

DEPARTAMENT DE SANITAT I D' ANATOMIA ANIMALS
FACULTAT DE VETERINÀRIA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**EFFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UN INMUNOMODULADOR COMPUESTO POR
LPS DE *E. coli* Y *Propionibacterium granulosum* SOBRE EL SISTEMA INMUNE DEL
CERDO**

Trabajo presentado por
Gustavo José Pappaterra Mendoza
Para optar al grado de Doctor en Veterinaria

El Dr. Enric Maria Mateu de Antonio, profesor titular del Departament de Sanitat i d' Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que el trabajo "Efecto *in vitro* e *in vivo* de un inmunomodulador compuesto por LPS de *E. coli* y *Propionibacterium granulosum* sobre el sistema inmune del cerdo", presentado por Gustavo José Pappaterra Mendoza para la obtención del grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizado en dicho departamento y bajo mi dirección.

Para que conste, firmo la presenta en Bellaterra, 17 de Junio del 2002.

Enric Maria Mateu de Antonio

*Dedicada a mí adorada Gabriela y a mis
nuevos motivos de lucha, mis hijos.*

*A Carlota, Gustavo, Isbel, Lizbeth, Carlos,
Diego, Saúl, Alejandra, Fred, Alejandro y María.*

En memoria de mis queridos Juana, Elvira y Rafael.

A mis formadoras, mi Facultad y mi Universidad, U...U...UCV.

Agradecimientos

Es indudable que durante el desarrollo de este trabajo muchas personas, de una otra manera, influyeron en la elaboración del mismo. Primero que nada quisiera agradecer a Gabriela porque este momento es tan suyo como mío. A Laboratorios Calier y a toda su cálida gente por haber confiado en mí, en especial a Joan Marca Puig y a Francisco Vila. A nuestros amigos Gaspar Utrera por su amistad en cualquier momento. A mis paisanos venezolanos por siempre dar ese toque de venezolanidad tan necesario para nosotros cuando nos encontramos lejos de nuestra tierra y en especial a Willian, Denice y el resto de su familia que siempre estuvieron allí, en las buenas y en las malas.

Así mismo, agradecer a toda la gente de infecciosas (Mercé, Montse, Elvira, Marga y Jordi) ya que todos siempre fueron fuente de conocimientos, orientación, apoyo, conversación y alegría, y en especial, un agradecimiento a Enric por su orientación, paciencia, insistencia, apoyo y sobre todo por compartir sus conocimientos. Por otra parte, quiero dar las gracias aquellos que en su paso por la unidad de infecciosas también tuvieron su mano tendida (Cristina, Helena, Marta, Ferrán y Jaime),

También un agradecimiento para el resto de mis colegas becarios (Lorena, Laila, Anna, Eugenia, Chiara e Ivan) ya que sin su amistad y apoyo, las cosas hubiesen sido mucho más difíciles, y en especial, a dos de ellas, a Lorena por su amistad incondicional, por los gratos momentos vividos que siempre sirvieron de relajación y, en muchos casos, de apoyo. Así mismo a Laila, por los gratísimos momentos que me ha hecho pasar, aunque muchas veces "casi" me colma la paciencia, y por ser una compañera perfecta de "armas" en algunas largas y nocturnas batallas.

Por otra parte, debo así mismo agradecer a Dolo por el diseño de la portada, pero en especial por siempre estar dispuesta a ayudar, por los momentos lúdicos vividos a su lado y por sus bromas y su risa. Por último al personal técnico (Rosa y Montse) y a la infatigable Paqui, así como al resto de personas de otras unidades y departamentos que de alguna manera colaboraron en mi trabajo.

ÍNDICE	5
ABREVIACIONES	9
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1. <u>Sistema inmunitario del cerdo</u>	11
1.1. Órganos linfoides	11
1.2. Formas celulares y su funcionabilidad	12
1.2.1. Monocitos/macrófagos	12
a) Fagocitosis	13
b) Presentación de antígenos	13
b.1) Complejo mayor de histocompatibilidad	14
c) Producción de citoquinas	15
1.2.2. Linfocitos	15
a) Linfocitos T	15
a.1) Linfocitos Th1 y Th2	17
b) Linfocitos B	19
b.1) Inmunoglobulinas / anticuerpos	20
1.2.3. Otros tipos celulares	22
a) Neutrófilos	22
b) Eosinófilos	23
c) Basófilos, mastocitos	24
d) Células NK	24
e) Plaquetas	24
2. <u>Respuesta inmune</u>	25
2.1. Respuesta inmune innata, natural o inespecífica	25
2.2. Respuesta inmune adquirida, adaptativa o específica	26
2.2.1. Respuesta inmune mediada por células	26
2.2.2. Respuesta inmune humoral	27
3. <u>Citoquinas</u>	28
a) IL-1	29
b) IL-2	30
c) IL-4	31

d) IL-6	32
e) IL-10	32
f) IL-12	33
g) TNF- α	34
h) INF- γ	35
4. <u>Técnicas de medición de la respuesta inmune</u>	36
a) Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa	36
b) ELISA	38
c) Citometría de flujo	39
5. <u>Inmunomodulación</u>	41
a) Mecanismo de acción	42
b) Clasificación	43
c) Lipopolisacárido	45
d) <i>Propionibacterium granulosum</i>	47
e) Asociación LPS- <i>Propionibacterium</i>	48
II. HIPÓTESIS	51
III. OBJETIVOS	51
1. General	51
2. Específicos	51
IV. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	52
1. MATERIALES Y MÉTODOS	52
1.1. <u>Expresión y producción de citoquinas</u>	52
1.1.1. RT-PCR	52
a) Células mononucleares de sangre periférica	52
b) Macrófagos alveolares	53
c) Extracción de RNA	54
d) Transcripción inversa	55
e) Reacción en cadena de la polimerasa	55
1.1.2. ELISA	57
1.2. <u>Fagocitosis</u>	58

