

ningún mRNA de los dos genes es detectable cuando la levadura crece sobre glicerol, la producción de la proteína de la cápside puede ser reprimida hasta cuando el cultivo esté saturado de células, y se inicie la inducción del gen (Cereghino *et al.*, 2000).

Esta fermentación alcohólica que se llevó a cabo, fue con la finalidad de proporcionar energía aeróbica a la levadura en ausencia de oxígeno, a partir de la glucosa, disociando las moléculas de glucosa, obteniendo así, la energía para sobrevivir y generar desechos como alcohol y dióxido de carbono. Este proceso se llevó a cabo en dos etapas: la glucólisis y la fermentación propiamente dicha. La glucólisis fue la primera etapa de la fermentación, lo mismo que en la respiración celular, y al igual que ésta, necesita de enzimas para su completo funcionamiento. Es una reacción exotérmica y una secuencia de reacciones que convierte a la glucosa en piruvato, con la producción de adenosín trifosfato (ATP), fundamental en la obtención de energía. La reacción química correspondiente es: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3COCOO^- + 2 H_2O + 2H^+ + ATP$.

La fermentación alcohólica fue la segunda etapa de esta fermentación, para la cual también se necesitan enzimas, y ésta se produjo en dos fases: En la primera, el piruvato se convirtió en acetaldehído y dióxido de carbono; y en la segunda, el acetaldehído, con la acción de la NADH (enzima deshidrogenasa)

que se oxida (suministrandu electrone), reduce el acetaldehído, convirtiéndose en alcohol etílico. La reacción química correspondiente es:

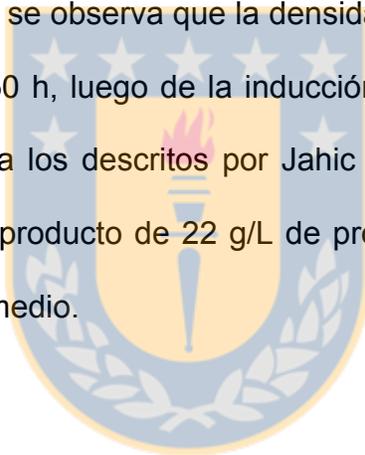


Una vez consumido el glicerol como sustrato principal, el metanol se adicionó al cultivo y el estado fisiológico de la célula cambió, formándose los peroxisomas en donde se degrada el metanol y se produce peróxido de hidrógeno y formaldehído, usados para la generación de energía y formación de constituyentes celulares, respectivamente, acorde a lo descrito por Chen (2016). La alta demanda de oxígeno para el metabolismo del metanol hace que el oxígeno sea un parámetro muy importante para el cultivo por lo que, según Jahic *et al.* (2002), requiere estrategias de diseño para el proceso de fermentación. Adicionalmente, fue importante controlar también la formación de espuma, provocada por el desprendimiento de gas carbónico, para lo cual se adicionó antiespumante comercial.

Los niveles de pH se mantuvieron bajos para reducir el riesgo de contaminación microbiana, y al ajustarlo con hidróxido de amonio, resultó útil para que fuera utilizado también como fuente de nitrógeno en el cultivo. Por su parte, y similar a lo reportado por Wolf *et al.* (1996), la adición de las trazas de metales facilitaron la tolerancia de la levadura a mayores tiempos de retención en el fermentador; mientras que la adición de vitaminas, favorecieron reacciones

biológicas importantes: por ejemplo, la adición de la biotina (también conocida como vitamina H), que intervino en la descarboxilación, desaminación y síntesis nitrogenada, manteniéndose el mayor consumo de esta vitamina durante la fase exponencial. Al haber carencia de esta vitamina, la glucólisis disminuye notablemente.

En la figura No. 2.7 se evidencia el crecimiento de la levadura en el fermentador, en donde se observa que la densidad alcanzada fue de 235 g/L de peso húmedo a las 150 h, luego de la inducción con un peso húmedo de 132 g/L, valores similares a los descritos por Jahic *et al.* (2002), quienes lograron una concentración de producto de 22 g/L de proteína intracelular y 14,8g/L de proteína secretada al medio.



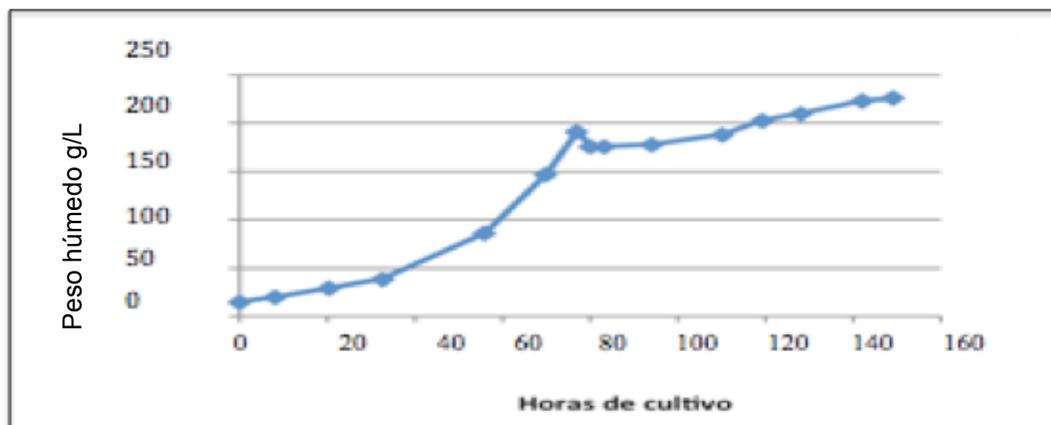


Figura 2.7. Curva de crecimiento en el fermentador, registrando el peso húmedo (g/L), para cada periodo de tiempo. Fuente: Elaboración propia

En este estudio, se logró obtener la proteína de la cápside y la quimera de forma intracelular, mientras que la proteína de INF α , en el sobrenadante del cultivo. La mayor producción de proteína se observó a las 96 h de inducción con metanol, con una cuantificación de proteína total soluble en el medio de cultivo de 2 g/L, y de proteína en el precipitado de cultivo de 174 g/L.

2.5.3 Preparación de las emulsiones

Las emulsiones se prepararon con los extractos de proteína obtenidos del sobrenadante de cultivo (IFN α , a una concentración de 18,5 μ g/mL) y de la ruptura celular de la levadura recombinada (Cap, a una concentración de 12,3 μ g/mL). Se realizaron los cálculos para mantener en la emulsión final, una

concentración de 600 µg/mL de proteína total, acorde a la concentración utilizada por Tu *et al.* (2013), quienes en estudios similares utilizaron la proteína de la cápside para evaluar una vacuna comercial. Esta preparación se mantuvo estable por el tiempo evaluado, sin observarse crecimiento microbiano. El adyuvante utilizado para la preparación de las emulsiones fue Montanide ISA 15AVG en proporción 80/20 (fase acuosa/fase oleosa), según recomendación del fabricante. Este adyuvante se utilizó con la finalidad de mejorar la respuesta inmune, dirigir el tipo de respuesta y aumentar la duración de la misma en el animal, mejorando el impacto de la vacuna sobre el sistema inmune. Generalmente, los adyuvantes son utilizados para promover la eficacia de la vacunación, reducir las dosis de inmunógeno, obteniendo respuestas inmunes selectivas y generando células de memoria de larga vida, favoreciendo su migración a lugares específicos de acción. Este adyuvante Montanide 15A contiene aceite como su fase dispersa y agua como fase continua; al ser aceite en agua (O/W, oil in water), y de acuerdo a lo descrito por Bernagozzy y Barragán (2012), favorece el retardo de la eliminación del antígeno y, por lo tanto, su mayor permanencia y mayor efecto estimulador, con una liberación lenta. Si la proteína se inoculara sin adyuvante, se produciría una rápida diseminación del antígeno a través de la linfa y sangre, casi en forma inmediata, pero al estar emulsionado, se genera un ligero retraso y la liberación de la proteína se produce muy rápidamente.

En este capítulo, se confirmó la integración de los genes que codifican para la proteína de la cápside de PCV2, el $\text{INF}\alpha$, y las quimeras evaluadas, en la levadura *P. pastoris* MP36, seleccionando un clon dentro del grupo 1 (Quimera 1), para escalar los ensayos de producción de proteína en cultivo discontinuo y en fermentador. Las proteínas de interés se lograron obtener por separado en el sobrenadante de cultivo ($\text{INF}\alpha$) y sobrenadante de ruptura (Cap), después de pasar las muestras por una prensa mecánica para el rompimiento celular. Con estos resultados, se logró preparar la emulsión para ser ensayada en animales, usando Montanide ISA 15AVG como adyuvante para la preparación de las emulsiones, debido a sus características de aceite en agua.

2.6 Conclusiones

2.6.1 Las proteínas Cap e $\text{INF}\alpha$ se expresaron exitosamente en clones de *P. pastoris*, obteniendo $\text{INF}\alpha$ secretado al medio y Cap de forma intracelular, luego de una ruptura celular en prensa mecánica.

2.6.2 Se obtuvo una emulsión como formulación vacunal, utilizando las proteínas Cap e $\text{INF}\alpha$, además de la quimera seleccionada, junto con el adyuvante comercial Montanide ISA 15AVG.

2.7 Referencias bibliográficas

1. Almuzara, C., Cos, O., Baeza, M., Gabriel, D., Valero, F. (2002). Metanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotechnol Lett.* 24: 413-417.
2. Bartnicki-García, S., Nickerson, W. (1962). Isolation, composition, and structure of cell walls of the filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochim et Biophys.* 58: 102-119.
3. Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec'h, A., Baudouard, M.A., Cordoli, P., Albina, E., Jestin, A. (2003). Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21 (31): 4565–4575.
4. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–254.
5. Bucarey, S., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Saenz, L., Zuniga, A., Tobar, J. (2009). The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine.* 27 (42): 5781–5790.
6. Cereghino, J., Cregg, J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 45-66.
7. Cregg, J., Madden, K., Barringer, K., Thill, G., Stillman, C. (1989). Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 9 (3): 1316-1323.
8. Fan, H., Ju, T., Tong, H., Huang, J., Chen, H. (2007). Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet Res Commun.* 31(4): 487-496.
9. Gresser, I., Tovey, M., Maury, C., Bandu, M. (1975). Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. - II. Studies with herpes simplex, Moloney sarcoma, vesicular stomatitis, Newcastle disease, and influenza viruses. *J Exp Med.* 144: 1316-1323

10. Gresser, I., Tovey, M., Bandu, M., Maury, C., Brouty-Boye, D. (1976). Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. - I. Rapid evolution of encephalomyocarditis virus infection. *J Exp Med.* 1976: 144, 1305-1315.
11. Huang, L., Lu, Y., Wei, Y., Guo, L., Liu, C. (2011). Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2. *J Virol Methods.* 171: 26-33.
12. Khayat, R., Brunn, N., Speir, J., Hardham, J., Ankenbauer, R., Schneemann, A., Johnson, J. (2011). The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 1. *J Virol.* 85: 7856-7862.
13. La Bonnardii, C., Laude, H. (1981). High interferon titer in newborn pig intestine during experimentally induced viral enteritis. *Infect Immun.* 32: 28-31.
14. Lekcharoensuk, P., I. Morozov, P. Paul, N. Thangthumnyiom, W. Wajjawalku, and X. Meng. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol.* 78(15): 8135-8145.
15. Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A. (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol.* 81: 1815-1824.
16. Marcekova, Z., Psikal, I., Kosinova, E., Benada, O., Sebo, P., Bumba, L. (2009). Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *J. Virol Methods.* 162: 133-141.
17. Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., Thacker, B.J., Sorden, S.D., Lekchorensuk, C., Paul, P.S. (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 33-40.
18. Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Madson, D.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T. (2011). Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after experimental infection. *Vet Microbiol.* 149: 91-98.

19. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
20. Sawers, G., Jarsch, M. (1996). Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:1-7.
21. Silva, J., Coimbra, E., Jesus, A., Mariz, F., Silva, K., Lobato, Z. (2014). Secretory expression of Porcine Circovirus Type 2 capsid protein in *Pichia pastoris*. *J. Virol Methods.* 207: 226-231.
22. Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature.* 295: 64-66.
23. Tseng, Y., Hsieh, C., Kuo, T., Liu, J., Hsu, T., Hsieh, S. (2019). Construction of a *Lactobacillus plantarum* strain expressing the capsid protein of Porcine Circovirus Type 2d (PCV2d) as an oral vaccine. *Indian J Microbiol.* 59 (4): 490-499.
24. Tu Y., Wang, Y., Wang, G., Wu, J., Liu, Y., Wang, S. (2013). High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97 (7): 2867-2875.
25. Virelizier, J., Gresser, I. (1978). Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. - V. Protective role in MHV₁ infection of susceptible and resistant strains of mice. *J Immunol.* 120: 1616-1629.
26. Wang, L., Zhao, D., Sun, B., Yu, M., Wang, Y., Ru, Y., Jiang, Y., Oiao, X., Cui, W., Zhou, H., Li, Y., Xu, Y., Tang, L. (2020). Oral vaccination with the porcine circovirus type 2 (PCV-2) capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces a specific immune response against PCV-2 in mice. *J Appl Microbiol.* 128 (1): 74-87.
27. Wolf, K. (1996). No conventional yeast in biotechnology. A Handbook. Berlin, Germany, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 203-253.
28. Yong, V., González, M., Herrera, L., Delgado, J. (1992). El gen HIS3 complementa una mutación *his⁻* de *Pichia pastoris*. *Biotechnol Apl.* 9: 55-61.

CAPITULO III

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA FORMULACIÓN VACUNAL



3.1 Introducción

El manejo y control de las enfermedades asociadas a PCV2 ha evolucionado en los últimos años debido a la aplicación de buenas prácticas de producción, además de la introducción al mercado de varias vacunas comerciales. El tiempo de vacunación va a depender siempre de los objetivos que se pretenden en cada plantel, ya que cuando la situación de la granja requiere prevención de infecciones intrauterinas y mejora de los parámetros de producción, lo más aconsejable es vacunar tanto a las madres como a los lechones (Madson y Opriessnig, 2011); aunque estudios previos han demostrado que si bien la vacunación de las cerdas asegura que los lechones reciban altas cantidades de anticuerpos maternos, estos anticuerpos adquiridos de forma pasiva, por sí solos, no logran proporcionar una protección completa a los cerdos (Mckeown *et al.*, 2005; Opriessnig *et al.*, 2008).

Por su parte, frente a esta primera línea de defensa contra las infecciones virales, la producción de interferones juega un rol importante para la activación de una respuesta inmune adaptativa (Bonjardim, 2005). Específicamente el interferón alfa (IFN α), encargado de estimular la producción de mediadores antivirales, como la 2', 5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y proteína kinasa R dependiente de dsRNA (PKR), los cuales inhiben la replicación viral (Katze *et al.*, 2002; Asano *et al.*, 2004).

Con la finalidad de evaluar el prototipo vacunal desarrollado en el capítulo II de esta tesis doctoral, se realizaron ensayos en lechones destetados, para determinar su capacidad de protección en la población porcina, así como la efectividad del empleo de INF α como proteína potenciadora de la respuesta inmune en los animales, frente a aquellos vacunados solamente con la quimera.

3.2 Objetivo específico

3.2.1 Comparar la efectividad de la formulación vacunal con el uso de INF α porcino como inmunopotenciador.

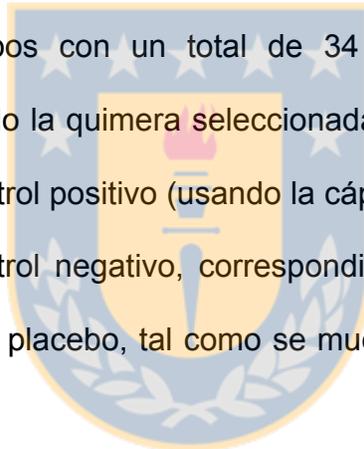
3.3 Materiales y métodos

Los experimentos para la evaluación de la efectividad de la formulación vacunal, se realizaron en cerdos, correspondientes a una mezcla de animales híbridos originados de la cruce entre las razas Large White y Landrace. En cada uno de los diseños experimentales, se consideró el principio de las tres “R” de Russell y Burch (1959) que se refieren básicamente a la necesidad de: i) Reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, ii) Reducir su número cuando sea necesario y iii) Refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento. Los ensayos fueron realizados en espacios adecuados

para este fin en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, en el Campus Chillán. Durante el tiempo que duró el estudio, los animales recibieron suministro de agua potable y una ración comercial de acuerdo a los requerimientos de su edad, administrada de forma *ad libitum*.

3.3.1 Diseño experimental

Se generaron 6 grupos con un total de 34 cerdos, incluyendo 2 grupos experimentales (usando la quimera seleccionada en el capítulo II con y sin INF α), 2 grupos como control positivo (usando la cápside de PCV2, con y sin INF α) y 2 grupos como control negativo, correspondientes al cultivo de la levadura MP36 y PBS 1x como placebo, tal como se muestra en el diseño experimental de la figura 3.1.



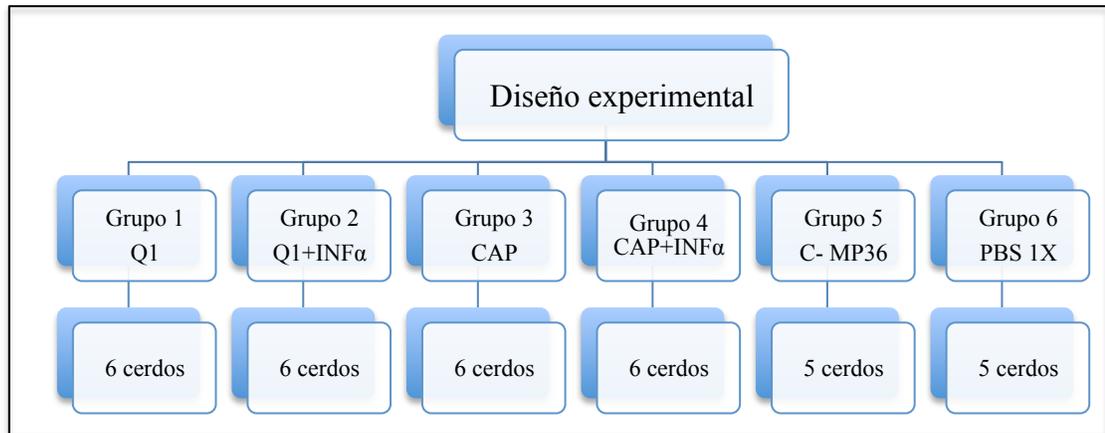


Figura 3.1. Descripción del diseño experimental, indicando los grupos con sus respectivos tratamientos y el número de animales en cada uno de ellos (n = 34). Grupos 1 y 2 corresponden a grupos experimentales de la formulación vacunal (sin y con INF α , respectivamente); grupos 3 y 4 corresponden a controles positivos utilizando la cápsula de PCV2 (sin y con INF α , respectivamente); grupos 5 y 6 corresponden a controles negativos utilizando la levadura (grupo 5) y PBS 1X (grupo 6). Fuente: Elaboración propia

En la figura 3.2 se presenta el esquema del diseño cronológico de procedimientos, con un programa de vacunación a los 0 y 21 días del ensayo, además de un desafío a los 35 días del ensayo, tal y como se muestra a continuación.