1.2.1. Neutrófilos polimorfonucleares	58
1.2.2. Suspensión bacteriana	58
1.2.3. Marcaje y opsonización de la bacteria	59
1.2.4. Fagocitosis	59
1.3. <u>Análisis MHC-II</u>	60
1.4. <u>Análisis CD25</u>	62
2. RESULTADOS	64
2.1. <u>Expresión y producción de citoquinas</u>	64
2.1.1. Células mononucleares de sangre periférica	64
2.1.2. Macrófagos alveolares	65
2.2. <u>Fagocitosis</u>	68
2.3. <u>Análisis MHC-II</u>	70
2.4. <u>Análisis CD25</u>	72
V. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	76
1. MATERIALES Y MÉTODOS	76
1.1. <u>Estudio A</u>	76
a) Animales, grupos y tratamientos	76
b) Análisis inmunológicos	77
b.1) ELISA para glicoproteína E (gE) y glicoproteína B (gB) del virus de la enfermedad de Aujeszky	77
b.2) ELISA para inmunoglobulinas	77
c) Linfoproliferación	80
d) Títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VEA	81
1.2. <u>Estudio B</u>	82
2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	83
3. RESULTADOS	83
3.1. <u>Estudio A</u>	83
3.1.1. Análisis Inmunológicos	83
a) ELISA para glicoproteína E (gE) y glicoproteína B del virus de la enfermedad de Aujeszky	83

b) ELISA para inmunoglobulinas totales	84
c) ELISA para inmunoglobulinas específicas frente al VEA	84
d) Linfoproliferación	85
e) Títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VEA	85
3.2. <u>Estudio B</u>	88
VI. DISCUSIÓN	89
1. <u>Ensayos <i>in vitro</i></u>	89
a) Sobre la expresión de citoquinas	89
b) Sobre la fagocitosis de los neutrófilos polimorfonucleares	92
c) Sobre la expresión de MHC-II	93
d) Sobre la expresión de CD25	95
2. <u>Ensayos <i>in vivo</i></u>	96
VII. CONCLUSIONES	102
VIII. BIBLIOGRAFIA	103
IX. RESUMEN	118
X. SUMMARY	121
XI. ANEXOS	124

ABREVIACIONES*

ABTS: Ácido benzotiazolina-azino-sulfónico.

APC: Células presentadoras de antígeno.

CD3: Linfocitos T, transmisor asociado al TCR.

CD4: Linfocitos T cooperadores.

CD8: Linfocitos T citotóxicos.

CD25: Receptor-alfa para IL-2.

CD120a: Receptor para factor de necrosis tumoral.

CD120b: Receptor para factor de necrosis tumoral.

CD121a: Receptor tipo-1 para interleuquina-1.

CD121b: Receptor tipo-2 para interleuquina-1.

CD122: Receptor-beta para IL-2.

CD124: Receptor para IL-4.

CD126: Receptor-alfa para IL-6.

CD130: Receptor-beta para IL-6.

CD132: Receptor-gamma para IL-2.

FACS: Clasificador de células activas fluorescentes.

FITC: Isotiocionato de fluoresceína.

gB: Glicoproteína-B del virus de la enfermedad de Aujeszky

gE: Glicoproteína-E del virus de la enfermedad de Aujeszky.

G3PDH: Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa.

HBSS: Solución salina de Hanks.

Ig(s): Inmunoglobulina(s).

IL: Interleuquina.

IL-12R β 1: Receptor para interleuquina 12.

IL-12R β 2: Receptor para interleuquina-12.

IL-2R: Receptor para IL-2.

INF: Interferón.

INMD: Inmunomodulador (Inmodulen[®], Laboratorios Calier).

LAK: Células asesinas activadas por linfocitos.

LPS: Lipopolisacárido.

MI: Multiplicidad de infección.
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
MIP: Proteína inflamatoria de macrófago.
NAP-2: Péptido activador de neutrófilos-2.
NK: Célula asesina o agresora natural.
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica.
PBS: Solución salina tamponada.
Pg: *Propionibacterium granulosum*.
PHA: Fitohemaglutinina.
PMN: Neutrófilos polimorfonucleares.
P.V.: Peso vivo.
RT-PCR: Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa.
SLA: Antígeno de leucocito de cerdo.
SSE: Solución salina estéril.
Tc: Linfocitos T citotóxicos.
TCID₅₀: Dosis infectiva media.
TCR: Receptor de antígeno de linfocito T.
Th: Linfocitos T cooperadores.
TMG: Título medio geométrico.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
UFC: Unidad formadora de colonias.
VEA: Virus de la enfermedad de Aujeszky.

*Debido a que las abreviaciones inglesas de los diferentes elementos del sistema inmunitario se han convertido en una denominación universal de amplio uso, hemos decidido emplearlas a pesar de que las siglas no se correspondan con la denominación en español.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El sistema inmunitario constituye la línea de defensa de los organismos vivos frente a los patógenos. Su función principal consiste en evitar la colonización, multiplicación e invasión de los tejidos por parte de virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos.

1. Sistema inmunitario del cerdo

Al igual que en otras especies de mamíferos domésticos, el sistema inmunitario del cerdo está constituido por células, tejidos, órganos linfoides y factores solubles. Sin embargo, esta especie presenta una serie de diferencias morfológicas y funcionales propias: nódulos linfáticos con estructura invertida (cortex/médula), ausencia casi completa de células en la linfa eferente y un elevado número de células linfoides circulantes.

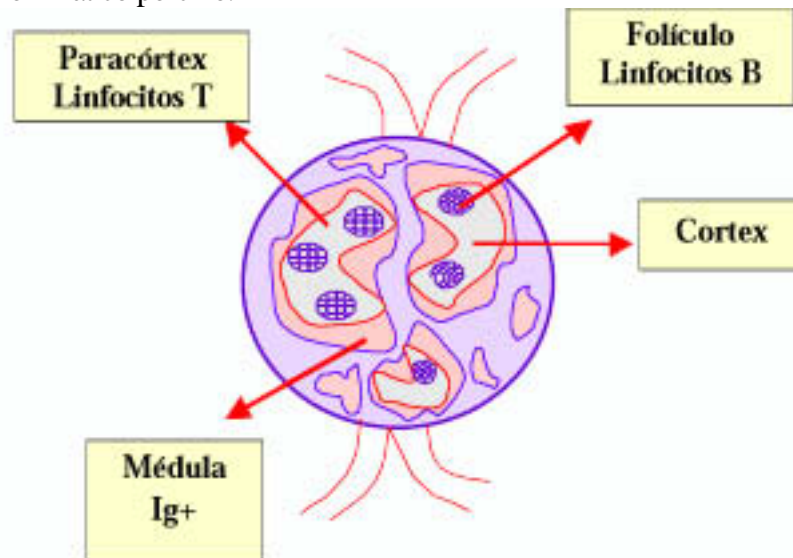
1.1. Órganos linfoides

Los órganos y tejidos linfoides se dividen, según su función, en primarios y secundarios. Los primarios (médula ósea y timo) son los sitios principales de producción de células linfoides. En estos órganos primarios, los linfocitos se diferencian a partir de las células primordiales linfoides, proliferando y madurando hasta convertirse en células funcionales. Los órganos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer y tonsilas) son aquellos en los que se dan las condiciones para que los linfocitos T y B inmunocompetentes recién formados puedan interactuar entre sí y con los antígenos, pudiéndose generar de esta manera la respuesta inmune. En los mamíferos las células T maduran en el timo y las células B lo hacen en el hígado fetal y médula ósea.

Los linfonódulos son órganos encapsulados, constituidos por la cápsula, el córtex, la médula y el hilio, que se encuentran distribuidos por todo el organismo de los mamíferos. En el cerdo, los linfonódulos presentan características diferentes con respecto a otras especies domésticas al tener una estructura invertida. El córtex o zona con folículos linfoides, se encuentra en el interior del nódulo central y está formado por un tejido linfoide difuso,

llamado paracórtex, y por folículos primarios y secundarios. Por otra parte, la médula se ubica en la periferia del nódulo, no posee senos linfáticos o estructuras similares y está constituida por un entramado uniforme y difuso de células en vez de cordones y senos (figura 1). Esta disposición del córtex y la médula se ha observado también en el delfín, hipopótamo, rinoceronte y elefante (Binns, 1982; Moskov *et al.*, 1969).

Figura 1. Nódulo linfático porcino.



En la mayoría de las especies animales, la salida de los linfocitos de los linfonódulos se da a través de los vasos linfáticos eferentes, mientras que en el cerdo estos se vierten directamente a la sangre a través de los vasos que irrigan los nódulos.

1.2. Formas celulares y su funcionabilidad

1.2.1. Monocitos/macrófagos

En contraste con otros órganos y sistemas que tienen un espacio anatómico definido, las células del sistema inmunitario están presentes en casi todo el organismo y son capaces de moverse a través de la corriente sanguínea o linfática hasta cualquier tejido o compartimiento anatómico. Los monocitos/macrófagos tienen un papel clave en la defensa frente a patógenos al modular la respuesta inespecífica y específica (Solbach *et al.*, 1991). Sus funciones son las de ingerir y destruir patógenos (fagocitosis) y la de actuar como células presentadoras de antígenos para los linfocitos T cooperadores (Th). Por otra parte, los macrófagos producen

mediadores solubles (citoquinas y quimioquinas) que participan de forma activa en la modulación de la respuesta inflamatoria e inmune.

a) Fagocitosis

Los macrófagos son las células fagocíticas más importantes y poseen una alta capacidad de acción contra patógenos que se incrementa al ser activados por mediadores solubles.

El proceso de fagocitosis consta de cuatro fases: *adhesión* del fagocito al patógeno para su captura, *ingestión* propiamente dicha, *destrucción* del patógeno mediante enzimas líticas y la *expulsión* de los detritus resultantes. Estas fases involucran la participación de diferentes componentes celulares y, así mismo, este proceso es crítico en la defensa inmune y necesario en los mecanismos inmunes inespecíficos y específicos, la presentación de antígeno y la inducción y activación de linfocitos (Brown, 1995).

En la fagocitosis intervienen (Janeway *et al.*, 2001; Roitt *et al.*, 2001; Tizard, 2000):

- 1) Receptores quimiotácticos de membrana plasmática que les atraen hacia los lugares donde se encuentren microorganismos.
- 2) Receptores inespecíficos que permiten la unión con los microorganismos, como por ejemplo los receptores de manosa-fucosa que se unen a las paredes bacterianas, los receptores de Fc de anticuerpos y los receptores de los factores de complemento que reconocen proteínas del sistema del complemento unidas al patógeno
- 3) Sistemas químicos y enzimáticos microbicidas destinados a eliminar al agente extraño una vez fagocitado (anión peróxido, óxido nítrico, catepsina G, etc.).

b) Presentación de antígenos

Para responder adecuadamente a los antígenos, las células T necesitan que éstos le sean presentados a través del complejo mayor o principal de histocompatibilidad para que sean reconocidos. La presentación de antígenos se realiza a través de las células presentadoras de antígeno (APC), fundamentalmente células dendríticas y macrófagos, siendo un paso crucial en el inicio de la respuesta inmune. Algunos tipos celulares, además de su función propia,

poseen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos (células B). Así mismo, existen células que al ser estimuladas por factores solubles (interferón- γ y factor de necrosis tumoral- α), pueden ser capaces de presentar antígenos (astrocitos, células foliculares, endotelio, fibroblastos y otras) (Janeway *et al.*, 2001; Roitt *et al.*, 2001; Tizard, 2000).

b.1) Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El complejo mayor o principal de histocompatibilidad (MHC), denominado en el cerdo antígenos de leucocitos de cerdo (SLA), es un grupo de moléculas a través de las cuales se lleva a cabo la presentación de antígenos a los linfocitos T. Al igual que en otras especies, en el cerdo se han descrito dos clases principales de antígenos de histocompatibilidad denominados antígeno de clase-I (MHC-I) y antígeno de clase-II (MHC-II), los cuales se diferencian entre sí por sus estructuras, funciones y mecanismos para el procesamiento del antígeno (Vaiman, 1988; Vaiman *et al.*, 1998).

El MHC-I se expresa en la superficie de todas las células nucleadas, excepto las neuronas y trofoblastos. Este antígeno liga fragmentos peptídicos de proteínas (8-11 aminoácidos de tamaño) que se encuentran y se procesan en el citoplasma. Estas proteínas, fundamentalmente, son de patógenos transcritas en el citoplasma, propias del huésped, derivadas del núcleo y de mitocondrias o exógenas capaces de atravesar las membranas celulares (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995; Harding *et al.*, 1995). En el citoplasma, estas proteínas son procesadas y degradadas a pequeñas cadenas de péptidos en los proteosomas. La unión con el péptido se efectúa en el retículo endoplásmico, actuando dos proteínas (TAP-1, TAP-2) como transportadoras de los péptidos a la superficie celular, donde este complejo MHC-I-antígeno es reconocido por los linfocitos T citotóxicos que procederán a destruir las células infectadas (Harding *et al.*, 1995; Vaiman *et al.*, 1998).

El MHC-II se expresa en algunas APC como monocitos/macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Reconoce fragmentos peptídicos (18-25 aminoácidos de tamaño) y, al contrario de MHC-I, utiliza la vía endocítica (endosomas o lisosomas) como mecanismo de transporte de los péptidos a la superficie celular, por lo que en él se expresan antígenos del espacio extracelular. Estos péptidos se unen en el retículo endoplásmico a una proteína de membrana

llamada cadena invariable (I_i). Este complejo MHC-II-I_i accede a la vía endocítica donde se une a los péptidos procedentes de patógenos que han sido degradados, para ser transportados a la superficie celular donde serán reconocidos por los linfocitos T cooperadores, desencadenándose la respuesta inmune específica (Harding *et al.*, 1995; Janeway *et al.*, 2001).