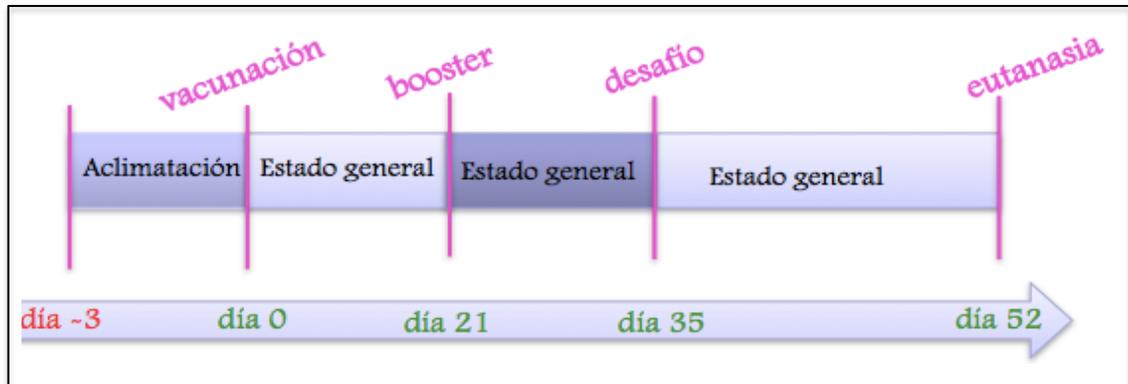


Figura 3.2. Diseño cronológico del manejo de los animales, señalando los días del ensayo en el cual se realiza cada uno de los procedimientos: día 0 (vacunación), día 21 (booster), día 35 (desafío) y día 52 (eutanasia). Fuente: Elaboración propia

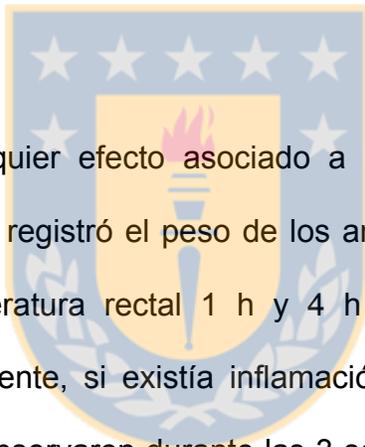
Para el ensayo, se emplearon animales de 3 semanas de edad, que fueron seleccionados con 7 días de antelación a partir de un muestreo aleatorio de 100 animales provenientes de un mismo plantel con un alto nivel sanitario, teniendo en cuenta que tuvieran un origen, raza y crianza uniforme, todos libres de cuadros clínicos de PMWS, con carga viral $\leq 10^5$ copias/ μ L, detectada por medio de PCR en tiempo real y con los niveles más bajos de anticuerpos, detectados por técnica de Elisa. Una vez evaluados y seleccionados, los animales se mantuvieron en las instalaciones de la universidad destinadas al experimento, durante 3 días previos al inicio de los ensayos, para permitir su aclimatación, cumpliendo con la Directiva del Parlamento Europeo de 22.09.2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, específicamente

pág. 64-65, referente a la densidad de los animales por m². Los cerdos se inmunizaron al comienzo del ensayo (día 0), a una edad de 24 días de vida, más un *booster* en el día 21 post vacunación inicial. Posteriormente fueron desafiados (día 35) y terminado el ensayo en el día 52, cerca de las 11 semanas de vida.

3.3.2 Inmunización y toma de muestras

Se emplearon procedimientos estándares de inyección por ruta parenteral, intramuscular. A los grupos 1 y 2 se les administró intramuscularmente 2 mL de la formulación vacunal a ensayar, preparada con Montanide ISA 15A VG (Seppic), siendo éste, un adyuvante oleoso que permite la liberación lenta de sus componentes activos. Se evaluó la formulación con la dosis de la quimera (Q1, expresada en la levadura Cepa MP36) a una concentración de 600 µg/mL de proteína total en los grupos 1 y 2, adicionalmente, al grupo 2 se le incorporó IFN α a una concentración de 148 µg/mL; los controles positivos (grupos 3 y 4) recibieron 2 mL intramuscular que contenía una concentración de 600 µg/mL de proteína total de la Cápside de PCV2 (Cap), y adicionalmente, al grupo 4, se le incorporó IFN α a una concentración de 148 µg/mL; y 2 controles negativos se les administro intramuscularmente 2 mL donde uno de ellos (grupo 5) contenía una concentración de 600 µg/mL de proteína total de la levadura MP36, y el otro grupo control negativo (grupo 6), recibió como placebo Búfer fosfato salino

(PBS; 10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,2). Antes del momento de vacunación, se tomó muestra de sangre a cada animal, todas desde la vena yugular, en volúmenes analíticos de 5 mL, en tubos vacutainer (BD Diagnostic Systems), para luego ser mantenidas a 4 °C y llevadas al laboratorio en un plazo no superior a 4 h para su análisis, teniendo cuidado de no afectar el bienestar y normal desarrollo de los animales tratados, según certificado emitido por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción, en enero de 2012 (Anexo 5).



Para determinar cualquier efecto asociado a la formulación vacunal en los diferentes grupos, se registró el peso de los animales (día 0, 4, 21, 25 y 52), además de su temperatura rectal 1 h y 4 h después de la inmunización, verificando adicionalmente, si existía inflamación en el punto de inoculación. Todos los cerdos se observaron durante las 3 semanas siguientes. Durante los 4 primeros días post vacunación, se registró diariamente la temperatura rectal y peso individual de cada animal, para determinar la ganancia de peso. Además, se evaluaron parámetros como: i) diámetro de inflamación en punto de inoculación ii) apariencia de las heces con respecto a consistencia, color, presencia de mucus y sangre, iii) ingesta de agua, iv) comportamiento y v) signos de dolor y sufrimiento relacionados con la aplicación de la vacuna, de manera de no superar la puntuación del segundo rango que va de 5 – 9 según lo señalado por Morton y Griffiths (1985) en el protocolo de supervisión animal.

Entre los días 5 y 14 postvacunación, se observó y palpó el sitio de inoculación y el estado general de cada animal. En el día 21 postvacunación, se tomó la siguiente muestra de sangre y se registró nuevamente el peso de los animales antes de recibir la segunda dosis de la vacuna o placebo. Se midió nuevamente la temperatura rectal 1 h y 4 h después de la inmunización, verificando la zona para descartar algún tipo de inflamación en el punto de inoculación. Durante los siguientes 4 días post *booster*, se registró diariamente la temperatura rectal y peso individual de cada animal, para determinar su ganancia de peso. Se evaluaron además, los siguientes parámetros: i) diámetro de inflamación en punto de inoculación ii) apariencia de las heces con respecto a consistencia, color, presencia de mucus y sangre, iii) ingesta de agua, iv) comportamiento y v) signos de dolor y sufrimiento (Morton y Griffiths, 1985) relacionados con la aplicación de la vacuna. Entre los días 22 y 25 post vacunación se observó y palpó el sitio de inoculación y el estado general de cada animal.

Dos semanas después del *booster* se realizó el desafío inoculando 10 mL de Circovirus porcino 2 ($1 \times 10^{4,7}$ TCID₅₀). Las siguientes muestras de sangre fueron tomadas a los días 41 y 52 (7 y 17 días post-desafío, respectivamente) después de 6 y 7 semanas de la primo-vacunación, para dar fin al ensayo experimental.

3.3.3 Cuantificación de carga viral

A partir del suero porcino, se extrajo ADN utilizando el kit comercial QIAamp DNA Mini kit (Qiagen), según protocolo recomendado por el fabricante, determinando la concentración de ADN, en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (BioTek). La curva estándar se realizó con 5 diluciones seriadas (1:10) utilizadas por duplicado en cada punto de la curva, de un cultivo puro del virus, a una concentración de $2,4 \times 10^9$ copias/mL. Como controles positivos se utilizaron 2 muestras de campo de animales positivos con concentraciones de $1,5 \times 10^9$ copias/mL y $6,2 \times 10^{10}$ copias/mL; y como control negativo se incluyó agua en la mezcla maestra, reemplazando el templado de ADN, según protocolo estandarizado en el Laboratorio de Diagnóstico Porcino de la Universidad de Concepción.

Para la reacción de PCR se utilizó el kit SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline) en un volumen final de 10 μ L (mezcla: 5 μ L de Sensimix 5x, 2,5 μ L de agua estéril libre de nucleasas, 10 pmoles de cada partidor y 2 μ L de ADN), con los partidores: forward: 5'TGGCCCGCAGTATTCTGATT3'y reverse: 5'CAGCTGGGACAGCAGTTGAG3' para amplificar un fragmento del gen de la cápside (71 pb), según publicación de Opriessnig *et al.* en el año 2003. Las reacciones fueron corridas en el equipo Stratagene-Mx3000P™ PCR en

Tiempo Real (Stratagene). La normalización se realizó utilizando los niveles de carga viral en suero de lechones sin vacunar y sin signos clínicos.

3.3.4 Medición de títulos de anticuerpos

A partir de las muestras de sangre, se midieron posteriormente los títulos de anticuerpos anti PCV2 por medio de Elisa indirecta (Biocheck), según indicaciones del fabricante. Cada suero, en dilución 1:50, se sirvió en los pocillos de la placa comercial, que se incubó posteriormente con anticuerpo anti cerdo, marcado con fosfatasa alcalina, para detectar los complejos antígeno-anticuerpo en cada pocillo. La intensidad del color amarillo, según los controles internos del kit, corresponden directamente a la concentración de anticuerpo anti-PCV2 presente en la muestra. Se consideraron positivas las muestras cuyo valor S/P fue mayor a 0,500, según lectura a una absorbancia de 405 nm en espectrofotómetro Multiskan Ex (Thermo). El valor S/P se calculó con la siguiente fórmula, según protocolo del fabricante:

$$SP = \frac{\text{media de la muestra} - \text{media del control negativo}}{\text{media del control positivo} - \text{media del control negativo}}$$

3.3.5 Eutanasia

Una vez finalizado el ensayo, todos los animales se eutanasiaron previa sedación con maleato de acepromazina (1,1 mg/kg), para luego administrárseles una sobredosis intravenosa de tiopental sódico (Bestpharma) diluido al 5 %, (50mg/Kg). Posteriormente, fueron sometidos a necropsia reglada del Laboratorio de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Campus Chillan, en búsqueda de cualquier alteración presente en los animales. Con la finalidad de determinar el efecto local en la zona de inyección se tomó una muestra de piel y músculo de esta zona para análisis histopatológico, las cuales fueron procesadas por el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Con la finalidad de descartar lesiones atribuibles a la infección por PCV2, se realizó histopatología a los tejidos linfoides (linfonódulo inguinal, linfonódulo mesentérico, linfonódulo retrofaríngeo, linfonódulo mediastínico). Los restos de animales y tejido se almacenaron en contenedores apropiados a 4 °C y fueron desechados posteriormente bajo las normas de seguridad definidas de acuerdo a la legislación vigente, las cuales están implementadas por la Facultad de Ciencias Veterinarias.

3.3.6 Análisis estadístico

Los datos registrados de peso, temperatura, carga viral y títulos de producción de anticuerpos se evaluaron mediante análisis de varianza no paramétrica Kruskal-Wallis para contrastar la hipótesis nula de que las medias de las 4 poblaciones coinciden, seguido de test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las variables cualitativas se analizaron mediante estadística descriptiva test de Kruskal-Wallis. Para ello, se utilizó el programa estadístico Infostat/L.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Condición físico-clínica de los animales

Todos los animales llegaron con un buen estado de salud y los días de aclimatación antes de comenzar el ensayo fueron importantes para estar seguros de la uniformidad en el estado de los mismos. Ninguno de los animales mostró síntomas de enfermedad causada por la aplicación de la vacuna después de las inmunizaciones (tanto primovacunación como *booster*), ni después del desafío; así como tampoco se observaron reacciones adversas en el punto de inoculación. Si hubo alguna inflamación local, ésta fue imperceptible y/o transitoria, sin manifestación alguna de dolor local o eritema.

Para poder evaluar posibles signos de dolor causados por los procedimientos realizados, en este estudio se aplicó el protocolo de supervisión de los animales propuesto por Morton y Griffiths (1985). De tal forma, y teniendo en cuenta los aspectos descritos en el protocolo, los animales de todos los grupos mantuvieron un buen aspecto físico en cuanto a postura, condición de pelo, comportamiento individual, buena actividad dentro de los corrales, sin cambios relevantes como respuesta a la manipulación. La apariencia de las heces fue consistente, sin cuadros de diarrea o vómitos durante el tiempo que duró el ensayo. La ingesta tanto de agua como de alimento se mantuvo constante, sin conductas agresivas o de agitación entre los animales, para mantener un acceso adecuado a los mismos. Así, se pudo evidenciar que las formulaciones empleadas no generaron alteraciones en los animales, que pudieran comprometer de alguna forma su bienestar físico, manteniéndose un comportamiento uniforme entre todos los grupos evaluados.

3.4.2 Temperatura corporal

En la figura 3.3 se muestran las temperaturas de los animales, registradas para cada grupo, las cuales no superaron los 40,8 °C; mostrando una baja en los días posteriores a las vacunaciones (tanto primo vacunación como el *booster*), y recuperando su temperatura normal dentro de los siguientes 4 días, según monitoreo diario.

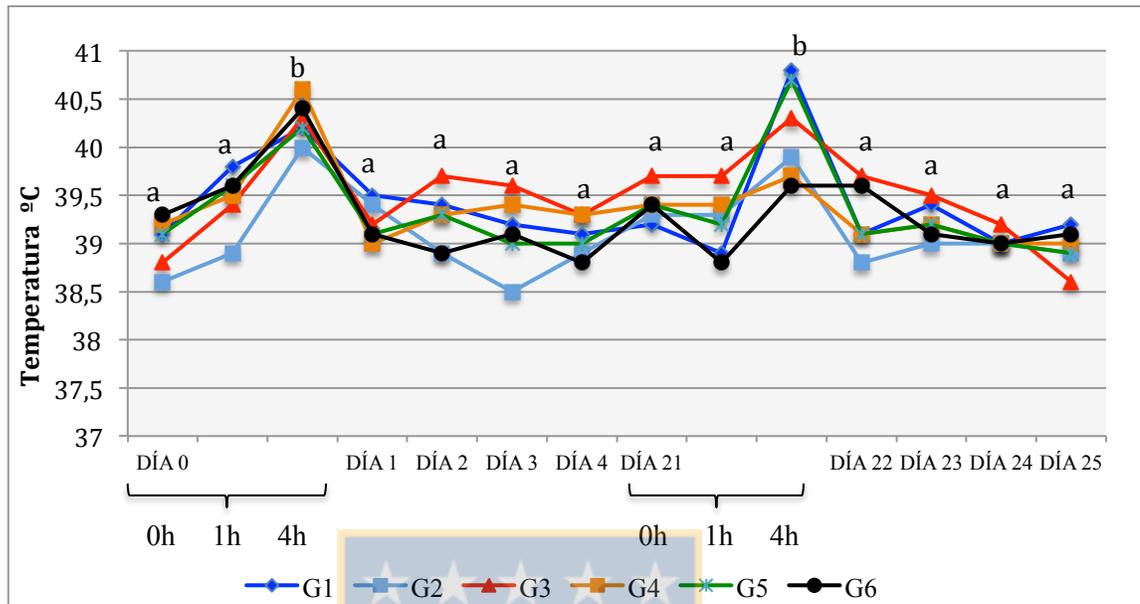


Figura 3.3. Valor promedio de las variaciones de temperatura (°C), obtenidas desde el momento de la vacunación (día 0) hasta el día 25 clasificadas por grupo experimental. Letras diferentes en superíndice (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días de muestreo dentro de un grupo. Fuente: Elaboración propia

Según lo descrito por Mount (1968), se considera que la temperatura normal de un cerdo, al tomarla vía rectal, fluctúa entre los 38,7 °C y 39,8 °C, con algunas variaciones dependiendo de la etapa en la que el animal se encuentre. En este estudio, todos los animales comenzaron con una temperatura basal cercana a los 39 °C, observándose los picos más altos a las 4 h después de las inmunizaciones, tanto en el día 1 (40,3 °C), como en el día 21 (40,8 °C), siendo estos valores estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) a las otras temperaturas tomadas durante el ensayo dentro de un mismo grupo. Estos resultados coinciden con datos publicados por Zhu *et al.* (2015), quienes llevaron a cabo

inmunizaciones en cerdos en donde todos los animales presentaron un aumento en la temperatura rectal superior a 40 °C, regresando a sus niveles normales al tercer día. En este estudio con el prototipo de vacuna evaluado, la temperatura se normalizó a las 24h después de las inmunizaciones, bajando a un promedio de 39,2 °C y 39,1 °C en los días 1 y 21, respectivamente. Opriessnig *et al.* (2014) ha reportado resultados similares, con un aumento de la temperatura rectal de hasta 40,5 °C, incluso hasta 36 h posterior a la inmunización. Este aumento transitorio de la temperatura (media de 1 °C) es frecuente durante las primeras 24 horas tras la vacunación; incluso, en determinados cerdos, el incremento de la temperatura en comparación con la temperatura antes del tratamiento frecuentemente puede exceder los 2 °C, pero estos cambios suelen normalizarse espontáneamente en un plazo no superior a 48 horas sin necesidad de tratamiento alguno, según Opriessnig *et al.* (2014). Este leve aumento se debe a un mecanismo esperado por parte del organismo, ya que de por sí, se está inyectando en los animales un compuesto que es reconocido como extraño y por lo tanto, es una respuesta natural como mecanismo de defensa, que posteriormente se normaliza mediante la termorregulación. Esta termorregulación, tal y como lo señalan Zimmerman *et al.* (2012), se refiere al control de la temperatura corporal que el animal lleva a cabo mediante diversos mecanismos y comportamientos propios, y en el caso de los cerdos, al ser considerados organismos homeotermos endotermos, se

entiende que mantienen su temperatura corporal constante en un amplio rango de tiempo bajo ciertas condiciones ambientales.

Como se observa en la figura anterior, todos los grupos (tanto experimentales como controles), registraron un aumento de temperatura de 1,3 °C en promedio, después de la primo vacunación y 0.7 °C en promedio, después de la aplicación del *booster*, aumento que es estadísticamente significativo ($p < 0,05$) al comparar con la temperatura promedio que presentaba cada grupo experimental en los otros tiempos de muestreo. Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para las mediciones que se realizaron entre los grupos experimentales a un mismo tiempo del ensayo. Posterior a ello, las temperaturas se mantuvieron en un promedio de 39,2 °C en los días subsiguientes, lo cual estuvo dentro de los parámetros esperados. Cabe resaltar que el efecto del uso del INF α dentro de la formulación vacunal no muestra un impacto relevante entre los grupos experimentales (G1 y G2, G3 y G4), como se muestra en la figura 3.4.

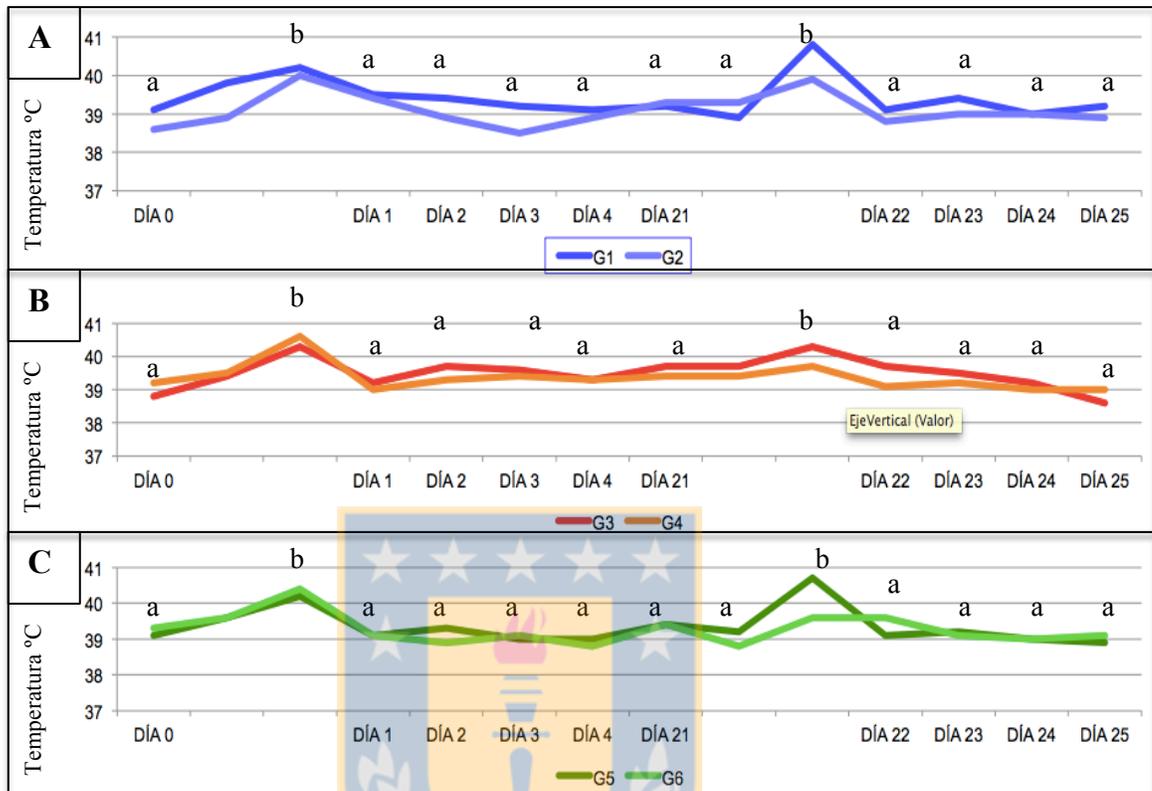


Figura 3.4. Valor promedio de las temperaturas (°C), obtenidas desde el momento de la vacunación (día 0) hasta el día 25 clasificadas por grupo experimental. (A) Grupos 1 y 2; Q1 sin y con IFN α , respectivamente (B) Grupos 3 y 4; CAP sin y con IFN α , respectivamente y (C) Grupos 5 y 6; MP36 y PBS 1x, respectivamente. Letras diferentes en superíndice (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días de muestreo dentro de un par de grupos. Fuente: Elaboración propia

Con estas observaciones, se corrobora que la utilización del IFN α dentro de la formulación vacunal no altera la sintomatología clínica respecto a la temperatura corporal de los animales tanto vacunados como controles, ya que no se observa una diferencia considerable en la respuesta física, siendo ésta similar en todos los grupos.

3.4.3 Ganancia de peso

Además de la temperatura, se evaluó el peso de los animales, como se muestra en la figura 3.5, donde se observa un aumento sostenido en el peso en todos los grupos experimentales.

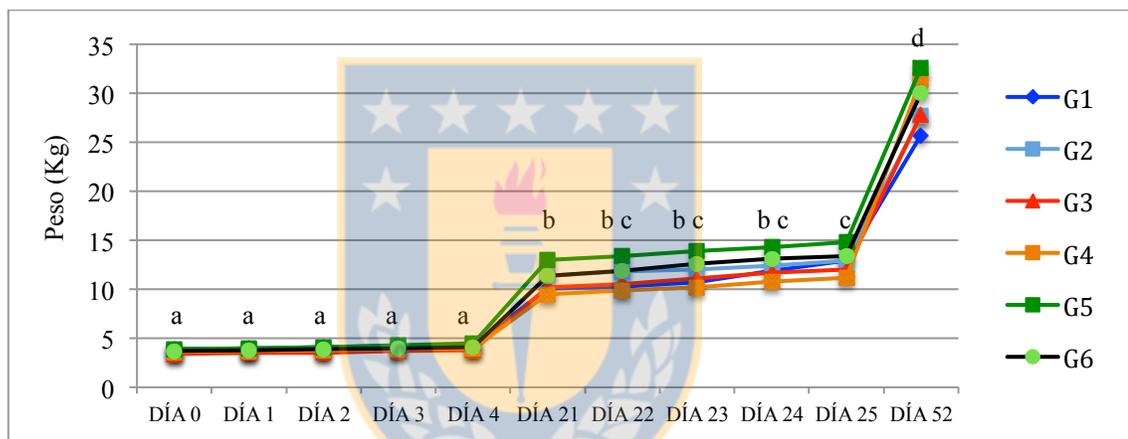


Figura 3.5 Valor promedio de las mediciones de peso en cada uno de los grupos desde día 0 hasta el día 52 del ensayo. Letras diferentes (a, b, c) en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre los días de muestreo dentro de un mismo grupo experimental ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia

Es importante resaltar que todos los grupos coincidieron en un aumento paulatino de peso durante el ensayo, sin observarse signos de adelgazamiento o inanición en ninguno de los animales. Durante los días 1 al 4, no es muy notable el aumento de peso, probablemente porque es un periodo de tiempo muy corto para observar diferencias considerables; aunque en los días

posteriores al *booster* (días 21 al 25) sí se evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), puede ser porque aunque sigue siendo un corto periodo de tiempo, en este punto los animales estaban más grandes, y por lo tanto estos leves cambios resultan más notorios. Ante estos resultados, lo más relevante es señalar que no se observó disminución de peso en ninguno de los animales, lo cual es de gran importancia a nivel comercial, debido a la relevancia económica que generan en el rubro las ganancias de peso en periodos determinados de tiempo, pues considerando la capacidad digestiva del cerdo, los gastos de alimentación representan un porcentaje importante dentro de la cadena productiva, sobre el 70%, según han descrito autores como Grepe (2001) y Roldán y Durán (2006).

En la figura 3.6 se muestra la ganancia de peso a los 21 y 52 días, según los registros obtenidos en el ensayo, donde no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p > 0,05$).

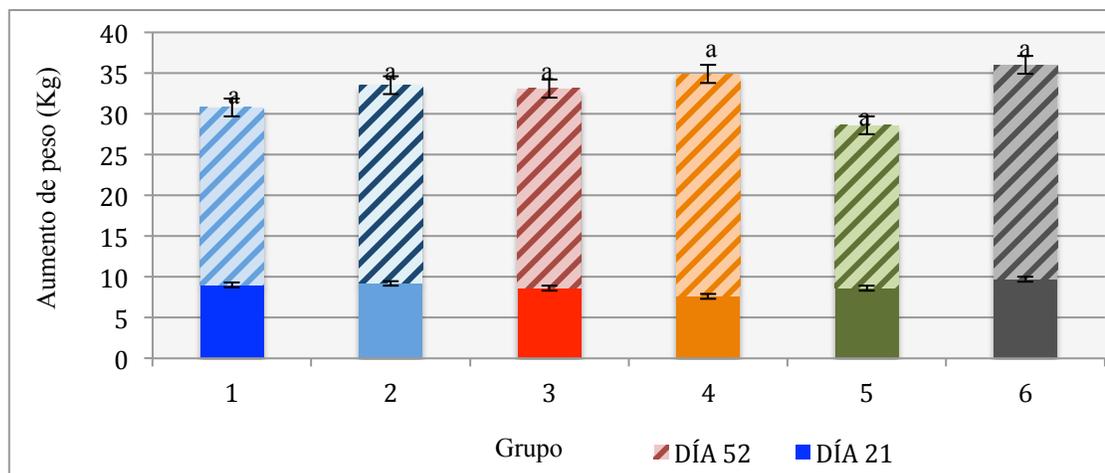


Figura 3.6 Valor promedio de ganancia de peso en cada uno de los grupos a los días 21 y 52 del ensayo, clasificados por grupo experimental. Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). La barra indica la desviación estándar. Fuente: Elaboración propia

La determinación de la ganancia de peso se obtuvo restando, al peso final, el peso inicial del periodo: así, a los 21 días del ensayo, el promedio de peso fue de 10,9 kg, lo que equivale a un aumento promedio de 7,2 kg (peso al día 21 – peso al día 0 del ensayo). Como se observa en la figura 3.6, el grupo 6 (control negativo, PBS) registró el mayor aumento de peso a los 21 días y el segundo más alto a los 52 días, con un valor total de 36 kg a los 52 días del ensayo; mientras que el grupo 5 (control negativo, MP36) registró el menor aumento de peso al día 52 (20 kg). En contraste, a los 21 días del ensayo, el grupo 4 (Cap + INF α) presentó un menor aumento de peso al día 21 (7,6 kg), repuntando en el día 52 con la mayor ganancia de peso entre los grupos (27,3 kg); sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p >$

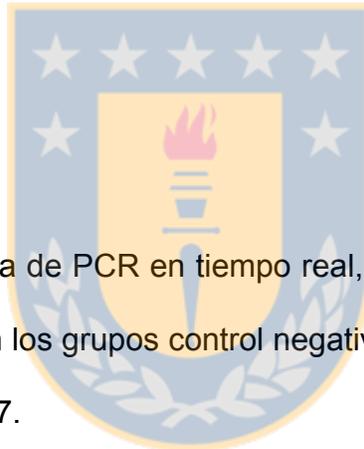
0,05) al comparar el aumento de peso durante el ensayo entre los diferentes grupos experimentales. Con esta base, se observa que si bien es cierto que los grupos 2 y 4 tuvieron una leve mayor ganancia de peso con respecto a sus pares 1 y 3, respectivamente, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$); pero sí es evidente una tendencia a un mayor aumento de peso en los grupos que presentaban el IFN α como parte de su formulación vacunal, especialmente después del desafío, lo que podría suponer que la presencia del IFN α en la formulación vacunal favorece la condición corporal en los animales vacunados; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los grupos 1 y 2, tuvieron una ganancia diaria de peso promedio de 0,434 kg hasta el día 21 y de 0,443 kg hasta el día 52, valores similares a los publicados por Villa *et al.* (2013), quienes reportaron un promedio de aumento diario de peso de 0,417 kg en cerdos vacunados con Circovac, a las 10 semanas de vida. Por su parte, Soukup y Dušek (2010) estudiaron el efecto de la vacunación de lechones con Circovac a los 21 días de edad en granjas con problemas de PCVD, mostrando un promedio de ganancia diaria de peso de 0,434 kg durante las etapas posteriores al destete. Cabe recordar que el destete es uno de los momentos más críticos en la vida del cerdo, ya que de forma abrupta, el lechón se ve sometido a tres tipos de estrés: pierden el instinto protector de la madre tras su separación física, son alojados en nuevas instalaciones donde han de

convivir con sus hermanos pero también con otras camadas y además, sufren un estrés nutritivo al pasar de consumir leche a consumir pienso sólido. López *et al.* (2018) afirman que un destete a los 21 días se puede catalogar como "exitoso" si se consiguen crecimientos iguales o superiores 0,400 kg/día durante la sexta semana de vida, valor cercano al obtenido en este estudio, por lo que se infiere que las ganancias de peso obtenidas resultan acordes a lo esperado en un sistema de producción intensivo.

3.4.4 Carga viral

Por medio de la técnica de PCR en tiempo real, se evidenció un aumento de la carga viral presente en los grupos control negativo posterior al desafío, como se muestra en la figura 3.7.



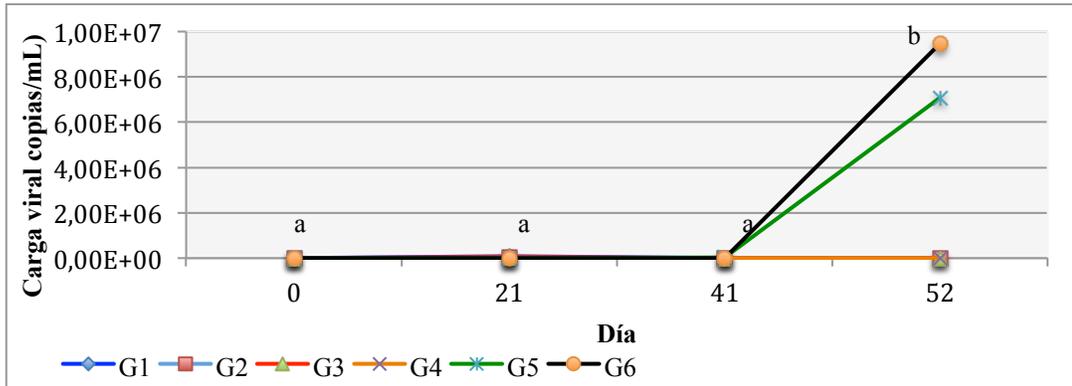


Figura 3.7. Valores promedio de carga viral (No.copias/mL) de cada grupo a los días 0 (primovacunación), 21 (*booster*) 41 (7 días post desafío) y 52 (fin del ensayo). Letras diferentes (a, b) en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre los días de muestreo ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia

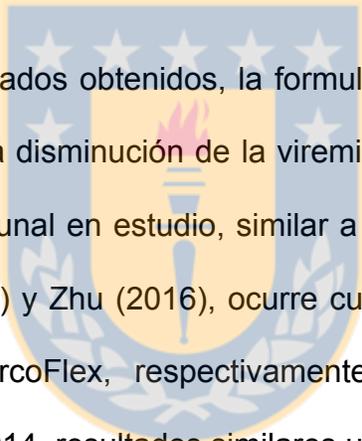
Todos los grupos comenzaron el ensayo con una carga viral cercana a $1,92 \times 10^3$ copias/mL, manteniendo valores similares entre los grupos sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) incluso hasta el día 41 (7 días postdesafío). Entre la primovacunación (día 0) y el *booster* (día 21) se observó un leve aumento de la carga viral en todos los grupos, comportamiento que comenzó a diferenciarse en el día 41 ya que, aunque en el gráfico no es muy notoria esta diferencia, sí se observó una mayor carga viral en los grupos 5 y 6, siendo éstos los controles negativos. Esta diferencia se ve realmente reflejada, y es estadísticamente significativa ($p < 0,05$), ya en el día 52 hacia el término del estudio. En este punto se observa que, mientras los grupos experimentales y controles positivos se mantienen en valores de carga viral entre 0 copias /mL (grupos 1, 3 y 4) y $2,44 \times 10^3$ copias /mL (grupo 2), los controles negativos sí

experimentaron un aumento considerable de la carga viral llegando a valores de $7,06 \times 10^6$ copias/mL en el grupos 5 y $9,45 \times 10^6$ en el grupo 6. Por lo tanto, queda demostrado que la utilización de la quimera en la formulación vacunal, es efectiva para disminuir la carga viral en los animales justo después de entrar éstos, en contacto con el virus, como suele ocurrir bajo condiciones de campo, considerando la ubicuidad del virus.

Esta disminución de carga viral hacia el final del ensayo, concuerda con los resultados obtenidos por Opriessnig *et al.* (2014), quienes reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las viremias de los grupos estudiados, siendo mayor en el grupo control (9Log_{10} copias/mL), que en el grupo vacunado con Circumvent. En el año 2016, Zhu *et al.*, publicaron también resultados de un estudio en donde determinaron la carga viral en suero de animales vacunados con CircoFlex, encontrando que la carga viral se mantenía en un nivel promedio de $8,5 \text{Log}_{10}$ copias /mL en los grupos controles no vacunados e inoculados con PCV2.

Cabe resaltar que la carga viral, es una de las principales diferencias entre la infección clínica y la infección subclínica y, se usa para categorizar a los cerdos como infectados sub-clínicamente con PCV2 ($<10^6$ copias ADN/mL), sospechosos (10^6 - 10^7 copias ADN/mL) o positivos para PCVAD ($>10^7$ copias ADN/mL), según lo descrito por autores como Liu *et al.* (2000), Olvera *et al.*

(2004) y Opriessnig *et al.* (2009). Así, con los valores obtenidos al día 52 por los grupos 5 ($7,06 \times 10^6$ copias/mL) y 6 ($9,45 \times 10^6$ copias/mL), se pueden reportar estos controles negativos como sospechosos a infección por PCV2; ahora, tal y como lo afirma Grau-Roma *et al.* (2009), se debe considerar que aunque la PCR se mantiene como una técnica muy útil para diagnosticar la enfermedad en el animal, hace falta más evidencia para determinar el estatus sanitario de una granja.



Con base en los resultados obtenidos, la formulación vacunal (con y sin IFN α) sí resultó efectiva en la disminución de la viremia en los animales inmunizados con la formulación vacunal en estudio, similar a lo que, según lo reportado por Opriessnig *et al.* (2014) y Zhu (2016), ocurre cuando se inmunizan cerdos con con Circumvent y CircoFlex, respectivamente. Por su parte, Won *et al.* publicaron en el año 2014, resultados similares utilizando la vacuna Foster; por lo que se puede afirmar que la vacuna empleada en este estudio presenta un comportamiento similar a las vacunas comerciales presentes en el mercado, respecto a sus efectos sobre la carga viral en suero; sin embargo, la presencia de IFN α en la formulación vacunal, no generó cambios significativos en la carga viral a partir de los cuales se pudiera concluir un efecto benéfico en la disminución de la viremia. Con base en los resultados obtenidos, se observa entonces, que el uso de la quimera dentro de la formulación vacunal, es suficiente para mantener una carga viral baja en los animales expuestos al virus

en altas concentraciones, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) cuando la formulación vacunal incluye el IFN α . Basado en estos resultados, es necesario realizar más estudios con diferentes concentraciones de interferon, así como evaluar si existe una respuesta diferente del IFN α al ser obtenido de diferentes especies.