Se ha descrito un tercer tipo de antígeno de histocompatibilidad, denominado MHC-III, que capta proteínas que se encuentran libres en la sangre y actúa en la cascada del complemento y otras acciones inmune menos específicas (Vaiman, 1988; Vaiman *et al.*, 1998).

c) *Producción de citoquinas*

Los monocitos/macrófagos producen y secretan una serie de mediadores solubles (Interleuquina-1, IL-6, IL-10, IL-12, factor de necrosis tumoral- α e interferón- α , entre otros) que inducen un efecto pro-inflamatorio, estimulan la secreción de otras citoquinas, participan en la activación, proliferación y diferenciación celular así como en el control de la respuesta inmune. Por otra parte, los monocitos/macrófagos son capaces de responder ante la acción de mediadores producidos por diferentes tipos celulares (IL-4, IL-13, interferón- γ y factores de crecimiento) y así mismo, pueden responder de forma autocrina (Biron, 1994; Celada y Nathan, 1994; Janeway *et al.*, 2001).

1.2.2. Linfocitos

Los linfocitos son las células del sistema inmune sobre las cuales recae la respuesta inmune adquirida o específica.

a) *Linfocitos T*

En los mamíferos, los linfocitos T dirigen y regulan la respuesta inmune y se caracterizan por ser capaces de reconocer específicamente antígenos extraños asociados a MHC-I ó MHC-II. Dentro de la población de linfocitos T, se clasifican varios subtipos definidos por sus características fenotípicas, funcionales e incluso por su distinto proceso de

diferenciación. Estas características fenotípicas se determinan por el estudio de proteínas que se encuentran en la superficie de la membrana de las células mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, definiéndose así los grupos de diferenciación (CD).

Los linfocitos T poseen en su membrana un complejo de proteínas llamado receptor para antígeno de linfocito T (TCR) mediante el cual reconocen los péptidos antigénicos que le son presentados a través de MHC-I ó MHC-II. La señal de reconocimiento es transmitida al interior celular por un conjunto de moléculas de membrana llamado colectivamente CD3. El TCR está formado por un heterodímero constituido por dos cadenas, en combinaciones $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$, lo cual permite la clasificación de los linfocitos T en dos grupos, linfocitos T $\alpha\beta$ (TCR-2) y T $\gamma\delta$ (TCR-1). Estos dos tipos de linfocitos se diferencian entre sí por la presencia de estas moléculas en la membrana celular, las moléculas que reconocen en la presentación del antígeno y la función que realizan dentro de la respuesta inmune.

Los linfocitos T $\alpha\beta$ se encuentran en una alta proporción en la sangre periférica del cerdo (40%-60%) (Yang y Parkhouse, 1996) y se dividen en dos grandes subtipos, linfocitos T CD4 (linfocitos T cooperadores) y linfocitos T CD8 (linfocitos citotóxicos). Los linfocitos CD4 reconocen antígenos presentados por MHC-II e interactúan con fagocitos y células B para la destrucción de patógenos y promover la síntesis de inmunoglobulinas. Por su parte, los linfocitos CD8 reconocen antígenos presentados por MHC-I y actúan en el proceso de citotoxicidad para la eliminación de células infectadas.

En el cerdo adulto normal, existe una proporción importante de linfocitos periféricos (10%-60%) que pueden expresar simultáneamente receptores CD4 y CD8 (llamados doble positivos, CD4/CD8 DP). En el cerdo, los fenotipos CD4/CD8 DP se encuentran en sangre y otros tejidos y presentan características de células de memoria (Joling *et al.*, 1994; Ober *et al.*, 1998; Saallmüller, 1996; Yang y Parkhouse, 1996; Zuckermann y Husmann, 1996; Zuckerman, 1999).

Por su parte, los linfocitos T $\gamma\delta$, también denominados nulos, se encuentran abundantemente en las mucosas y a menudo son CD4 y CD8 negativos (Joling *et al.*, 1994; Zuckermann y Husmann, 1996). Se ha observado que su proporción disminuye con la edad y

aunque su función no está del todo clara, se cree que son capaces de presentar actividad no restringida a MHC y parecen tener un papel en la protección de las mucosas y en actividades citolíticas (Kaufmann, 1996; Saalmüller, 1998). Además, se ha observado que este fenotipo es capaz de reconocer antígenos directamente, sin la presentación por APC y que, a su vez, una subpoblación de linfocitos $T\gamma\delta$ puede presentar antígenos a linfocitos T cooperadores vía MHC-II (Takamatsu *et al.*, 2001)

a.1) Linfocitos Th1 y Th2

Dentro del proceso de la respuesta inmune específica, las células del sistema inmunológico (linfocitos B, fagocitos y otros linfocitos T) interactúan con los linfocitos T para inducir en ellos la activación, división y diferenciación. Esta relación se lleva a cabo de dos maneras: por contacto directo entre moléculas de membrana y mediante la secreción de mediadores solubles.

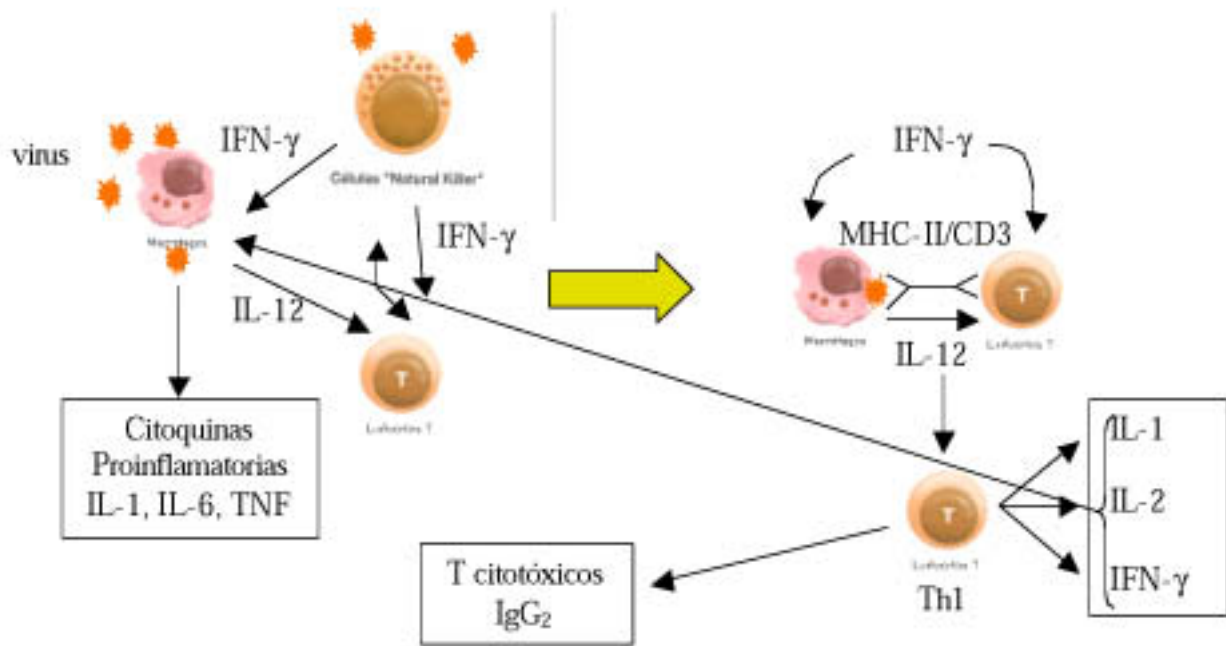
Tras la presentación de antígenos y por el efecto de ciertas citoquinas, los linfocitos CD4 pueden polarizarse en sus acciones, particularmente su producción de citoquinas, de tal modo que favorezcan la respuesta inmune celular (Th1) o humoral (Th2) (figuras 2 y 3). La producción de citoquinas por los macrófagos y otros tipos celulares en las primeras fases de la infección define el patrón Th1 ó Th2 que se producirá en respuesta a un agente extraño. La liberación de interferón- γ (INF- γ) e IL-12 inducen la diferenciación de las células Th a células Th1, en tanto que la IL-4 e IL-10 inducen la polarización Th2 (Biron y Gazzinelli, 1995; O'Garra, 1998; Romagnani, 1997; Scott, 1993b; Trinchieri, 1993).

Los linfocitos Th1 y Th2 se distinguen por las citoquinas que producen y el tipo de respuesta inmune en la que intervienen. Los linfocitos Th1 producen INF- γ , factor de necrosis tumoral-beta (TNF- β), IL-2 e IL-8, los cuales activarán a los linfocitos CD8 y células asesinas naturales. Esta polarización Th1 supondrá un predominio de la respuesta inflamatoria y citotóxica (Kaufmann, 1996; O'Garra, 1998; Romagnani, 1996; Romagnani, 1997). Por su parte, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, entre otras, cuyo efecto principal será la activación de linfocitos B y eosinófilos predominando la respuesta de tipo

humoral (Garside y Mowat, 1995; Kaufmann, 1996; O`Garra, 1998; Romagnani, 1992; Romagnani, 1996; Romagnani, 1997).

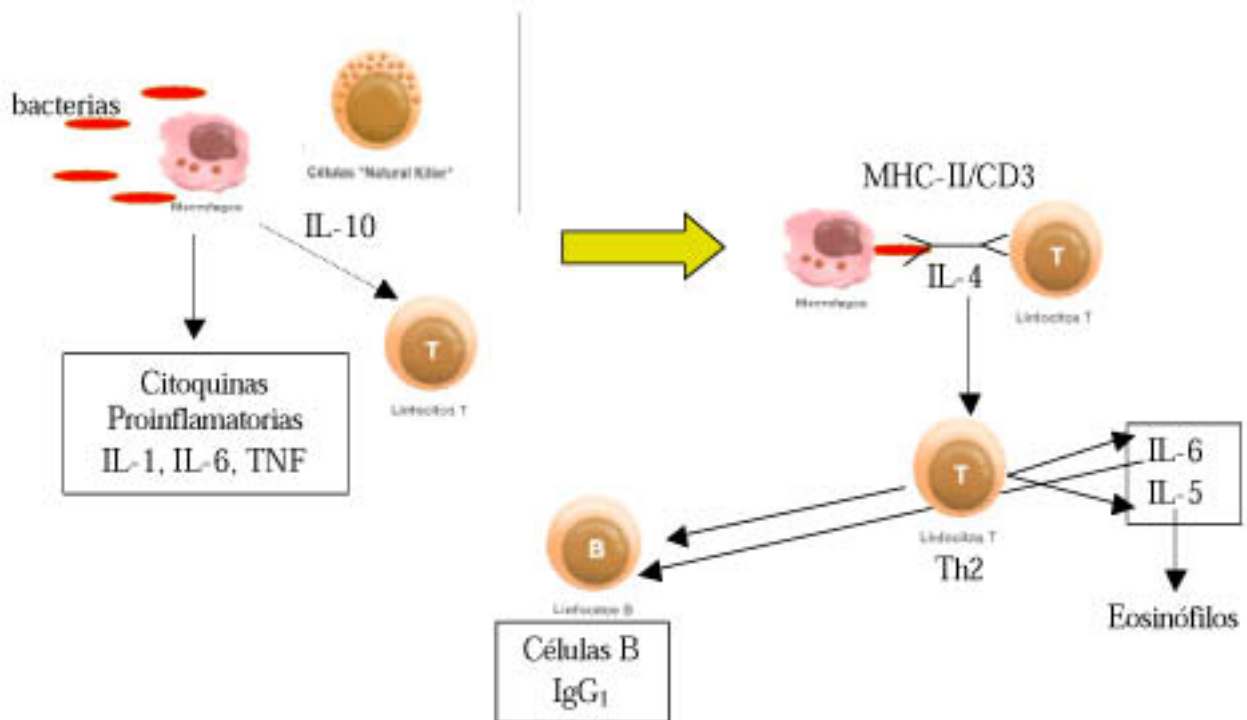
En este proceso de polarización Th1/Th2, un tipo de respuesta inhibe a otra mediante citoquinas específicas. Así, los linfocitos Th1 pueden inhibir la proliferación de las células Th2 a través de la secreción de INF- γ , mientras que la IL-10 producida por las células Th2, inhiben la secreción de las citoquinas de los linfocitos Th1 (Roitt *et al.*, 2001).

Figura 2. Polarización respuesta inmunitaria Th1.



IFN- γ : interferón-gamma; IL: interleuquina; TNF: factor de necrosis tumoral; MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo-II; CD3: receptor-transmisor; NK: células asesinas.

Figura 3. Polarización respuesta inmune Th2



IFN- γ : interferón-gamma; IL: interleuquinas; TNF: factor de necrosis tumoral; MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo-II; CD3: receptor-transmisor. NK: células asesinas.

b) *Linfocitos B*

En el cerdo, los linfocitos B constituyen aproximadamente entre el 5% y 18% del reservorio linfoide circulante y tienen como función principal la de producir las inmunoglobulinas (Igs), las cuales pueden actuar asociadas a la membrana de la célula B o de forma soluble (anticuerpos). Las inmunoglobulinas de membrana son sintetizadas por las propias células B y quedan insertadas en la superficie de membrana donde actúan como receptores antigénicos específicos. Por su parte, los anticuerpos son proteínas que se encuentran libres en el suero y que se unen específicamente a los antígenos poniendo en contacto el patógeno con el fagocito encargado de destruirlo.