3.4.5 Título de anticuerpos

Dado que la fórmula utilizada para determinar el título de anticuerpos corresponde al logaritmo del valor S/P (Título de anticuerpos = $\text{Antilog} [\text{Log } 10 (1,1 * \text{Log} (S/P) + 3,361)]$) y por ende, el comportamiento de las curvas es idéntico entre los valores S/P y los títulos de anticuerpos, los resultados están presentados en gráficos que muestran los valores S/P.

Al realizar los análisis de sangre, se observó que los resultados obtenidos por la técnica de Elisa no fueron tan concluyentes si se consideran las muestras como positivas o negativas; pero aunque la mayoría de los animales no superaron el valor de S/P de 0,500, sí hubo un aumento de estos valores en los días posteriores a la aplicación del *booster*, como se muestra en la figura 3.8.

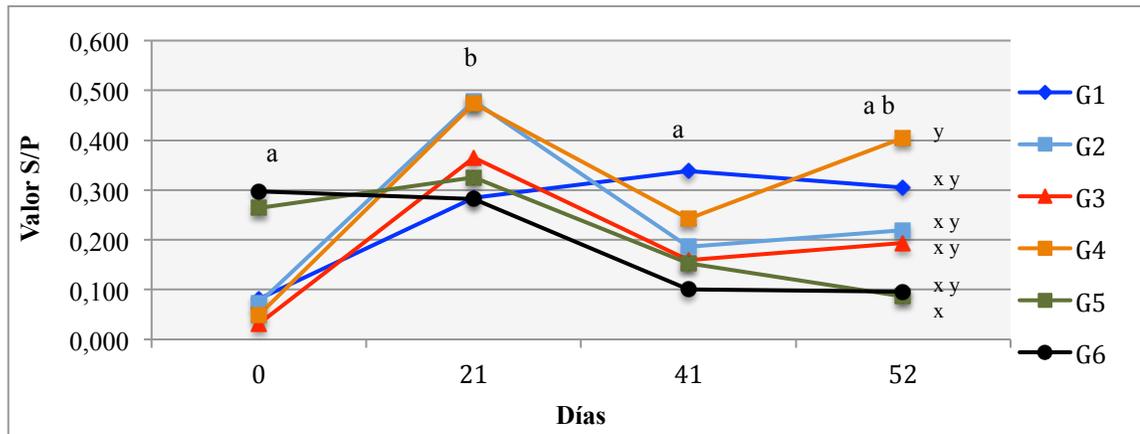


Figura 3.8. Valores S/P promedio de las muestras de sangre analizadas por Elisa en las diferentes etapas del ensayo (día 0, día 21, 41 y 52) clasificadas por grupo experimental. Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre los días (a, b) y entre los grupos (x, y) ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia

Debido a las diferencias en los valores S/P en el día 0, y con la finalidad de obtener resultados más representativos, se decidió agrupar a los animales de acuerdo a sus valores S/P, dejando aquellos que resultaron negativos por la técnica de Elisa (pero con valores S/P más altos), como controles negativos (Grupos 5 y 6). Por su parte, los animales correspondientes a los grupos 1 al 4 comenzaron con valores S/P entre 0,032 y 0,082, siendo estadísticamente diferentes a los grupos 5 y 6 ($p < 0,05$) en este punto del ensayo. Esto se basó en el hecho que se quería estudiar si al inmunizar los animales con la formulación vacunal podíamos tener una respuesta del sistema inmune, mientras que en los controles al no ser inmunizados esperábamos que los

valores continuaran bajando, pues este valor detectado por el ELISA corresponde a la caída de la inmunidad pasiva.

La etapa de vacunación de los animales en este estudio, coincidió con la etapa de seroconversión que se espera tenga lugar en los lechones, tiempo en que según Segalés (2011), se comienzan a desarrollar anticuerpos específicos detectables en suero sanguíneo, cuya variabilidad en títulos puede estar influenciada por la cantidad de anticuerpos provenientes de las madres, generando en algunos casos cierta interferencia de la inmunidad pasiva. En los plantales comerciales, la mayoría de las madres son seropositivas para PCV2, lo cual implica que los lechones adquieren anticuerpos maternos contra el virus a través del calostro, y aunque éstos son muy importantes para proteger al lechón durante sus primeros días de vida, es importante señalar que su sistema inmune no se encuentra aún desarrollado por completo, acorde a lo publicado por Sangild (2003). Así, estos valores iniciales de S/P al día 0, coinciden con el tiempo en el que Opriessnig *et al.* (2004) señala, los anticuerpos maternos van cumpliendo su vida media.

Para el día 21 del ensayo, se observó un aumento notorio en los valores de S/P para los grupos 1 al 4, mientras que el grupo 5 se mantuvo en niveles muy similares y junto al grupo 6 (ambos controles negativos) mostraron una tendencia constante a la baja desde el día 21 al día 52 del ensayo. Ahora,

aunque los grupos 2, 3 y 4, disminuyeron sus valores S/P en la segunda ventana de tiempo (entre los días 21 y 41), mostraron un aumento en los días posteriores al desafío, lo cual concuerda con los resultados esperados, teniendo en cuenta que al entrar en contacto con el virus, los animales vacunados fueron capaces de generar una mayor producción de anticuerpos, que en los grupos no inmunizados, respuesta que fue más notoria en el grupo 4 (CAP + INF α), que contenía en su formulación vacunal el INF α . Por su parte, el grupo 1 (Q1) fue el único que mantuvo una tendencia de aumento constante, pero los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas con su par que incluye el INF α (grupo 2). Es importante señalar que a pesar de estas variaciones observadas en los valores S/P o títulos de anticuerpo, los animales se mantuvieron en promedio, seronegativos durante todo el estudio.

Así, teniendo en cuenta que para el día 41, los animales estaban ya en contacto con el virus posterior al desafío, el aumento que mostraron los grupos 1, 2, 3 y 4, contrario a los controles negativos, puede deberse a que al entrar en contacto con el virus, el organismo fue capaz de generar una mayor respuesta en cuanto al título de anticuerpos, lo que no sucedió en los grupos 5 y 6.

Estos resultados coinciden con los publicados por Min-Kyoung *et al.* (2015), en cuyo estudio se evaluó la respuesta frente a la inmunización con 3 vacunas comerciales diferentes (CircoFlex, Circunvent y Porcilis), mostrando un aumento en los niveles de anticuerpo posterior a la vacunación, similar a lo que ocurrió al

día 21 en este ensayo. Posteriormente y, similar a lo que se observa en el gráfico al día 41, estos valores tendieron a disminuir, lo que no implicó necesariamente, que la protección hubiera disminuido, ya que después de entrar en contacto con el virus, los animales fueron capaces de responder con una alza en sus títulos de anticuerpo para contrarrestar la infección. Adicionalmente, Jeong *et al.* (2015) han reportado valores superiores en los grupos vacunados desde el día 28 posterior a la vacunación, manteniéndose incluso hasta el día 91. En este estudio se realizó seguimiento solamente hasta el día 17 post-desafío pero hasta este momento del ensayo, la tendencia fue hacia el aumento de los títulos de anticuerpo.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos no fueron los esperados con respecto a la comparación entre los animales vacunados con y sin IFN α en la formulación vacunal empleada, ya que según lo publicado por autores como Toledo *et al.* (2010), Yu *et al.* (2019) y Liu *et al.* (2019), el uso del IFN α combinado a vacunas contra patógenos virales, es efectivo para aliviar los signos clínicos en cerdos durante las primeras etapas de infección incluso después de desafíos experimentales, por lo que se hubiera esperado un aumento en los títulos de anticuerpo en estos grupos; sin embargo, los grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

3.4.6. Histopatología

Las muestras de tejido (piel y fascia muscular) de la zona de inyección, no mostraron evidencia de ningún tipo de alteración histopatológica, lo cual concuerda con los resultados esperados, ya que, al no ser perceptibles cambios importantes en el examen físico posterior a la inyección, era de esperarse que, con tantos días posteriores a la manipulación, no hubieran signos de alguna respuesta inflamatoria. A la necropsia en el día 52, no se observaron alteraciones o signos de enfermedad en ninguno de los animales. Los animales, tanto de los grupos experimentales como de los grupos control, no presentaron tampoco lesiones que hicieran sospechar de algún cuadro clínico, encontrándose todos los órganos y tejidos sin alteraciones evidentes; ésto se corroboró mediante histopatología de los tejidos linfoides (linfonódulo inguinal, linfonódulo mesentérico, linfonódulo retrofaríngeo, linfonódulo mediastínico), datos que no forman parte de esta tesis. A diferencia de otras publicaciones en donde sí se han encontrado lesiones histopatológicas en los órganos afectados, en este estudio no fue posible reproducir el cuadro clínico a pesar de haber realizado el desafío. Datos reportados por Darwich y Mateu en el año 2012, han confirmado la presencia de signos clínicos con lesiones histopatológicas de los tejidos linfoides en los animales afectados, mostrando una severa depleción linfoide, acompañado de una infiltración difusa de células histiocíticas; ésto, como indicativo del potencial de la respuesta inflamatoria de la infección viral.

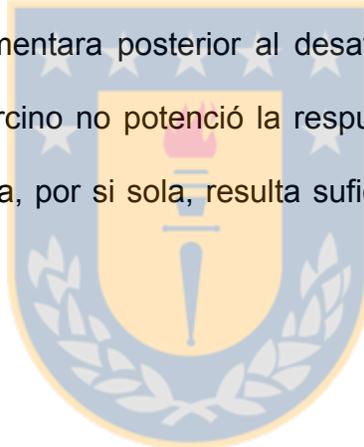
Como se mencionó, esta ausencia de lesiones no resulta extraña, ya que si bien es cierto todos los animales fueron desafiados con una concentración importante del virus, reproducir el cuadro clínico de PMWS ha sido posible solamente en algunas ocasiones, como lo demuestran Darwich y Mateu (2012), siendo muy difícil reproducir la enfermedad a nivel experimental cuando se usa solamente el PCV2 sin otros cofactores, como en el caso de este estudio. Una vez que el animal entra en contacto con el virus, éste puede persistir por varios días en las células dendríticas sin causar daño y/o signos de apoptosis por lo que, como sugieren Beach y Meng (2012), el virus podría estar usando las mismas células dendríticas como mecanismo de diseminación y transmisión, sin generar cuadros clínicos en el animal infectado.

Los resultados de este capítulo, indican entonces que la formulación vacunal ensayada (quimera 1) generó una respuesta positiva en los animales vacunados, la cual resultó evidente en los días posteriores a la aplicación del *booster*, lo que sugiere que al entrar en contacto con el virus, los animales vacunados logran generar una respuesta frente a la infección, aumentando los títulos de anticuerpos y logrando disminuir simultáneamente, la carga viral en su torrente sanguíneo. Por su parte, la formulación vacunal que incluía el INF α además de la quimera, si bien generó un comportamiento similar respecto a las variables evaluadas, su respuesta fue menos aguda que la formulación sin el INF α , por lo que se plantea utilizar, para futuras investigaciones, solamente la

formulación vacunal utilizada en el grupo 1, que contiene solamente la quimera seleccionada en el capítulo II de esta tesis.

3.5 Conclusiones

3.5.1 Los prototipos de vacuna ensayadas fueron efectivos en los animales inmunizados, sin producir efectos secundarios negativos en estos, impidiendo que la carga viral aumentara posterior al desafío con PCV2; sin embargo, la presencia de IFN α porcino no potenció la respuesta frente a la infección viral; por lo tanto, la quimera, por si sola, resulta suficiente para ser empleada en la vacuna propuesta.



3.6 Referencias bibliográficas

1. Asano, A., Kon, Y., Agui, T. (2004). The mRNA regulation of porcine double-stranded RNA- activated protein kinase gene. *J Vet Med Sci.* 66: 1523–1528.
2. Beach, M., Meng, X. (2012). Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164: 33-42.
3. Bonjardim, C. (2005). Interferons (INFs) are key cytokines in both innate and adaptatives antiviral immune responses and virus counteract INF action. *Microbes Infect.* 7: 569-578.
4. Grau-Roma, L., Hjulsager, C., Sibila, M., Kristensen, C., Lopez-Soria, S., Enoe, C., Casal, J., Botner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., Larsen, L. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol.* 135: 272-282.
5. Jeong, J., Park, C., Choi, K., Chae, C. (2015). Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. *Vet Microbiol.* 177: 42-52.
6. Darwich, L., Mateu, E. (2012) Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research.* 164: 61-67.
7. Grepe N. Crianza de porcinos. *Ed. Iberoamericana S.A. de C.V.* México, D.F. 2001: 45.
8. Katze, M., He Y., Gale, M. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol.* 2: 675-687.
9. Liu, Q., Wang, L., Willson, P., Babiuk, A. (2000). Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with post weaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 38: 3474–3477.
10. Liu, I., Fan, W., Zhang, H., Zhang, S., Cui, L., Wang, M., Bai, L., Yang, W., Sun, L., Yang, L., Liu, W., Li, J. (2019). Interferon as a mucosal adjuvant for an influenza vaccine in pigs. *Virologica Sinica.* 34:324–333.

11. López, S., Gasa, J., Temple, D., Bonet, J., Coma, J., Solà, D. (2018). Strategies to improve the growth and homogeneity of growing-finishing pigs: feeder space and feeding management. *Porcine Health Manag.* 4: 14-23.
12. Madson, D., Opriessnig, T. (2011). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostic and vaccination. *Anim Health Res Rev.* 12: 47-65.
13. McKeown, N., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P., Meng, X. (2005). Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12: 1347-1351.
14. Min-Kyoung, S., Seung, H., Myung, H., Young, S., Seung, W., Han, S. (2015). Assessing PCV2 antibodies in field pigs vaccinated with different porcine circovirus 2 vaccines using two commercial ELISA systems. *J Vet Sci.* 16(1): 25–29.
15. Morton, D., Griffiths, P. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec.* 116: 431–436.
16. Mount LE. (1968). The climatic physiology of the pig. *London: Edward Arnold.*
17. Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Domingo, M. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in post weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods.* 117: 75–80.
18. Opriessnig, T., Yu, S., Thacker, E., Halbur, P. (2004). Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *J Swine Health Prod.* 12: 186-191.
19. Opriessnig, T., Patterson, A., Elsener, J., Meng, X., Halbur, P. (2008). Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clin Vaccine Immunol.* 15: 397-401.
20. Opriessnig, T., Patterson, A., Madson, D., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J., Juhan, N., Meng, X., Halbur, P. (2009). Difference in severity of

porcine circovirus type 2 (PCV2) induced pathological lesions between Landrace and Pietra in pigs. *J Anim Sci.* 87: 1582-1590.

21. Opriessnig, T., Xiao, C., Gerber, P., Halbur, P., Matzinger, S., Meng, X. (2014). Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *J Gen Virol.* 95: 2495-2503.
22. Opriessnig, T., Karuppanan, A., Halbur, P., Calvert, J., Nitzel, G., Matzinger, S., Meng, X. (2020). Porcine circovirus type 2a or 2b based experimental vaccines provide protection against PCV2d/porcine parvovirus 2 co-challenge. *Vaccine.* 38: 1975-1981.
23. Roldán, R., Durán, F. (2006). Manual de explotación y reproducción en porcinos, 1° ed. Editorial grupo latino. Colombia.
24. Sangild, P. (2003). Uptake of colostral immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. *Acta Vet Scan Supl.* 98: 105-122.
25. Soukup I., Dušek, P. (2010). Effect of piglets PCV2 vaccination with CIRCOVAC® in the farm with severe porcine circovirus type 2 disease (PCVD) in post-weaning. *Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada*, Pp 381.
26. Toledo, R., Barrera, M., Farnós, O., Gómez, S., Rodríguez, M., Agüero, F., Ormazabal, V., Parra, N., Suárez, L., Sánchez, O. (2010). Human α IFN co-formulated with milk derived E2-CSFV protein induce early full protection in vaccinated pigs. *Vaccine* 28: 7907–7914
27. Villa, A., Huerta, R., Córdova, S., S Ortega, S., Trejo, A. (2013). Efecto de la vacunación de cerdas y lechones contra circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en la ganancia de peso y porcentaje de mortalidad en México. *Arch Med Vet.* 45: 145-149.
28. Won, H., Park, C., Han, K., Chae, C. (2014). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2-viremic piglets after experimental PCV2 challenge. *Vet Res.* 45: 13-21.
29. Yu, H., Qu, M., Zhang, J., Gan, L., Zhao, Y., Zhou, W., Xia, B., Chen, J., Wang, M., Zhao, J. (2019). Recombinant Porcine Interferon Alpha Enhances Immune Responses to Killed Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccine in Pigs. *Viral Immunol.* 32. 383-392.

30. Zhu, Z., Wang, N., Zhan, Y., Wang, Z., Wang, Z., Wang, A., Deng, Z., Yang, Y. (2015). Complete genome sequence of Porcine Circovirus strain 102 with a novel mutation, isolated from Hunan Province, China. *Genome Announc.* 3 (3): 411-415.
31. Zhu, S., Zhang, C., Wang, J., Wei, L., Quan, R., Yang, J., Li, Z., She, R., Hu, F., Liu, J. (2016). Immunity elicited by an experimental vaccine based on recombinant flagellin-porcine Circovirus type 2 Cap fusion protein in piglets. *PLos One.* 11(2): e0147432-e0147447.
32. Zimmerman, J. (2012). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)., Publicado en *Diseases of Swine*, 10th Ed., Wiley – Blackwell eds. Págs. 461 – 486.



CAPITULO IV

EVALUACIÓN DE SEGURIDAD Y POTENCIA



4.1 Introducción

Las acciones preventivas y de control de enfermedades en los sistemas de producción intensiva se basan en un buen manejo sanitario, que involucra el uso de vacunas para favorecer la producción de anticuerpos específicos y con ello, una defensa inmune contra microorganismos patógenos como el PCV2 (Kekarainen *et al.*, 2010). Debido a la enfermedad sistémica que este virus produce en cerdos, y a sus implicaciones económicas en la industria, PCV2 ha sido blanco de estudio para la producción de vacunas. En la actualidad autores como Oppriessnig *et al.* (2019) y Fablet *et al.* (2018), coinciden en señalar los beneficios del uso masivo de vacunas comerciales para contrarrestar la infección viral. Con esta base, y retomando lo publicado por Chae (2012), la protección que otorga una vacuna debe ser relevante y específica para el agente patógeno y debe producir una respuesta adecuada al tipo de inmunidad que se desea estimular. Estas vacunas deben estar constituidas por el o los antígenos necesarios para obtener una respuesta protectora adecuada.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) plantea normas básicas para la producción de vacunas veterinarias según el Manual de la OIE sobre animales terrestres (2019). Por lo tanto, las vacunas diseñadas deben cumplir

con los estándares de calidad establecidos por la OIE, minimizando así cualquier factor que pueda alterar los beneficios esperados.