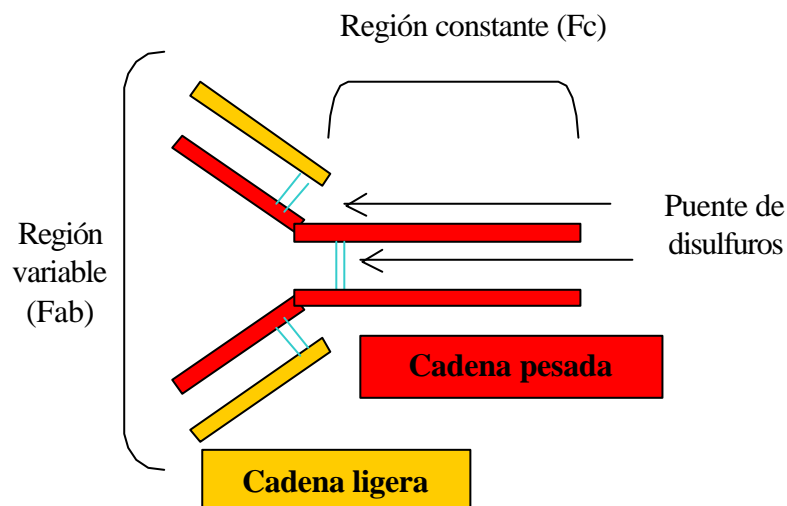
Una vez que se ha llevado a cabo el contacto con el antígeno, las células B se activan, proliferan y se diferencian en células plasmáticas o células secretoras de anticuerpos. Una parte de los linfocitos B activados no se diferencian en células plasmáticas, sino que se convierten en células de memoria que serán las responsables de la producción de una

respuesta más rápida e intensa en el caso de un nuevo contacto con ese antígeno. Así mismo, las células B pueden producir citoquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, INF- γ , TNF- α entre otras) (Pistoia, 1997), así como responder ante ellas, actuando además como células presentadoras de antígenos a los linfocitos Th.

b.1) *Inmunoglobulinas/anticuerpos*

La producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B es uno de los mecanismos más efectivos en la respuesta específica ante microorganismos. Cada molécula de Ig, independientemente de su isotipo, está formada, genéricamente, por dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas unidas por puentes disulfuro. Dentro de la molécula se pueden reconocer dos regiones, una región variable (Fab), implicada en la unión del antígeno y donde se encuentra la especificidad de la inmunoglobulina, y una región constante (Fc), que es la mediadora de las funciones efectoras del anticuerpo y determina el tipo y subtipo de Igs que se producirá (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995) (figura 4).

Figura 4. Estructura básica de las Inmunoglobulinas.



En el cerdo, se han descrito cuatro tipos de Igs, IgG, IgM, IgA e IgE, aunque se ha sugerido la existencia de IgD (tabla 1). La IgM es la primera inmunoglobulina que se produce durante el desarrollo fetal y es el isotipo predominante en una respuesta primaria (Butler,

1998). Su presencia está casi exclusivamente restringida al espacio vascular y su síntesis disminuye a medida que aumenta la IgG. Su afinidad específica es menor que la de la IgG, pero por su conformación de pentámero puede relacionarse con múltiples antígenos y activar el sistema del complemento (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995).

Tabla 1. Inmunoglobulinas en calostro, leche y suero de cerdos (Pescovitz, 1998; Roth, 1999).

	IgG	IgM	IgA	IgE
	<i>mg/ml</i>	<i>mg/ml</i>	<i>mg/ml</i>	<i>mg/ml</i>
Calostro	30-70	2,5-3,2	9,5-10	-
Leche	1-11	0,3-1,8	3-7	-
Suero	17-25	1-3	0,5-3	-

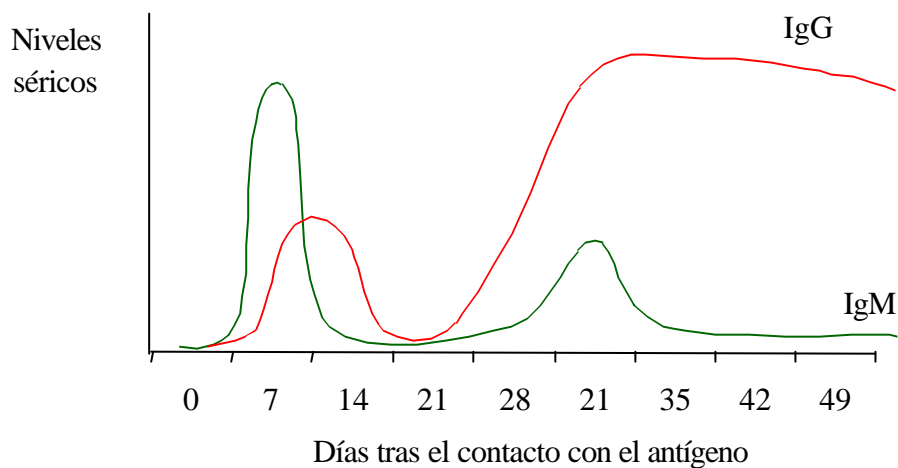
En el cerdo, la IgG es la principal inmunoglobulina presente en el suero y calostro. Representa aproximadamente el 70% total de las Igs del organismo produciéndose de manera muy intensa en pocas horas. Tiene gran afinidad por el antígeno y es la inmunoglobulina dominante en la respuesta inmune secundaria pudiendo opsonizar, aglutinar y precipitar antígenos, así como activar la vía clásica y alternativa del complemento. Por otra parte, se puede unir a receptores específicos de células inmunes como macrófagos, mastocitos, polimorfonucleares y linfocitos para incrementar en ellos la capacidad de fagocitosis y la producción y liberación de factores solubles. En el cerdo se describen cinco subclases diferentes: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4 (Kacs Kovics *et al.*, 1994; Van Zaane y Hulst, 1987).

La IgA predomina en las mucosas y a menudo se asocia a un componente secretor elaborado por las células epiteliales que permite una unión a las superficies mucosas, siendo el anticuerpo más abundante en las secreciones corporales. Actúa básicamente en respuestas locales de la inmunidad de mucosas siendo la primera línea de defensa frente a patógenos cuya invasión se produce a través de superficie de mucosas. En cerdos se han descritos dos subclases, IgA1e IgA2 (Van Zaane y Hulst, 1987).

La IgE, y la IgD en otras especies, representan un escaso porcentaje del total de inmunoglobulinas que intervienen predominantemente en las reacciones alérgicas, la respuesta frente a helmintos y en la citotoxicidad celular.

La cinética de la respuesta de anticuerpos se inicia aproximadamente a partir de los 4-5 días tras el contacto y procesamiento de un antígeno. Se inicia con predominio de la IgM que aumenta de manera logarítmica para estabilizarse en un máximo y luego ir descendiendo. En la respuesta secundaria es mucho más rápida e intensa, de una mayor duración, y presenta predominio de IgG (figura 5).

Figura 5. Respuesta primaria y secundaria de IgM e IgG.