Según este lineamiento, dentro de las condiciones que debe cumplir una vacuna, están entonces: i) entregar al animal vacunado una protección específica frente a la enfermedad pertinente, aunque en algunos casos no necesariamente impida la infección o colonización del patógeno en particular ii) la protección producida por la vacuna debe ser lo más larga posible en el tiempo; iii) no producir efectos colaterales indeseables; además de, iv) cumplir una serie de exigencias inherentes al producto mismo como su estabilidad, su potencia, susceptibilidad de almacenamiento, su fácil manejo y su no peligrosidad para el operador.

Con respecto a las pruebas de potencia, éstas están destinadas a evaluar la concentración del antígeno en el producto. En el caso de las vacunas basadas en proteínas purificadas, la determinación de la potencia debe efectuarse por métodos inmunoenzimáticos, que cuantifiquen el contenido antigénico, expresado en microgramos por dosis (μg /dosis). Adicionalmente, debe ser evaluada la seguridad para su uso en animales objeto de la vacuna, con el fin de descartar efectos adversos. Éstas, son pruebas cuyos resultados no son atribuibles al sustrato antigénico en sí, ya que están destinadas a probar que los prototipos de vacunas estén libres de elementos o sustancias que causen

reacciones indeseables, generales o locales. Estas disposiciones, se refuerzan con lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), respecto a la inocuidad de las vacunas, lo que implica que no origine ningún signo clínico patológico al ser inyectada a los animales, ni trastornos de ningún tipo en su estado y comportamiento general, además de no ser causa de enfermedades específicas.

Estas manifestaciones patológicas a las que se hace referencia, deben distinguirse de las reacciones propias de la vacunación, como signos benignos perfectamente tolerables, propios de la aplicación de la vacuna, conocidos como reacciones vacunales. Deben entenderse como propias, las inflamaciones locales tras la aplicación de vacunas con o sin adyuvantes, o ligeras elevaciones de la temperatura corporal después de inyectar determinadas vacunas (OMS, 2019).

Basado en lo expuesto anteriormente, este capítulo tiene como finalidad determinar la seguridad y potencia del prototipo de vacuna diseñado.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Comparar diferentes dosis de la formulación vacunal, con respecto a su seguridad, para su utilización en cerdos.

4.2.2. Medir la respuesta de inmunidad humoral generada en cerdos, para determinar la potencia de la formulación vacunal.

4.3. Materiales y métodos

Los experimentos para la evaluación de seguridad y potencia se realizaron en cerdos, correspondientes a una mezcla de animales híbridos originados de la cruce entre las razas Large White y Landrace. En cada uno de los diseños experimentales, se consideró el principio de las tres “R” de Russell y Burch (1959) que se refieren básicamente a la necesidad de: i) Reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, ii) Reducir su número cuando sea necesario y iii) Refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento. Los ensayos fueron realizados en espacios adecuados para este fin en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, en el Campus Chillán, según protocolos autorizados por el Comité de ética de la Universidad de Concepción, según certificado emitido en enero de 2012 (Anexo 5). Durante el tiempo que duró el estudio, los animales recibieron suministro de agua potable y una ración comercial de acuerdo a los requerimientos de su edad, administrada de forma *ad libitum*.

4.3.1 Diseño experimental

Se generaron 4 grupos de un total de 40 cerdos, incluido el grupo control, para evaluar la seguridad y potencia de la formulación vacunal preparada en el capítulo II de esta tesis, la cual contenía entonces una concentración establecida de proteína total (conteniendo Cap), Montanide ISA 15A VG (Seppic) y búfer fosfato salino (PBS; 10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,2). Se evaluaron así, diferentes concentraciones de las dosis establecida en la preparación (dosis 1x= 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como se muestra en el diseño experimental de la figura 4.1.

Para poder estimar una diferencia del valor SP entre los grupos de 0,7, considerando una confianza en la estimación del 95%, un poder estadístico del 80%, una varianza común de 0.2 y con un contraste de hipótesis de dos colas, se necesitan al menos 6 animales en cada grupo.

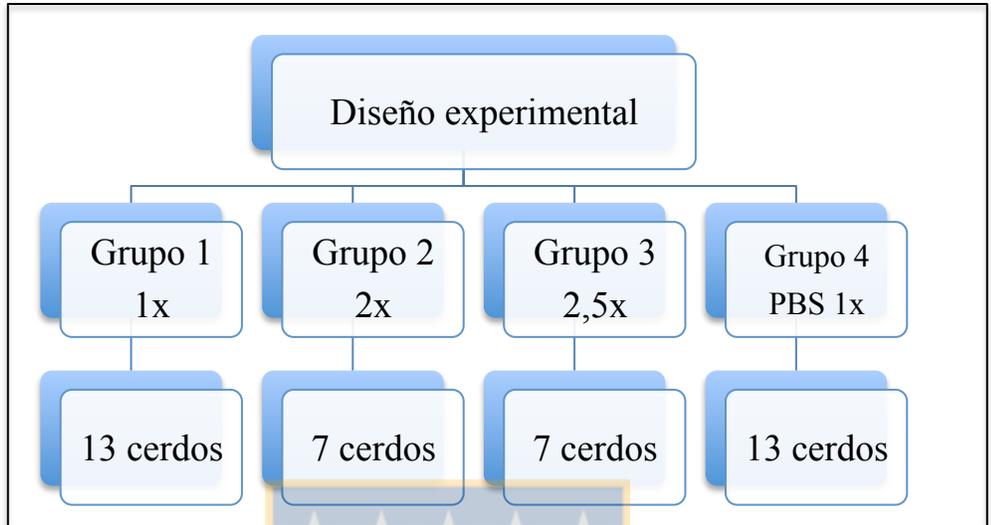


Figura 4.1 Descripción del diseño experimental, indicando los grupos con sus respectivos tratamientos y el número de animales para cada uno de ellos (n=40). Grupos 1 a 3 corresponden a diferentes dosis de la vacuna experimental (1x, 2x, 2,5x, respectivamente) y grupo 4 corresponde al control negativo, a cuyos animales se les administró una dosis de buffer fosfato (PBS) 1x. Fuente: Elaboración propia

Adicionalmente, en la figura 4.2 se presenta el esquema del diseño cronológico de procedimientos durante el ensayo.

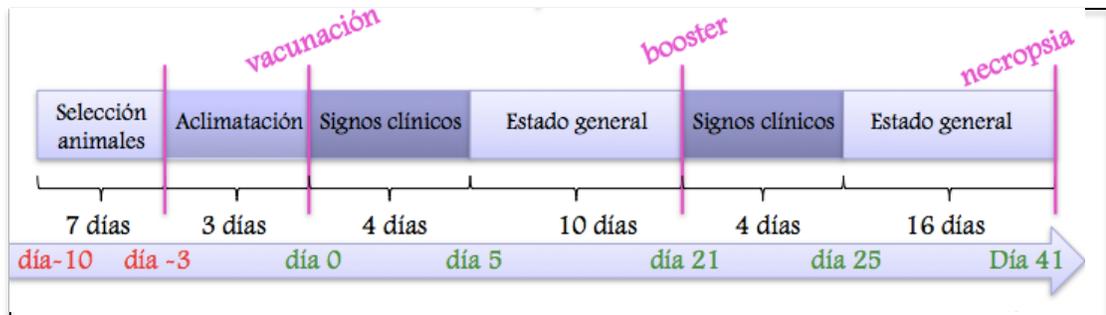


Figura 4.2 Diseño cronológico del manejo de los animales, señalando los días entre cada uno de los procedimientos: día 0 (vacunación), día 21 (*booster*) y día 41 (necropsia). Fuente: Elaboración propia

Para el ensayo, se emplearon animales de 3 semanas de edad, que fueron seleccionados con 7 días de antelación a partir de un muestreo aleatorio de 100 animales provenientes de un mismo plantel con un alto nivel sanitario, teniendo en cuenta que tuvieran un origen, raza y crianza uniforme, todos libres de cuadros clínicos de PMWS, con carga viral $\leq 10^5$ copias/ μ L, lo que es considerado como un animal sano (Liu *et al.*, 2000; Olvera *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2009), detectada por medio de PCR en tiempo real, y con los niveles más bajos de anticuerpos, detectados por técnica de Elisa. Una vez evaluados y seleccionados, los animales se mantuvieron en las instalaciones de la universidad destinadas al experimento, durante 3 días previos al inicio de los ensayos, para permitir su aclimatación, cumpliendo con la Directiva del Parlamento Europeo de 22.09.2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, específicamente pág. 64-65, referente a la

densidad de los animales por m². Los cerdos se inmunizaron al comienzo del ensayo (día 0), a una edad de 24 días de vida, más un *booster* en el día 21 post vacunación inicial.

4.3.2 Análisis microbiológico

Previo a la inmunización, se evaluó la esterilidad de la emulsión vacunal mediante siembra en caldo tioglicolato, Agar sangre y Agar McConkey, incubados en anaerobiosis estricta, microaerofilia y aerobiosis a 37 °C por 48 h para descartar presencia de bacterias, así como en Agar Saburoud a 25 °C por 5 días, para descartar presencia de hongos y levaduras. Se realizó además frotis y tinción Gram para visualizar la presencia de microorganismos, según protocolos estandarizados del Laboratorio de Diagnóstico Porcino de la Universidad de Concepción.

4.3.3 Inmunización y toma de muestras

Se emplearon procedimientos estándares de inyección por ruta parenteral intramuscular. A los grupos 1 al 3, se les administró intramuscularmente 2 mL de la formulación vacunal, en la parte posterior del cuello. Se evaluaron tres concentraciones diferentes de la emulsión equivalentes a: la dosis x ($x = 600$

$\mu\text{g/mL}$ proteína total, según preparación de las emulsiones descrita en el capítulo II de esta tesis doctoral), y las dosis 2x y 2,5x en los grupos 2 y 3, respectivamente; además del grupo 4 (control) que recibió solamente 2 mL de búfer fosfato salino (PBS; 10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,2), como placebo. Antes del momento de vacunación, se tomó muestra de sangre a cada animal, todas desde la vena yugular, en volúmenes analíticos de 5 mL, en tubos vacutainer (BD Diagnostic Systems) con y sin anticoagulante (EDTA), para luego ser mantenidas a 4 °C y llevadas al laboratorio en un plazo no superior a 4 h para su análisis por medio de las técnicas de ELISA y PCR en tiempo real. Todos los protocolos contemplaron el bienestar y normal desarrollo de los animales tratados, según certificado emitido por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción, en enero de 2012 (Anexo 5).

Para determinar cualquier efecto asociado a la concentración utilizada en los grupos experimentales, se registró el peso de los animales (día 0, 4, 21, 25 y 41), además de su temperatura rectal 1 h y 4 h después de la inmunización, verificando adicionalmente, si existía inflamación en el punto de inoculación. Todos los cerdos se observaron durante las 5 semanas siguientes. Durante los 4 primeros días post vacunación, se registró diariamente la temperatura rectal y peso individual de cada animal, para determinar la ganancia diaria de peso. Además, se evaluaron parámetros como: i) diámetro de inflamación en punto de inoculación ii) apariencia de las heces con respecto a consistencia, color,

presencia de mucus y sangre, iii) ingesta de agua, iv) comportamiento y v) signos de dolor y sufrimiento relacionados con la aplicación de la vacuna, de manera de no superar la puntuación del segundo rango que va de 5 – 9 según lo señalado por Morton y Griffiths (1985) en el protocolo de supervisión animal.

Entre los días 5 y 14 postvacunación, se observó y palpó el sitio de inoculación y el estado general de cada animal. En el día 21 postvacunación, se tomó la siguiente muestra de sangre y se registró nuevamente el peso antes de recibir la segunda dosis de la vacuna o placebo. Se midió nuevamente la temperatura rectal 1 h y 4 h después de la inmunización, verificando la zona para descartar algún tipo de inflamación en el punto de inoculación. Durante los siguientes 4 días post *booster*, se registró diariamente la temperatura rectal y peso individual de cada animal, para determinar su ganancia diaria de peso. Se evaluaron además, los siguientes parámetros: i) diámetro de inflamación en punto de inoculación ii) apariencia de las heces con respecto a consistencia, color, presencia de mucus y sangre, iii) ingesta de agua, iv) comportamiento y v) signos de dolor y sufrimiento (Morton y Griffiths, 1985) relacionados con la aplicación de la vacuna. Entre los días 22 y 25 post vacunación se observó y palpó el sitio de inoculación y el estado general de cada animal. En el día 41, después de 6 semanas de la primovacunación, se tomaron las últimas muestras de sangre y registros de peso, para dar fin al ensayo experimental.

4.3.4 Cuantificación de carga viral

A partir del suero porcino, se extrajo ADN utilizando el kit comercial QIAamp DNA Mini kit (Qiagen), según protocolo recomendado por el fabricante, determinando la concentración de ADN, en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (BioTek). La curva estándar se realizó con 5 diluciones seriadas (1:10) utilizadas por duplicado en cada punto de la curva, de un cultivo puro del virus, a una concentración de $2,4 \times 10^9$ copias/mL. Como controles positivos se utilizaron 2 muestras de campo de animales positivos con concentraciones de $1,5 \times 10^9$ copias/mL y $6,2 \times 10^{10}$ copias/mL; y como control negativo se incluyó agua en la mezcla maestra, reemplazando al templado de ADN, según protocolo estandarizado en el Laboratorio de Diagnóstico Porcino de la Universidad de Concepción.

Para la reacción de PCR se utilizó el kit SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline) en un volumen final de 10 μ L (mezcla: 5 μ L de Sensimix 5x, 2,5 μ L de agua estéril libre de nucleasas, 10 pmoles de cada partidor y 2 μ L de ADN), con los partidores forward: 5'TGGCCCGCAGTATTCTGATT3' y reverse: 5'CAGCTGGGACAGCAGTTGAG3' para amplificar un fragmento del gen de la cápside (71 pb), según publicación de Opriessnig *et al.* en el año 2003. Las reacciones fueron corridas en el equipo Stratagene-Mx3000P™ PCR en

Tiempo Real (Stratagene). La normalización se realizó utilizando los niveles de carga viral en suero de lechones sin vacunar y sin signos clínicos.

4.3.5 Medición de títulos de anticuerpos

Posteriormente, se midieron los títulos de anticuerpos anti PCV2 por medio de ELISA indirecta (Biocheck), según indicaciones del fabricante. Cada suero, en dilución 1:50, se dispuso en los pocillos de la placa comercial, que se incubó posteriormente con anticuerpo anti cerdo, marcado con fosfatasa alcalina, para detectar los complejos antígeno-anticuerpo en cada pocillo. La intensidad del color amarillo, según los controles internos del kit, corresponden directamente a la concentración del anticuerpo anti-PCV2 presente en la muestra. Se consideraron positivas las muestras cuyo valor SP (Sample to positive Ratio [cantidad de anticuerpo en la muestra con referencia al control positivo]) fue mayor a 0,500, según lectura a una absorbancia de 405 nm en espectrofotómetro Multiskan Ex (Thermo). El valor S/P se calculó con la siguiente fórmula, según protocolo del fabricante:

$$SP = \frac{\text{media de la muestra} - \text{media del control negativo}}{\text{media del control positivo} - \text{media del control negativo}}$$

4.3.6 Eutanasia

Una vez finalizado el ensayo, todos los animales se eutanasiaron previa sedación con maleato de acepromazina (1,1 mg/kg), para luego administrárseles una sobredosis intravenosa de tiopental sódico (Bestpharma) diluido al 5 %, (50 mg/kg). Posteriormente, fueron sometidos a necropsia reglada del Laboratorio de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Campus Chillan, en búsqueda de cualquier alteración presente en los animales. Con la finalidad de determinar el efecto local en la zona de inyección, se tomó una muestra de piel y músculo de esta zona para análisis histopatológico, las cuales fueron procesadas por el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Con la finalidad de descartar lesiones atribuibles a la infección por PCV2, se realizó histopatología a los tejidos linfoides (linfonódulo inguinal, linfonódulo mesentérico, linfonódulo retrofaríngeo, linfonódulo mediastínico). Los restos de animales y tejido se almacenaron en contenedores apropiados a 4 °C y fueron desechados posteriormente bajo las normas de seguridad definidas de acuerdo a la legislación vigente, las cuales están implementadas por la Facultad de Ciencias Veterinarias.

4.3.7 Linfoproliferación

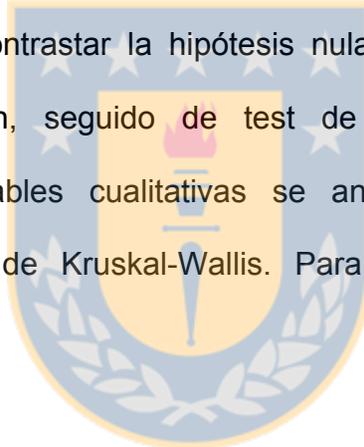
La evaluación de la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés de *peripheral blood mononucleated cells*), se realizó utilizando la sangre recolectada en los tubos con EDTA. Las células se aislaron mezclando 15 mL de sangre entera con 15 mL de PBS al 1X, depositándolos en 15 mL de Ficoll Histopaque-1077 (Sigma, 10771), se centrifugaron a 400 g por 30 minutos. La fracción de PBMC fue aislada y se lavó dos veces con PBS al 1X centrifugándolas a 1500 g por 10 minutos y el *pellet* resultante se resuspendió en medio RPMI 1640 (Biological Industries) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF) inactivado, manteniéndose en hielo hasta su uso. Las mediciones se realizaron a los días 0, 21, y 41.

Se contaron y ajustaron las células para ser dispensadas en una razón de 2×10^4 células /mL. El antígeno empleado para medir la estimulación *in vitro* fue la proteína de Cap (a una concentración de 12,3 µg/mL, obtenida en el Capítulo II de esta tesis); como control positivo se utilizó como activador policlonal LPS (lipopolisacárido), a una concentración de 1,5 µg/pocillo, y como control negativo se sirvieron pocillos solamente con con RPMI 1640. Todos los antígenos se inocularon en 100 µl de RPMI y se hicieron tres réplicas por antígeno; se dejó incubando con 5% de CO₂, a 37 °C por 96 h. El conteo se realizó por medio de un contador de células automático LUNA, con réplicas de

conteo; según protocolo estandarizado por el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de Concepción.

4.3.8 Análisis estadístico

Los datos registrados de peso, temperatura, carga viral y títulos de producción de anticuerpos se evaluaron mediante análisis de varianza no paramétrica Kruskal-Wallis para contrastar la hipótesis nula de que las medias de las 4 poblaciones coinciden, seguido de test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las variables cualitativas se analizaron mediante estadística descriptiva con test de Kruskal-Wallis. Para ello, se utilizó el programa estadístico Infostat/L.



4.4 Resultados y Discusión

Actualmente, las vacunas disponibles comercialmente reducen la viremia en granjas afectadas con PMWS o PCVD, acorde a lo publicado por autores como Fachinger *et al.* (2008), Kixmoller *et al.* (2008), Fort *et al.* (2009) y Martelli *et al.* (2011), contribuyendo de manera importante tanto en la disminución de las tasas de mortalidad, como en el mejoramiento del crecimiento animal.

El Instituto de Salud Pública (ISP) de Chile, menciona a las vacunas como la medida de salud pública más eficaz en reducir la mortalidad y las secuelas provocadas por las enfermedades infecciosas tanto en humanos como animales, con beneficios incluso mayores al uso de antibióticos en la terapéutica. Ahora, cabe resaltar que aunque el beneficio que aportan las vacunas al evitar el contagio de enfermedades potencialmente mortales es mucho mayor a cualquier riesgo, es importante contar con un efectivo sistema de monitoreo de su seguridad, similar a cualquier otro medicamento o intervención sanitaria.

4.4.1 Análisis microbiológico

La emulsión preparada para este ensayo se mantuvo siempre en condiciones refrigeradas a 4°C, o sumergidas en hielo durante los momentos de transporte para ser llevadas a los corrales en los días de aplicación en los animales. Mediante el análisis microbiológico, no se evidenció crecimiento de bacterias u hongos, garantizando así su esterilidad. En el medio líquido utilizado, no se visualizó turbidez y/o formación de sedimento o película, lo cual habría sido señal de crecimiento microbiano; y en los medios sólidos utilizados, se evaluó la presencia de unidades formadoras de colonia (UFC), sin evidencia de crecimiento. Este tipo de ensayos para productos farmacéuticos fueron publicados por primera vez en la Farmacopea Británica del año 1932 y

posteriormente acogidos también por la Farmacopea de Estados Unidos (USP) XI en el año 1936. Por lo tanto, se puede afirmar que el lote utilizado para la inmunización de los animales cumple con los estándares establecidos por la OMS (2019), ya que las vacunas, al ser productos biológicos, aplicables a la prevención, tratamiento o curación de enfermedades, están regidas por unas normas de calidad para su producción, establecidas por la OMS. Este control de calidad incluye un control microbiológico, en donde las pruebas de inocuidad sirven para demostrar que el producto es inofensivo para su uso en animales, determinando la ausencia o presencia de microorganismos patógenos contaminantes (OMS, 2019). Estos parámetros permiten además, evaluar la estabilidad de las vacunas, es decir, su capacidad para mantener estables sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biológicas, dentro de las especificaciones indicadas, hasta su fecha de caducidad. Estos estudios se pueden realizar en diferentes etapas, incluyendo: su desarrollo, ensayos clínicos, producción, registro, liberación de lotes y el monitoreo posterior a la comercialización, según lo recomendado por la OIE.

Los productos biológicos, como la formulación vacunal que se empleó en este estudio, se distinguen de otras sustancias farmacéuticas en que se obtienen a partir de organismos vivos o productos de estos, ya sean microorganismos normales o genéticamente modificados, y que con frecuencia tienen una estructura molecular compleja, tal como mencionan Beach y Meng en su

publicación de 2012, en donde hacen referencia a las diferentes alternativas de vacunas biológicas, específicamente contra PCV2. Debido a la naturaleza biológica de la materia prima de estos productos, en este caso puntual levadura, es preciso dar especial consideración a su calidad, tanto en el proceso de fabricación, como en los ensayos para caracterizar cada lote. Así, debe considerarse entonces que estos adelantos tecnológicos deben ir siempre, acompañados de mecanismos apropiados para garantizar la inocuidad, calidad y eficacia de los productos.

4.4.2 Condición físico-clínica de los animales

Todos los animales llegaron con un buen estado de salud y los días de aclimatación antes de comenzar el ensayo fueron importantes para estar seguros de la uniformidad en el estado de los mismos. Después de las inmunizaciones (tanto primovacunación como *booster*), ninguno de los animales mostró síntomas de enfermedad causada por la dosis de la vacuna; así como tampoco se observaron reacciones adversas en el punto de inoculación. Se habría esperado posiblemente, alguna inflamación local como una reacción frecuente en el sitio de administración, pero si tuvo lugar, ésta fue imperceptible y/o transitoria, sin manifestación alguna de dolor local o eritema. Uno de los factores que favorece la ausencia de estos signos de inflamación es el adyuvante que se utiliza; básicamente para favorecer la respuesta inmune del

organismo ante el antígeno presente en la vacuna, según lo publicado por Chedid (1978), quien describe el modo de acción de los adyuvantes, como un secuestro del antígeno para mantenerlo en el sitio de inoculación y permitir así una liberación lenta en la circulación sanguínea. El Montanide ISA 15A VG es un adyuvante a base de aceite mineral con el que se diseñó esta formulación de aceite en agua, que comprende un aceite mineral inyectable de alta calidad y un emulsionante refinado obtenido a partir de manitol y ácido oleico purificado de origen vegetal, libre de ingredientes de origen animal (Seppic). Éste adyuvante cuenta con la aprobación del Comité Europeo de Seguridad de Medicamentos Veterinarios para uso en productos inmunológicos, considerándose seguro para su uso en vacunas en cerdos.

Para poder evaluar posibles signos de dolor causados por los procedimientos realizados, en este estudio se aplicó el protocolo de supervisión de los animales propuesto por Morton y Griffiths (1985). De tal forma, y teniendo en cuenta los aspectos descritos en el protocolo, los animales de todos los grupos mantuvieron un buen aspecto físico en cuanto a postura, condición de pelo, comportamiento individual, buena actividad dentro de los corrales, sin cambios relevantes como respuesta a la manipulación. La apariencia de las heces fue consistente, sin cuadros de diarrea o vómitos durante el tiempo que duró el ensayo. La ingesta tanto de agua como de alimento se mantuvo constante, sin comportamientos agresivos o de agitación entre los animales, para mantener un

acceso adecuado a los mismos. Estas condiciones favorecen la seguridad de la formulación vacunal garantizando que el bienestar de los animales no se vea alterado por su uso y, se evidencia entonces, que los animales se mantuvieron sanos bajo condiciones ambientales adecuadas.

4.4.3 Temperatura corporal

Conforme crecen los lechones, sus condiciones y requerimientos físicos varían según se van acondicionando al ambiente en el que se encuentran. En este ámbito, la temperatura juega un rol directo en la cadena productiva y al momento de enfrentarse ante una vacuna, ésta debe ser monitoreada de tal forma que se logre correlacionar con su comportamiento e ingesta de alimento. En la figura 4.3 se muestran los valores correspondientes a las mediciones de temperatura, desde el día 1 hasta el término del ensayo en el día 41.

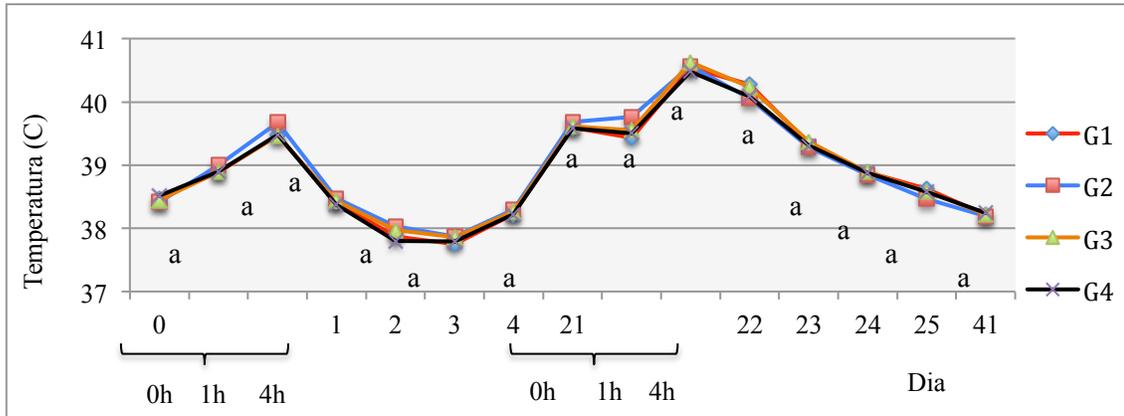


Figura 4.3 Valor promedio de las variaciones de temperatura (°C), obtenidas desde el momento de la vacunación (día 0) hasta el final del ensayo (día 41) clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). Letras diferentes en superíndice (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos en un mismo día. Fuente: Elaboración propia.

Todos los cerdos mantuvieron una temperatura rectal promedio cercana a los 38 °C y en el gráfico se logra apreciar cómo en las primeras horas después de la aplicación de la vacuna, hubo un aumento de 1 °C entre el momento de la inyección y las 4 h posteriores; sin embargo, al día siguiente, es evidente una disminución inmediata de la temperatura, estabilizándose en un valor de 38,1 °C en promedio. Posterior al *booster*, la temperatura aumentó nuevamente alcanzado el pico más alto con 40,6 °C, debido a la manipulación y nueva inyección con la formulación vacunal, comenzando a descender solamente al segundo día post *booster*, logrando estabilizarse nuevamente a sus niveles basales en el día 25.

Las temperaturas rectales tomadas, se mantuvieron similares entre los animales de cada grupo e incluso, entre los diferentes grupos del ensayo, sin observarse diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos. Este mantenimiento de la temperatura corporal de los cerdos es finalmente, como indican Sanmiguel y Díaz (2011), el resultado de su metabolismo, además de un conjunto de procesos mediante los cuales los animales son capaces de transformar los alimentos en proteínas, hidratos de carbono y grasas, liberando energía en forma de calor; y que se vió alterado momentáneamente por la inoculación de un componente novedoso para el organismo, por lo que los días de la aplicación de la vacuna (día 0 y día 21), se observaron los picos más altos de temperatura en las horas subsiguientes, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los otros días del ensayo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Huan *et al.* (2018) y Opriessnig *et al.* (2003), quienes han descrito, tras la aplicación de una vacuna contra PCV2, un aumento de la temperatura rectal en algunos animales de 1,4 °C durante dos días, y en algunos cerdos de hasta 2,5 °C; pero similar a lo que ocurrió en este estudio, este aumento no se mantuvo más allá de 48h después de la inyección.

La diferencia de temperatura entre los picos de los días 0 y 21 fue de 1 °C en promedio, siendo más alto el valor obtenido posterior al *booster*, que aquel correspondiente a la primovacunación. En la primera dosis, se buscó generar una respuesta por parte del organismo frente al inóculo inyectado, lo cual pudo

haber generado este leve aumento de temperatura, lo que resultó más evidente con la administración del *booster*, pudiendo ésto, deberse a que el sistema inmune fue capaz de reaccionar de una manera mucho más rápida e intensa que en la primera administración.

Cabe resaltar que el grupo control (G4) mantuvo un comportamiento similar a los grupos experimentales, lo que implica que los leves cambios de temperatura se deben principalmente a la manipulación de los animales más no a cambios derivados particularmente de la formulación vacunal que se está ensayando.

4.4.4 Ganancia de peso

En la Fig. 4.4 se muestran los promedios de las mediciones de peso de los animales en cada uno de los grupos.



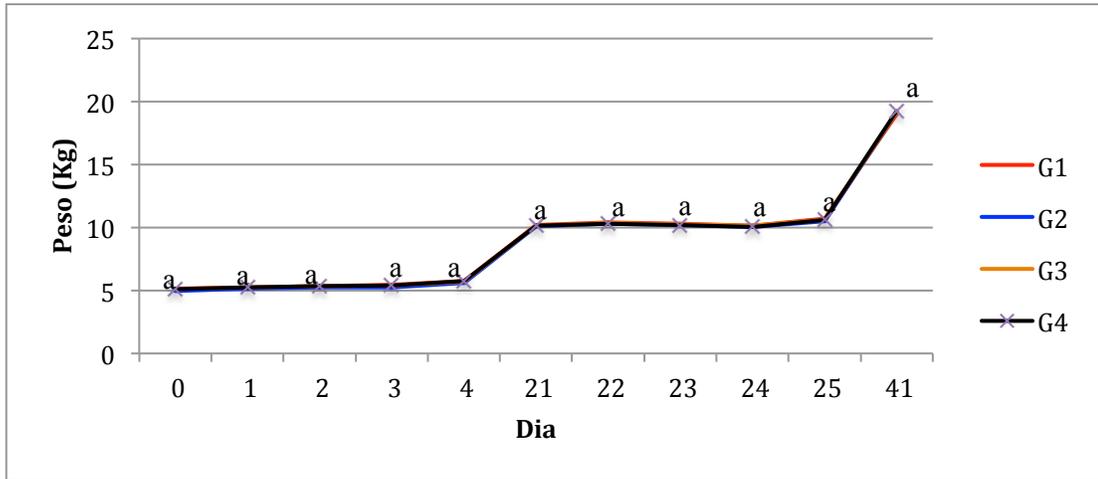


Figura 4.4 Valor promedio de las mediciones de peso desde día 0 hasta el día 41 del ensayo clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). Letras diferentes en superíndice (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos en un mismo día. Fuente: Elaboración propia.

Durante los primeros días del ensayo, los animales mantuvieron un peso constante, aumentando solamente 0,620 kg en promedio durante los primeros 4 días, tiempo muy corto para notar diferencias importantes; similar a lo que sucedió entre los días 21 y 25, en donde se observó un aumento promedio de solamente 0,438 kg; aún así, estas mediciones son mayores a las reportadas por Huan *et al.* (2018), en un estudio similar en donde se muestrean los mismos periodos postvacunación, en cuyos animales el aumento diario de peso fue de un rango entre 0,190 kg y 0,220 kg. Es importante señalar además que, incluso después de las inmunizaciones, ninguno de los animales se mantuvo o

disminuyó su ganancia diaria de peso, observándose una tendencia constante de aumento.

Al analizar el aumento de peso que registraron los animales entre el inicio y fin del ensayo, se observó un mejor comportamiento del grupo 1, similar al grupo control, que de los grupos 2 y 3, como se muestra en la figura 4.5. Es importante mencionar que esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

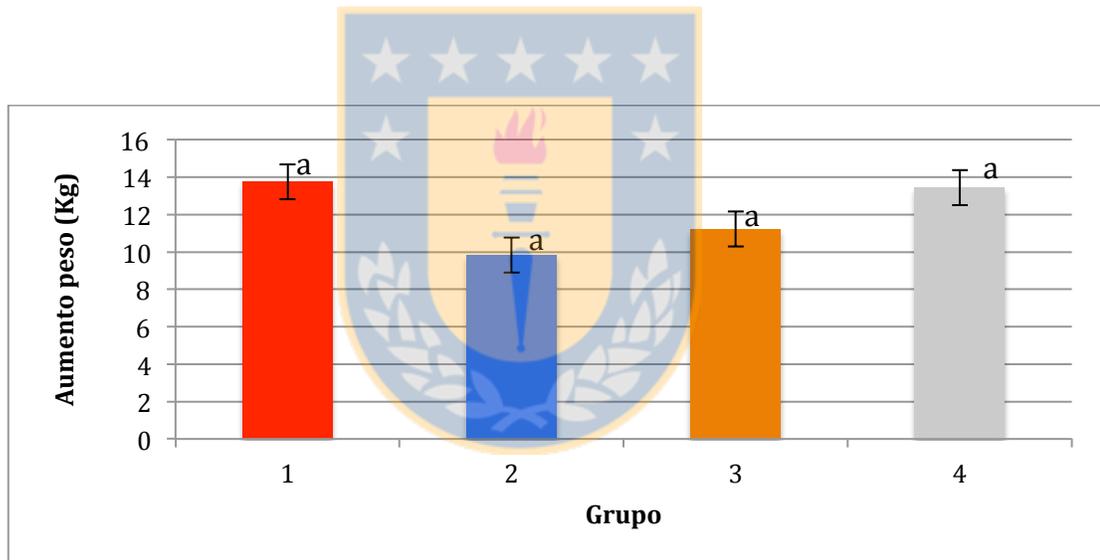


Figura 4.5 Valor promedio de ganancia de peso desde el día 0 hasta el día 41 del ensayo, clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativamente diferentes ($p < 0,05$). La barra indica la desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

Esta ganancia diaria de peso resulta útil para medir el comportamiento real de esta variable, teniendo en cuenta que los animales tenían ciertas variaciones de

peso al inicio del ensayo; así, es más fácil definir si los promedios observados correspondían, efectivamente, a una similitud entre los grupos. Dentro de los parámetros productivos en los planteles intensivos, Roldán y Durán (2006), así como Grepe (2008), sugieren que la ganancia diaria de peso tiene un valor muy relevante, considerando que la alimentación representa entre un 70 y 80% de los costos de producción. Por razones económicas, entonces, es de suma importancia que se logren pesos específicos en determinados periodos de tiempo, tanto en recría como en engorda, de acuerdo a Campabadal (2009). Es así, como en este ensayo, la diferencia de la ganancia de peso entre los grupos 1 y 4 fue de solamente 0,320 kg, mientras que el grupo control registró un promedio de 3,6 kg más de ganancia de peso que el grupo 2, y 2,2 kg más que el grupo 3. Desde el punto de vista comercial, diferencias cercanas incluso a los 4 kg son muy importantes por el impacto económico que éstas representan, pero en este estudio, las diferencias observadas no son estadísticamente significativas, lo que se podría deber al corto periodo de tiempo que duró el ensayo, además del reducido número de animales en cada grupo; por lo que para obtener información más valiosa al respecto, sería necesario un ensayo más prolongado en el tiempo y con un mayor número de animales.

Con estos resultados, se puede asumir entonces, que independientemente de la dosis utilizada en cada grupo de animales, éstos mantuvieron una alimentación pareja y un aumento de peso uniforme durante todo el ensayo, con

una tendencia positiva, favoreciendo el aprovechamiento del alimento y así, permitiendo un máximo potencial productivo, sin observarse diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el grupo control y el grupo 1, pero sí una tendencia a la baja a los grupos experimentales 2 y 3, que implicaban una mayor dosis (2x y 2,5x).

4.4.5 Carga viral

Para el inicio del ensayo, todos los animales fueron evaluados según su carga viral mediante la técnica de PCR en tiempo real, resultados que se muestran en la figura 4.6.