1.2.3. Otros tipos celulares

En el desarrollo de la respuesta inmune intervienen otra serie de células como son los neutrófilos, las células NK, eosinófilos, basófilos, mastocitos y plaquetas.

a) *Neutrófilos*

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son una parte esencial de la respuesta inmune innata al ser uno de los primeros tipos celulares que migran tras una invasión de patógenos, teniendo como principal función la fagocitosis. Constituyen más del 90% de los polimorfonucleares circulantes, siendo la población predominante en una respuesta

inflamatoria (Mollinedo *et al.*, 1999). Los PMN tienen receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y para factores de complemento (C3), interviniendo en los procesos de citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos, la cual constituye el tipo más activo de citotoxicidad en lechones jóvenes (Euzeby, 1993).

Al igual que los monocitos/macrófagos, los neutrófilos producen la eliminación de los patógenos fagocitados mediante la generación de intermediarios reactivos de oxígeno (sustancias oxidantes) y una serie de enzimas líticas que se encuentran en sus gránulos lisosomales (hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa, muramidasa, lactoferrina, lisozima) (Cassatella, 1995; Edwards y Watson, 1995; Roth, 1999).

A diferencia de los macrófagos, los PMN no son capaces de fagocitar repetidamente y liberan sus enzimas hidrolíticas más lentamente. Sin embargo, tienen una capacidad de activación muy rápida y se producen en un gran número a partir de la médula ósea (10^{11} células por día) (Euzeby, 1993; Mollinedo *et al.*, 1999). Por otra parte, los neutrófilos poseen la capacidad de responder ante citoquinas y, cuando están activados, son células que, así mismo, pueden expresarlas y producirlas (Cassatella, 1995). En personas se ha observado la síntesis de IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α , INF- α , proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) y una serie de quimioquinas (Cassatella, 1995). A través de estas sustancias, los PMN no solo son capaces de promover la activación y el reclutamiento de otros neutrófilos sino también pueden producir la quimioatracción y activación de monocitos/macrófagos y linfocitos, lo que tendría una influencia sobre la dirección y evolución de los procesos inmunes (Cassatella, 1995).

b) *Eosinófilos*

Constituyen entre el 2% y 5% de los leucocitos circulantes. Es una célula con capacidad fagocítica aunque menor que la de otros tipos celulares. Sin embargo, su función primordial es la liberación al exterior del contenido de sus gránulos citoplasmáticos que poseen grandes cantidades de fosfatasa ácida y peroxidasa, particularmente importante en las infestaciones por helmintos (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995; Janeway *et al.*, 2001; Roitt *et al.*, 2001).

c) *Basófilos, mastocitos*

Los basófilos se encuentran en la circulación sanguínea en escaso número (menos del 0,2% de los leucocitos) y poseen gránulos distribuidos al azar rodeados de membrana. Intervienen en la inflamación de tipo agudo, siendo muy importantes en el aviso de alarma al sistema inmune (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995). Poseen receptores de alta afinidad para IgE, cuya unión produce la liberación de los mediadores presentes en sus gránulos. Los mastocitos se encuentran en los tejidos corporales (epitelio mucoso y tejido conjuntivo), poseen gránulos que liberan en el proceso de la desgranulación participando también en reacciones alérgicas y pueden actuar en conjunto con los eosinófilos para potenciar en éstos la destrucción de parásitos (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995).

d) *Células NK*

Las células asesinas o agresoras naturales derivan de la médula ósea y no poseen receptores específicos para antígenos por lo que su actividad no está restringida por MHC. Su función es la de destruir células infectadas y algunas células tumorales, teniendo también la capacidad de responder y producir factores solubles que intervienen de forma decisiva en la polarización de la respuesta inmune (INF- γ) (Evans y Jaso-Friedmann, 1993; Roth, 1999). En el cerdo, estas células son muy importantes en animales jóvenes donde la inmunidad inespecífica por parte de las células NK tiene un papel relevante en la protección frente a patógenos intracelulares (Euzaby, 1993; Evans y Jaso-Friedmann, 1993; Roth, 1999).

e) *Plaquetas*

Las plaquetas, además de su participación en la coagulación, pueden intervenir en la respuesta inmunitaria, especialmente en la inflamación. Por otra parte, liberan sustancias que aumentan la permeabilidad capilar, activan el complemento y actúan quimiotácticamente sobre leucocitos (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995; Roitt *et al.*, 2001; Tizard, 2000).

2. Respuesta inmune

La respuesta inmune consiste en el desencadenamiento de los mecanismos destinados a la eliminación de patógenos o material extraño. La realización de esta respuesta está constituida por tres pasos: el *reconocimiento* de manera inespecífica y específica del agente extraño por parte de los fagocitos, linfocitos T y B y otros tipos celulares; la *regulación* a través de la interacción de los diferentes elementos del sistema inmunitario para que se activen y regulen, y la *respuesta* del tipo e intensidad adecuada para la eliminación o inactivación del agente extraño.

Dentro del proceso de reacción frente a patógenos, la respuesta inmunitaria por parte del hospedador se puede clasificar en dos tipos: innata (natural o inespecífica) y adquirida (adaptativa o específica). Así mismo, la respuesta adquirida se puede llevar a cabo a través de una respuesta inmune mediada por células o mediante una respuesta de tipo humoral. Todos estos mecanismos inmunes dependerán del tipo de agente, las lesiones que causa y del lugar donde se produzca la infección.

2.1. Respuesta inmune innata, natural ó inespecífica

Se desencadena al poco tiempo de la entrada del agente al organismo (minutos u horas) y predomina en las primeras fases de una infección, teniendo una gran importancia en la protección sistémica y local del organismo (Euzeby, 1993). Está constituida por las barreras físicas y agentes químicos no específicos (piel, secreciones sebáceas, lisozima en la mayoría de las secreciones, mocos, tapiz ciliar de la traquea, ácido gástrico, secreción lagrimal, saliva, enzimas proteolíticas, histamina, ácidos grasos, etc.), los factores solubles que recubren e inactivan inespecíficamente patógenos (proteínas del complemento, de fase aguda), así como por células (monocitos/macrófagos, polimorfonucleares, células citotóxicas, NK, etc.) que reconocen inespecíficamente a los microorganismos o a células que se encuentren infectadas (Rumyantsev, 1998).

2.2. Respuesta inmune adquirida, adaptativa ó específica

Este tipo de respuesta depende de los linfocitos T y linfocitos B, caracterizándose por la especificidad para reconocer antígenos y la generación de memoria para activarse rápidamente en caso de un posterior enfrentamiento al mismo agente. Consta de una respuesta primaria, que, como describimos anteriormente, es de baja intensidad y corta duración y una respuesta secundaria que se caracteriza por ser más rápida, intensa y efectiva.

Dentro del proceso de la respuesta específica puede distinguirse un componente humoral, basado en la producción de anticuerpos, y un componente celular, basado en mecanismos de citotoxicidad. Durante el desarrollo de la respuesta adaptativa frente a un patógeno, se suelen desencadenar ambos tipos de inmunidad, si bien generalmente una de ellas predomina sobre la otra.