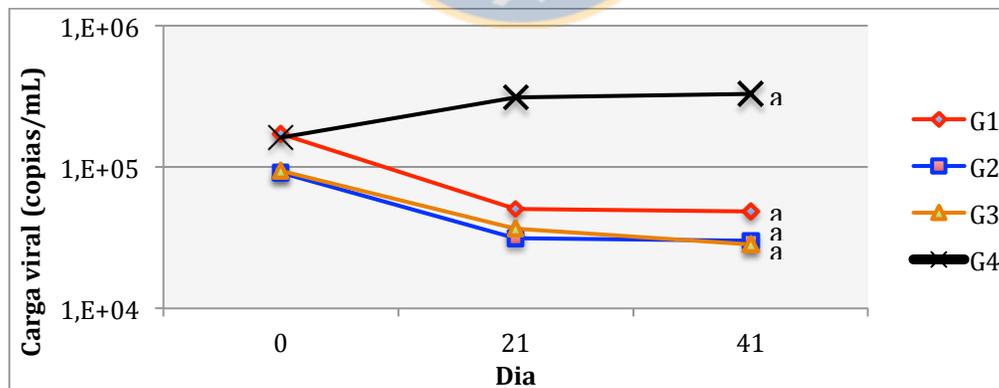


Figura 4.6 Valores promedio de carga viral (No.copias/mL) de cada grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo) a los días 0 (primovacunación), 21 (*booster*) y 41 (fin del ensayo). Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia

Aunque se observa una clara disminución en la carga viral de los tres grupos vacunados, en comparación con el grupo control, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Estos valores de carga viral concuerdan con la presencia del virus en los animales, pero de manera asintomática, teniendo en cuenta que todos son provenientes de un plantel comercial, portadores del virus; resultados similares a los publicados por *Opriessnig et al. (2010)*, en donde reportan una leve disminución de la carga viral desde 7 días después de la vacunación, empleando dos vacunas comerciales (Circovac y CircoFLEX).

Según estos resultados, la inmunización realizada con la formulación vacunal no evidenció un aumento en la carga viral de los animales vacunados a los 41 días. Todos los animales comenzaron el ensayo con valores cercanos a 1×10^5 copias/mL, debido a su distribución ubicua del virus, y se mantuvieron en rangos cercanos hasta el final del ensayo. El control negativo mantiene una leve alza durante el tiempo del estudio; sin embargo, no es representativo teniendo en cuenta que se mantiene dentro del rango de animales portadores, infectados sub-clínicamente, según referencias reportadas por autores como *Liu et al. (2000)*, *Olvera et al. (2004)* y *Opriessnig et al. (2009)*. Al margen de esta concentración, sí vale la pena resaltar una tendencia a la baja en la carga viral de los grupos 1 al 3 a los 41 días del ensayo. Estos resultados concuerdan con estudios realizados con vacunas comerciales, por *Segalés et al. (2009)*, *Kwan*

et al. (2012) y *Villa et al.* (2013), en donde las cargas virales se mantienen similares, posterior a la vacunación; sin embargo, sí se evidencia una menor incidencia de PMWS, mejorando los índices productivos, reduciendo así las tasas de mortalidad y mejorando la ganancia diaria de peso, aspectos que no fueron evaluados en este trabajo.

Con base en ello, la tendencia mundial que se observa respecto a la prevención de enfermedades porcinas producidas por PCV2 es la de buscar medidas estratégicas que, como señala *Fort et al.*, (2008), atenúen los niveles de carga viral de los animales dentro de los planteles de producción intensiva, ya que su eliminación es difícil e implicaría un alto costo económico debido a que el virus presenta un carácter ubicuo, altamente contagioso y de gran resistencia en el medio ambiente, según lo publicado por *Puvanendiran et al.*, (2011). Por lo mismo, actualmente las alternativas de investigación y desarrollo se basan en medidas que logren controlar la patología y sus efectos negativos sobre la producción.

4.4.6. Histopatología

A la necropsia en el día 41, no se observaron alteraciones o signos de enfermedad en ninguno de los animales, así como tampoco lesiones que hicieran sospechar de algún cuadro clínico, encontrándose todos los órganos y

tejidos sin alteraciones evidentes. Esto se corroboró mediante histopatología de los tejidos linfoides (linfonódulo inguinal, linfonódulo mesentérico, linfonódulo retrofaríngeo, linfonódulo mediastínico), en donde ninguna de las muestras presentó lesiones asociadas a PCV2 como las descritas por autores como Ambrogi *et al.* (2005), Torres (2007), Gavaudan *et al.* (2008) y Krakowka *et al.* (2005); como por ejemplo depleción linfocitaria, inflamación granulomatosa o presencia de células multinucleadas en los tejidos linfoides analizados. Las muestras de tejido (piel y fascia muscular) de la zona de inyección, no mostraron evidencia de ningún tipo de alteración histopatológica.

4.4.7 Título de anticuerpos

Dado que la fórmula utilizada para determinar el título de anticuerpos corresponde al logaritmo del valor S/P (Título de anticuerpos = $\text{Antilog} [\text{Log } 10 (1,1 * \text{Log} (SP) + 3,361)]$) y por ende, el comportamiento de las curvas es idéntico entre los valores S/P y los títulos de anticuerpos, los resultados están presentados en gráficos que muestran los valores S/P.

Los títulos de anticuerpo se analizaron mediante los resultados de un ELISA indirecta (Biocheck). En la figura 4.7 se encuentran graficados los promedios de los valores S/P para cada uno de los grupos experimentales.

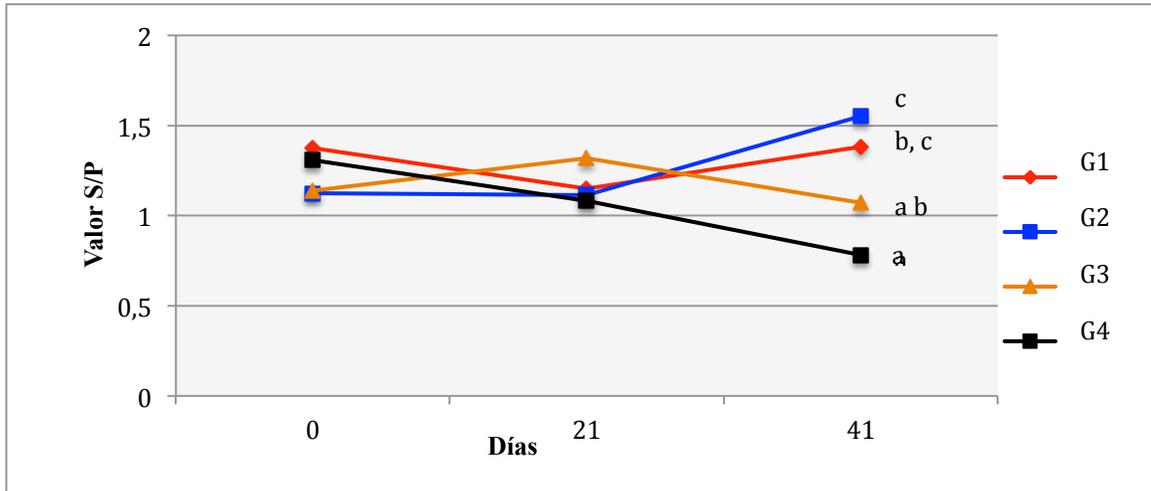


Figura 4.7 Valores S/P promedio de las muestras de sangre analizadas mediante ELISA indirecta (Biocheck), en las diferentes etapas del ensayo (día 0, día 21 y día 41), clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales en un mismo día de muestreo ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Todos los animales resultaron positivos en el muestreo del día 0, lo cual se puede relacionar con que las madres, al estar vacunadas, son seropositivas para PCV2, implicando que los lechones adquirieron anticuerpos maternos contra el virus a través del calostro, y tal como lo indica Sangild (2003), estos anticuerpos son muy importantes para proteger al neonato durante sus primeros días de vida, ya que su sistema inmune no se encuentra aún desarrollado por completo. Era de esperarse que estos anticuerpos decayeran después de una ventana de tiempo, pero tal y como lo menciona Opriessnig *et al.* (2004), esto depende de la concentración inicial de anticuerpos maternos, cuya vida media en lechones destetados (21 días) suele ser de 19 días, disminuyendo sus

niveles entre las 4 y 6 semanas de edad; lo que coincide con el muestreo del día 21 (6 semanas de vida) en donde, sí se observa un aumento en los valores de S/P en la mayoría de animales de los grupos vacunados. Se ha reportado que la seroconversión se da generalmente en esta etapa como resultado de una infección o como en este caso, de una inmunización, entre los 14 y 28 días posteriores y tanto Allan *et al.* (1999), como Krakowka *et al.* (2001), coinciden con Segalés *et al.* (2013), en que estos valores se pueden ver alterados por lo niveles de anticuerpos maternos (AM). Según esto, se puede observar que los títulos de anticuerpos tuvieron una baja, a los 21 días del ensayo, en los grupos experimentales que se podría incluso deber, a algún tipo de interferencia con la inmunidad pasiva de los lechoes.

En el día 21, hay algunos animales con resultados similares al día 0, y no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los 4 grupos analizados. Sin embargo, en el día 41 sí hay diferencias significativas ($p < 0,05$), especialmente entre el grupo 4 (control) con los grupos 1 y 2 (dosis 1x y 2x, respectivamente). Con esta base, se puede afirmar que la aplicación del tratamiento sí genera diferencia en cuanto al título de anticuerpos. Por otra parte, la similitud entre los grupos 1 y 2 y a su vez entre los grupos 1 y 3, permiten elucidar que su comportamiento no se ve alterado al emplear diferentes dosis de la vacuna, siendo segura para su uso en cerdos. Según estos resultados, se podría

proponer aumentar la concentración de la dosis x, de manera de obtener un mayor título de anticuerpos, como lo observado en el grupo 2.

Si bien la vacunación no impide completamente la infección o propagación de PCV2, sí es relevante ya que se ha demostrado su efecto en la reducción de la viremia, así como la carga viral sistémica, lo que resulta en una disminución de carga viral al medio ambiente, según describe Beach *et al.* (2011). Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se observa que en la población vacunada hay aumento en los valores S/P estadísticamente significativo, con respecto al grupo no vacunado, lo cual es similar a lo que afirma Young *et al.* (2010), quien atribuye a que después de la inmunización hay una mayor respuesta.

López-Soria describe la dinámica de infección con PCV2 y la seroconversión de una manera muy similar tanto en plantales afectados como en plantales sin presencia de signos clínicos, afirmando, en concordancia con Rodríguez-Arriola *et al.*, (2002), que los anticuerpos maternos están presentes en prácticamente todos los lechones tras la toma de calostro y van disminuyendo progresivamente durante la lactancia y la transición posterior. Consecuentemente, con la aplicación de vacunas como en el caso de este estudio, posterior al destete, los animales crean anticuerpos y seroconvierten

frente a PCV2, y de acuerdo a Carasova *et al.*, (2007), esto sucede de forma paralela al incremento de anticuerpos frente al virus y disminución de la viremia.

4.4.8 Linfoproliferación

La proliferación de los linfocitos T es uno de los primeros eventos que tiene lugar en una respuesta inmune celular y al utilizar esta técnica, fue posible evaluar su capacidad funcional en los animales inmunizados, posterior a un estímulo directo de carácter proliferativo *in vitro*. En la figura 4.8 se muestran graficados los promedios de las mediciones en triplicado.

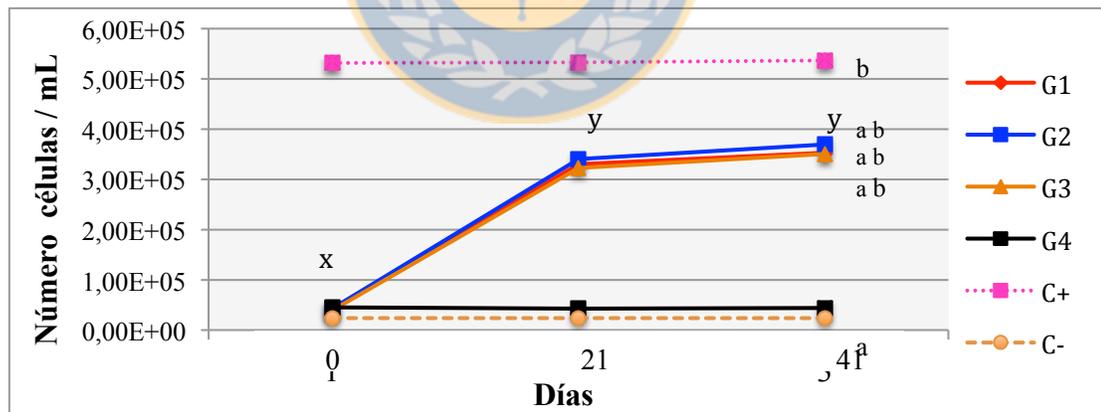


Figura 4.8 Valor de las medias del número de células a partir de las muestras de sangre en las diferentes etapas del ensayo (día 0, día 21 y día 41), clasificadas por grupo experimental (G1: 1x, G2: 2x, G3: 2,5x y G4: control negativo). C+: control positivo (Poly IC y LPS), C-: control negativo (RPMI). Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre grupos (a, b) y entre días (x, y). Fuente: Elaboración propia

Al día 0, todos los grupos experimentales mantuvieron un comportamiento similar en cuanto al conteo de células, con mediciones similares a las del control negativo (cercanas a $4,2 \times 10^4$ células/mL); sin embargo, esto cambió en las dos mediciones de los días posteriores, así: el conteo de los 3 grupos experimentales (G1, G2 y G3) se mantuvo cercano a los $3,3 \times 10^5$ células/mL y en $3,6 \times 10^5$ células/mL, a los 21 y 41 días respectivamente, lo cual fue estadísticamente diferente de lo observado al día 0; sin observarse diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos al día 41 del ensayo como se muestra en la figura 4.8. Es importante señalar que esta leve alza en las medias de los conteos podría implicar una respuesta más rápida contra el antígeno (proteína Cap), en las células provenientes de animales vacunados, ya que lograron generar cierta memoria para poder responder efectivamente ante el mismo estímulo externo gracias a la vacuna aplicada; sería interesante entonces, evaluar este tipo de estímulo en un mayor lapso de tiempo, para poder comparar si efectivamente, esta memoria celular se mantiene y es capaz de llegar a una diferenciación entre los grupos.

Aunque los resultados esperados implicaban una diferencia importante entre los grupos, es interesante la tendencia que se observó hacia el aumento del número de células, similar a los resultados publicados por Oliver-Ferrando *et al.* (2018), en donde al comparar la proliferación linfocitaria a partir del aislamiento de PBMC y posterior estimulación con la proteína Cap, los animales vacunados

mostraron mayores niveles de células T de memoria, capaces de producir IFN; mientras que Oh *et al.* (2012), por su parte, han reportado aumentos en la respuesta inmune celular, induciendo una inmunidad a largo plazo basada en la proliferación de estas células que participarían en la prevención de la infección, según lo descrito por Ferrari *et al.* (2014).

Como se observa en el gráfico, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días 0 y los días 21 y 41, dentro de los mismos grupos experimentales (G1, G2 y G3); lo cual indica que efectivamente, la proliferación celular se vió favorecida a raíz de la aplicación de la vacuna, ya que a pesar de que los animales venían con ciertos niveles de inmunidad pasiva, su respuesta ante estímulos externos e infecciones no resulta ser tan eficaz en los primeros días del ensayo teniendo en cuenta que su sistema inmune se encuentra todavía inmaduro y a diferencia de los días 21 y 41, posterior a la aplicación de la vacuna y su respectivo *booster*, ya cuentan con mecanismos más desarrollados que les permiten una mejor respuesta ante estos antígenos específicos, . Por su parte, Guerrero *et al.* (2008), proponen también, según sus ensayos de proliferación celular en cerdos destetados, que esta baja respuesta inmune celular específica en el periodo del destete puede deberse probablemente a los cambios en los corrales y posible estrés, teniendo en cuenta que en los últimos años autores como Álvarez (1992), Stratakis (1995) y Roitt *et al.* (1996), han postulado que existe una correlación bidireccional entre

el sistema nervioso central y el sistema inmune, principalmente debido al aumento de la secreción de glucocorticoides por la estimulación del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal. En este estudio mencionado, dicha respuesta inmune celular incrementó después del destete y vacunación de manera significativa, debido a un mayor contacto con antígenos, similar a lo ocurrido en este ensayo con la vacuna propuesta contra PCV2.

Así, estos ensayos validan la efectividad de la vacuna para lograr una proliferación celular específica ante el contacto con la proteína de la cápside, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Debido a la gran variación observada en los valores de conteo celular, es necesario en estudios futuros, mantener un mayor número de n por grupo y por un tiempo más prolongado, de manera de poder determinar si este incremento podría llegar a ser estadísticamente significativo entre los grupos.

Con estos resultados, se puede inferir que el prototipo de la vacuna en estudio es segura para su uso en lechones destetados según las dosis estudiadas para evaluar su potencia, resultando la concentración 2x, más eficaz con respecto a la disminución de carga viral y aumento en el título de anticuerpos; sin embargo, la dosis 1x tuvo un mayor impacto en cuanto a la ganancia de peso, lo cual es un factor relevante desde el punto de vista económico, por lo que,

probablemente, sería recomendable realizar ensayos con una dosis intermedia, por ejemplo 1,5x que generara los efectos intermedios que se observaron en este estudio frente a las variables mencionadas.

4.5 Conclusiones

4.5.1 El prototipo de vacuna propuesto, se considera seguro para su uso en lechones destetados, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis de la formulación vacunal ensayada y el grupo control, respecto a su temperatura, ganancia de peso y presentación de signos clínicos.

4.5.2 La potencia utilizada en la formulación vacunal es efectiva, al no observarse diferencias significativas entre los grupos inmunizados con la dosis establecida (1x) y el doble de la misma (2x), presentando ambos mayor valor de S/P posterior al *booster*, en comparación con el grupo control y la dosis 2,5x.

4.6. Referencias bibliográficas

1. Allan, G., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., Adair, B. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol.* 121 (1): 1–11.
2. Álvarez, M., García, J. (1992). Desarrollo de la respuesta del sistema inmune. *Ediciones Omega.* México, Distrito Federal. Pág. 69.
3. Ambrogi, A., Romanini, S., Carranza, A., Pelliza, B., DiCola, G., Sánchez, P. (2005). Síndrome multisistémico de desmejoramiento posdestete (SMDP) en cerdos criados al aire libre en una granja situada en Argentina. *Rev Col Cienc Pec.* 18: 3.
4. Beach, N., Smith, S., Ramamoorthy, S., Meng, X. (2011). Chimeric porcine circoviruses (PCV) containing amino acid epitope tags in the C terminus of the capsid gene are infectious and elicit both anti-epitope tag antibodies and anti-PCV type 2 neutralizing antibodies in pigs. *J Virol.* 85 (9): 4591–4595.
5. Beach, N., Meng, X. (2012) Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164: 33-42.
6. Campabadal C. (2009). Guía técnica para alimentación de cerdos. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
7. Carasova P., Celer V., Takacova K. (2007). *Rev Vet Sci.* 83: 274–278.
8. Chae, C. (2012). Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. *Vet J.* 194: 151.
9. Chedid, L., Lederer, E. (1978). Past, present and future of the synthetic immunoadjuvant MDP and its analogs. *Biochem Pharmacol.* 27: 2183-2186.
10. Fablet, C., Rose, N., Grasland, B., Robert, N., Lewandowski, E. and Gosselin, M. (2018). Factors associated with the growing-finishing performances of swine herds: an exploratory study on serological and herd level indicators. *Porcine Health Manag.* 4: 6–16.

11. Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S., Saalmüller, A., Elbers, K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*. 26: 1488–1499.
12. Ferrari, I., Borghetti, P., De Angelis, E., Martelli, P. (2014). Memory T cell proliferative responses and INF-gamma productivity sustain long-lasting efficacy of a Cap-based PCV2 vaccine upon PCV2 natural infection and associated disease. *Vet Res*. 45: 44-59.
13. Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink F., Segalés, J., (2008). Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine*. 26: 1063-1071.
14. Fort, M., Fernandez, L., Nofrarias, M. (2009). Development of cell mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet Immunol Immunopathol*. 129: 101-107.
15. Gavaudan, S., Kupfer, L., Czup, M. (2008). Analysis of porcine circovirus strains: search for the origin and genetic determinants of virulence. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*.
16. Guerrero, L., Villagomez, D., Zaitzava, G., Lemus, C., Taylor, J., Galindo, J., Sánchez, D., Ayala, D., Merlos, M., Roa, J. (2008). Respuesta inmune celular mediante técnicas de linforproliferación y fagocitosis en cerdos antes y después del destete. *Revista Computarizada de Producción Porcina*. 15.
17. Grepe N. (2008). Crianza de porcinos. *Ed. Iberoamericana S.A. de C.V. México, D.F.*
18. Huan, C., Fan, M., Cheng, Q., Wang, Q., Gao, Q., Wang, W., Gao, S., Liu, X. (2018). Evaluation of the efficacy and cross-protective immunity of Live-attenuated chimeric PCV1-2b vaccine against PCV2b and PCV2d subtype challenge in pigs. *Front Microbiol*. 9: 455-463.
19. Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segalés, J., Allan, G. (2010). Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol*. 136: 185–193.
20. Kixmüller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmüller, A., Elbers, K., Fachinger, V. (2008). Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*. 26: 3443–3451.

21. Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D., Allan, G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet. Pathol.* 38: 31–42..
22. Krakowka. S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Allan, G. (2005). Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J Vet Diagn Invest.* 17: 213-222.
23. Kwang, L., Joo, H., Davies, P., Hee, J. (2012). Comparison of Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in light and heavy pigs of market age on farms with routine PCV2 vaccination. *Can J Vet Res.* 76: 221-223.
24. Liu, Q., Wang, L., Willson, P., Babiuk, A. (2000). Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 38: 3474–3477.
25. Martelli, P., Ferrari, L., Morganti, M., De Angelis, E., Bonilauri, P., Guazzetti, S., Caleffi, A., Borghetti, P (2011). One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus associated disease under field conditions. *Vet Microbiol.* 149_ 339-351.
26. Morton, D., Griffiths, P. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec.* 116: 431–436.
27. Oh, Y., Seo, H., Han, K., Park, C., Che, C. (2012). Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)- specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. *J Gen Virol.* 93: 1556-1562.
28. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. (2019). Código Sanitario para los Animales terrestres. Página web: <https://www.oie.int/es/normas/codigo-terrestre/acceso-en-linea/>. (Consultado el 12-12-2019).
29. Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Domingo, M. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods.* 117: 75-80.

30. OMS. Organización Mundial de la Salud. (2019). Página web: <https://www.who.int/es>. (Consultado el 12-12-2019).
31. 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. *Vet Microbiol.* 214: 148-153.
32. Opriessnig, T., Yu, S., Gallup, J., Evans, R., Fenau, M., Pallares, F., Thacker, E., Brockus, C., Ackerman, M., Thomas, P., Meng, X., Halbur, P. (2003). Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol.* 40 (5): 521-529-
33. Opriessnig, T., Yu, S., Thacker, E., Halbur, P. (2004). Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *Journal of Swine Health and Production.* 12: 186-191.
34. Opriessnig, T., Patterson, A., Madson, D., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J., Juhan, N., Meng, X., Halbur, P. (2009). Difference in severity of porcine circovirus type 2 (PCV2)-induced pathological lesions between Landrace and Pietra in pigs. *J Anim Sci.* 87: 1582-1590.
35. Opriessnig, T., Patterson, A., Madson, D., Pal, N., Ramamorthy, S., Meng, X., Halbur, P. (2010). Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol.* 142: 177-183.
36. Opriessnig, T., Xiao, T., Halbur, P., Gerber, P., Matzinger, S., Meng, X. (2019). A commercial porcine circovirus (PCV) type 2a-based vaccine reduces PCV2d viremia and shedding and prevents PCV2d transmission to naïve pigs under experimental conditions. *Vaccine.* 35: 248-254.
37. Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C., Abrahante, J., Garcia, L., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., Murtaugh, P. (2011). Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Res.* 157 (1): 92–98.
38. Rodríguez-Arriola, G., Segalés, J., Rosell, C., Rovira, A., Pujols, J., Planas-Duran, J., Domingo, M., (2003). Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50: 99–101.

39. Roiit, M.I. y Brostoff, J. (1996). Immunology. (cuarta edición). *Academia Press*. Londres, pp
40. Roldán, R., Durán, F. (2006). Manual de explotación y reproducción en porcinos, 1° ed. *Editorial grupo latino*. Colombia.
41. Rusell, W., Burch, R. (1959). The principles of humane experimental technique. *Methuen*, London. UK.
42. Sangild, P. (2003). Uptake of colostral immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. *Acta Vet Scan Supl.* 98: 105-122.
43. J. Segales, A., Urniza, A., Alegre, T., Bru, E., Crisci, M., Nofrarias, S., Lopez-Soria, M., Balasch, M., Sibila, Z., Xu, H., Chu, L., Fraile, J., Duran, P. (2009). A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine.* 27: 7313-7332.
44. Stratakis, C, Chrousos, G. (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the Stress System. *Washington.* 2-15.
45. Torres, M. (2007). Enfermedades asociadas al circovirus porcino tipo 2. Página web: <http://www.bioline.org.br/request?la07047>. (Consultado el 12-12-2019).
46. Segales, J., Kekarainen, T., Cortey, M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol.* 165: 13–20.
47. Villa, A., Huerta, R., Córdova, A., Ortega, S., Trejo, A. (2013). Efecto de la vacunación de cerdas y lechones contra circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en la ganancia de peso y porcentaje de mortalidad en México. *Arch Med Vet.* 45 (2): 145-149.
48. Young, M., Cunningham, G., Sanford, E. (2010). Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J Swine Health Prod.* 19 (3): 175-180.

DISCUSIÓN GENERAL

Teniendo en consideración las importantes pérdidas económicas que los casos relacionados a infecciones con PCV2 generan en los sistemas de producción intensiva de cerdos, las investigaciones referentes a las vacunas contra PCV2 han tomado relevancia en los últimos años, con la finalidad de buscar las mejores estrategias en cuanto a programas y tipos de vacunación, que permitan garantizar el control de la infección viral en los planteles, considerando la distribución ubicua de este virus.

Si bien en cierto, actualmente hay 4 vacunas disponibles en el mercado, los programas actuales de vacunación representan hasta un 50% de los costos asociados a medicación durante la fase productiva, por lo que la obtención de proteínas alternativas a la cápside de PCV2 (que además, se encuentra actualmente patentada) ha resultado atractivo como blanco de estudio, para que estas proteínas puedan ser utilizadas en nuevas vacunas que garanticen una respuesta inmune eficaz y protectora contra el virus, que permita mantener un buen estatus sanitario disminuyendo además, el impacto económico asociado.

Con base en lo anteriormente expuesto, esta tesis doctoral se centró en la generación de un prototipo de vacuna capaz de estimular en los cerdos

vacunados, una respuesta inmune específica contra PCV2; utilizando en la formulación vacunal una quimera de la cápside (diseñada en un estudio que no forma parte de esta tesis doctoral), además del interferón alfa (INF α) porcino, ya que autores como Bracci *et al.* (2006), Cheng *et al.*, (2007) y Toledo *et al.* (2010), han demostrado que esta molécula actúa como inmunopotenciador al momento de la vacunación.

Como se describe en el capítulo II, la levadura *Pichia pastoris* cepa MP36 resultó ser efectiva en la expresión de ambas proteínas de interés (quimera e INF α) luego de una recombinación genética exitosa, logrando escalar la producción de las mismas a un fermentador. Utilizando el adyuvante Montanide 15A VG en una proporción 80/20 (fase acuosa/fase oleosa), se preparó la emulsión con la que se realizaron los ensayos posteriores en cerdos destetados, provenientes de un plantel comercial y libres de cuadros clínicos de PCV2, para comprobar así su efectividad en la generación de una respuesta inmune protectora.

Los estudios en cerdos fueron evaluados en dos etapas: por una parte, se comparó la efectividad de la formulación vacunal en el proceso de inmunización al preparar la emulsión con y sin INF α porcino; y adicionalmente, se compararon diferentes dosis de la formulación vacunal (1x, 2x y 2,5x), para determinar su seguridad y potencia.

Con base en la participación del INF α en la respuesta inmune, se pretendía obtener una formulación vacunal que, al ser combinada con esta molécula inmunopotenciadora, mostrara cambios relevantes para los criterios evaluados; sin embargo, esto no se logró y a diferencia de lo esperado, los resultados entre las emulsiones con y sin INF α no presentaron diferencias significativas que llevaran a suponer que ciertamente, la inclusión del IFN α dentro de la vacuna en estudio, fuera efectiva en el mejoramiento de la respuesta inmune protectora. Por lo tanto, y en consecuencia con lo descrito anteriormente, los próximos estudios debiesen ser realizados solamente con la quimera seleccionada, ya que por si sola, sería suficiente para generar respuesta en los animales frente a la vacunación con la formulación propuesta.

Con los resultados obtenidos en el capítulo IV, se concluye que la formulación vacunal diseñada resultó ser segura para su uso en cerdos ya que no generó alteraciones que comprometieran el bienestar de los animales, ni se observaron cambios en su comportamiento así como tampoco, se observaron lesiones físicas que fueran compatibles con una reacción adversa a la vacuna. Por otra parte, los resultados de la evaluación de su potencia sugieren que la concentración utilizada como base (dosis 1x) para la preparación de la emulsión no fue la más óptima en la respuesta de los animales respecto a los niveles de carga viral y título de anticuerpos, aunque sí en cuanto al aumento de peso, lo cual es relevante en términos comerciales dentro de los planteles de producción

intensiva. Al analizar los resultados de utilizar el doble de la dosis (2x), bajo las mismas condiciones experimentales, estos parámetros tuvieron un mejor comportamiento, observándose una disminución en la carga viral a los 41 días del ensayo (20 días después del *booster*) y una seroconversión que igualmente, tuvo lugar en los días posteriores al *booster*. Por lo tanto, sería interesante evaluar en estudios posteriores, una formulación vacunal intermedia, que lograra equiparar los beneficios obtenidos según estos parámetros de estudio, como por ejemplo una dosis de 1,5x, que debiese mantenerse segura aumentando su capacidad de producir una respuesta inmune específica, es decir, su potencia relativa.

A pesar de que no estaba planteado como un objetivo específico dentro de esta tesis, el desafío llevado a cabo en el capítulo III pretendía, además de poner a los animales en contacto con el virus, replicar la enfermedad y poder así, comparar los tipos de lesiones histopatológicas que tienen lugar en los animales infectados clínicamente, versus los animales protegidos. No obstante, no se obtuvieron resultados satisfactorios al respecto, ya que no se evidenciaron signos clínicos ni aumentos de carga viral en sangre que pudieran clasificar a los animales como infectados clínicamente; esto, probablemente por las condiciones del experimento, considerando que al estar los cerdos, de cierta forma aislados en las instalaciones de la universidad, no entraron en contacto con otros cofactores, que favorecieran la inmunosupresión que se espera sea

causada por la inoculación del virus, tal y como lo demuestra Opriessnig *et al.* (2014), quienes para poder replicar la enfermedad utilizaron para el desafío, además del PCV2, un inóculo de PRRS proveniente de animales positivos; o más recientemente, Opriessnig *et al.* (2020), quienes realizaron desafío utilizando PCV2, además de PPV, para evaluar en los cerdos, la efectividad de la protección posteor a la aplicación de vacunas experimentales comparando la utilización de la cápside proveniente de PCV2a y la cápside proveniente de PCV2b. Experimentalmente, se han realizado numerosos intentos de reproducción experimental de PMWS y en algunos casos se han logrado reproducir ciertas lesiones y algunos signos de la enfermedad, pero apartándose de manera considerable de las condiciones naturales de contaminación que suelen ocurrir a nivel comercial. Por lo tanto, se ha visto que no es fácil reproducir la enfermedad y generar el tipo de lesiones histopatológicas características del PMWS, lo cual fue evidente durante los ensayos realizados en este estudio, ya que en las condiciones en que los animales fueron mantenidos dentro de las instalaciones de la universidad, no se logró (ni se intentó) un ambiente que favoreciera la inmunosupresión de los cerdos, simulando las condiciones de campo que experimentan los animales de producción intensiva. Así, en estudios posteriores, valdría la pena realizar un desafío simultáneo con otro virus que proporcionara un margen más amplio a la participación de otros cofactores para favorecer la aparición de signos clínicos, además de mantener un monitoreo por un tiempo mayor al considerado en este

estudio, para lo cual serían necesarias dependencias más amplias y así no tener inconvenientes respecto al espacio físico disponible para cada animal dentro de los corrales.

Aun así, los resultados obtenidos son concluyentes respecto a la protección obtenida con la aplicación de la vacuna propuesta, lo cual se demostró específicamente con dos aspectos: i) la disminución de la carga viral en suero luego de entrar en contacto con el virus [con diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$)], en comparación con los animales que recibieron el placebo y ii) el aumento obtenido en los valores S/P hacia el final del experimento, a pesar de no haber logrado una seroconversión en los animales vacunados.

Esta tesis logró comprobar la efectividad de la vacuna según los resultados obtenidos durante los días posteriores al desafío, en donde los cambios en los parámetros evaluados resultaron más evidentes, destacando así la eficiencia del prototipo de vacuna propuesto, respecto a los efectos sobre la carga viral y el valor S/P. Sería recomendable entonces, que futuras investigaciones se basaran en la aplicación de la vacuna en dosis 1,5x con desafío tanto con PCV2 como con otro virus asociado, manteniendo un monitoreo por un mayor periodo de tiempo, lo cual permitiría evaluar los parámetros productivos, para así estimar el efecto que tendría bajo condiciones de campo.

CONCLUSIÓN GENERAL

La formulación vacunal propuesta, utilizando solamente la quimera de la cápside seleccionada, induce en los cerdos una respuesta inmune específica contra PCV2, disminuyendo la carga viral, a pesar de no observarse una clara seroconversión.



ANEXO 1

Medio de preparado para el inóculo: YPG + glicerol al 2%.

Componentes	Peso (g)
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Glicerol (2%)	20

Fuente: Elaboración propia



ANEXO 2

Medio medio de fermentación: medio salino suplementado (MSS). Cantidades para preparación de 1L.

Componentes	Peso (g)
Glicerol (4%)	40
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	30
KH_2PO_4	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,2
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,35
Extracto de levadura	5

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 3

Suplemento de vitaminas. Cantidades para preparación de 1L.

Vitaminas	Peso (g)
Myo-inositol	8
Piridoxina-Hcl	0,8
Acido nicotínico	0,2
Biotina	0,8
KH ₂ PO ₄	4
Pantotenato de Calcio	0,8
Tiamina-Hcl	0,8

Fuente: Elaboración propia



ANEXO 4

Sales trazas. Cantidades para preparación de 1L.

Sales trazas	Peso (g)
FeSO ₄ *7H ₂ O	65
CuSO ₄ *5H ₂ O	6
ZnSO ₄ *7H ₂ O	20
MnSO ₄ *H ₂ O	3
KI	0,42
H ₃ BO ₃	0,1
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1
H ₂ SO ₄ (98%)	10mL

Las sales trazas y vitaminas se prepararon por separado y fueron filtradas a través de un filtro de 0,2 µm. El protocolo fue estandarizado utilizando 2,5mL/L de vitaminas y 1mL/L de sales trazas. Fuente: Elaboración propia

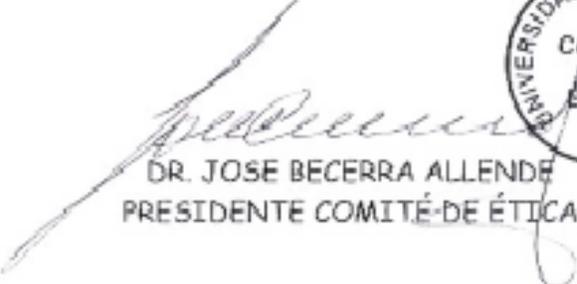
ANEXO 5



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

CERTIFICADO

EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION HA REVISADO EL PROTOCOLO DEL PROYECTO "GENERACION Y DESARROLLO DE UNA VACUNA RECOMBINANTE EFICAZ CONTRA EL CIRCOVIRUS PORCINO tipo 2 POTENCIADA CON GITOQUINAS INMUNO-REGULADORAS: UNA SOLUCION BIOTECNOLOGICA PARA LA PORCICULTURA NACIONAL" POSTULADO POR EL PROFESOR JORGE ROBERTO TOLEDO ALONSO, DOCENTE DEL DEPARTAMENTO DE FISIOPATOLOGIA, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS, Y HA COMPROBADO QUE CUMPLE CON LAS NORMAS DE BIOÉTICA DE ACUERDO AL MANUAL DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD DE CONICYT DE 2008.


DR. JOSE BECERRA ALLENDE
PRESIDENTE COMITÉ DE ÉTICA



CONCEPCION, enero 2012,

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Quien suscribe, AURA MILENA VILLAMIL PÉREZ, Rut. 22.213.014-k, alumna del programa Doctorado en Ciencias Veterinarias, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad de Concepción, declara ser autor de la TESIS “DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN PROTOTIPO DE VACUNA RECOMBINANTE CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2) UTILIZANDO *Pichia pastoris*”, y conceder derecho de publicación, comunicación al público y reproducción de esa obra, en forma total o parcial en cualquier medio y bajo cualquier forma del mismo, a la Universidad de Concepción, Chile, para formar parte de la colección material o digital de cualquiera de las bibliotecas de la Universidad de Concepción y del Repositorio UDEC. Esta autorización es de forma libre y gratuita, y considera la reproducción de la obra con fines académicos y de difusión tanto nacional como internacionalmente.

Así mismo, quien suscribe declara que dicha obra no infringe derechos de autor de terceros.

AURA MILENA VILLAMIL PÉREZ