2.2.1. Respuesta inmune mediada por células

La respuesta mediada por células se caracteriza por la eliminación del agente extraño mediante la acción directa de diferentes tipos celulares (monocitos/macrófagos, PMN, NK, Tc, etc.) así como los mecanismos de inflamación, quimiotaxis, fagocitosis, citotoxicidad, liberación de citoquinas y presentación de antígenos, no interviniendo, de manera determinante, los linfocitos B ni los anticuerpos. El proceso de citotoxicidad mediada por células puede ser, o no, restringida por MHC según el tipo de células que intervengan en ella. La acción de los linfocitos CD8 sobre las células infectadas por patógenos esta determinada por la expresión de MHC-I por parte de las células invadidas, mientras las células NK y LAK (células agresoras activadas por linfoquinas) poseen la propiedad de ser citotóxicas sin especificidad antigénica y sin la participación de MHC. Así mismo, células citotóxicas que poseen receptores Fc para IgG, pueden unirse a las células dianas recubiertas por ésta y lisarlas, actuando de manera dependiente de los anticuerpos.

2.2.2. *Respuesta inmune humoral*

La respuesta de tipo humoral se caracteriza por la interacción entre antígenos que se encuentran en el espacio extracelular y los anticuerpos, proceso que se lleva a cabo luego de la cooperación entre los linfocitos T y linfocitos B para la activación y diferenciación de éstos últimos. Sin embargo, la respuesta de tipo humoral puede ser independiente de los linfocitos T interaccionando directamente las células B con los antígenos. Una vez activadas, las células B se constituirán en células plasmáticas formadoras de anticuerpos o bien en células de memoria que permanecerán en el organismo por largo período de tiempo. En este tipo de respuesta, se produce un predominio de la respuesta Th2 y la activación y proliferación de diversas células.

En la inmunidad frente a patógenos, los anticuerpos pueden actuar por tres vías. Se puede producir la unión de estos anticuerpos a los patógenos para prevenir la infección de las células, realizándose así la *neutralización* del agente. Por otra parte, este recubrimiento de los microorganismos por parte de los anticuerpos produce la *opsonización* del mismo para ser así reconocido por los receptores Fc específicos de las células fagocíticas, incrementándose considerablemente el proceso de la fagocitosis. Alternativamente, los anticuerpos unidos a los patógenos pueden activar las proteínas del sistema de *complemento* para incrementar la opsonización y la lisis de algunas bacterias.

A pesar de que dentro de todo el proceso de la respuesta inmune específica existe una especialización de cada una de las respuestas que la constituyen (celular y humoral), los componentes básicos de cada una de estas respuestas (células e inmunoglobulinas) son necesarios entre sí para la elaboración de una reacción inmune efectiva, ya que a pesar de que un tipo de respuesta predomina sobre otra, en muchas ocasiones ambas colaboran entre sí. En muchos casos, para originarse una respuesta mediada por células es necesaria la presencia de los anticuerpos y, así mismo, la respuesta humoral no podría realizarse con éxito sin la respuesta de tipo celular sobre los microorganismos recubiertos de anticuerpos.

3. Citoquinas

Como se ha descrito anteriormente, la respuesta inmune es muy compleja y depende de innumerables interacciones entre una gran variedad de células que deben actuar de manera coordinada para el reconocimiento, procesamiento y posterior eliminación de los agentes no reconocidos como propios. Esta interacción se realiza por contacto directo entre células o mediante factores solubles que actúan como mediadores, entre los cuales están las citoquinas. Bajo este concepto se clasifican diversos grupos de proteínas solubles de bajo peso molecular (≤ 80 kD) que actúan a muy bajas concentraciones (nanomoles, picomoles) y que en su mayoría son secretadas por las células que participan directa o indirectamente en la respuesta inmune (Maino y Picker, 1998).

Las citoquinas pueden llevar a cabo su acción sobre las mismas células que las producen (actividad autocrina), sobre células vecinas (actividad paracrina) o sobre células y tejidos distantes a través de la sangre (actividad endocrina) (Maino y Picker, 1998). La producción de las citoquinas esta determinada por una serie de estímulos que inducen su síntesis y secreción, entre los cuales están los complejos inmunes, la estimulación mitogénica y/o de antígenos, los componentes del complemento, el contacto con células activadas, las propias citoquinas y las endotoxinas y otros productos microbianos. Así mismo, la actividad de la citoquina dependerá también de la capacidad de las células receptoras para detectar la presencia de éstas (Fernández-Botran *et al.*, 1996).

Existe una amplia variedad de citoquinas las cuales poseen importantes funciones dentro del organismo. Entre los principales tipos de citoquinas se incluyen los interferones (INF), el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquinas (IL). Seguidamente describiremos brevemente las citoquinas estudiadas en nuestros ensayos, mientras en el anexo (tabla 10) se presentan las características de otras citoquinas.

a) IL-1

Existen dos tipos de IL-1, IL-1 α e IL-1 β , que poseen una homología de un 25% entre sí. La IL-1 es secretada por diferentes tipos celulares (linfocitos T y B, células NK, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso, queratinocitos, células de Langerhans, osteoclastos, astrocitos, células mesangiales, células del timo y córnea), aunque son los monocitos/macrófagos la principal fuente de producción. La IL-1 posee dos receptores llamados de tipo-1 (CD121a) y de tipo-2 (CD121b), a los que se une indistintamente IL-1 α e IL-1 β , siendo su acción biológica indistinguible (Fernández-Botran *et al.*, 1996).

a.1) Funciones de regulación inmunológica (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995; Dinarello, 1991; Roitt *et al.*, 2001; Tizard, 2000):

- Estimula los linfocitos T y B, incrementa la proliferación celular y la síntesis de IL-6, IL-8, TNF- α y de la misma IL-1.
- Actúa sinérgicamente con IL-6 para inducir la producción de IL-2 e incrementar la expresión del receptor para IL-2 (CD25).
- Estimula la proliferación y activación de fibroblastos y timocitos, promoviendo también la proliferación de astrogliá y microgliá
- Aumenta la capacidad de presentación de antígenos activando macrófagos.

a.2) Funciones pro-inflamatorias (Arnaiz-Villena *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1992; Dinarello, 1991; Richards *et al.*, 1991; Roitt *et al.*, 2001; Saklatvala *et al.*, 1985; Tizard, 2000; Tyler y Berton, 1988).

- Por si sola o actuando en combinación con otras citoquinas (IL-6, IL-8, TNF- α) es un importante mediador de reacciones inflamatorias e induce la producción de proteínas de fase aguda y la síntesis de otros mediadores (ACTH, IL-6, IL-8, corticoesteroides y prostaglandinas) que actúan sobre el centro termorregulador del hipotálamo produciendo una significativa elevación de la temperatura corporal.
- Incrementa la secreción de proteínas inflamatorias como elastasa y activador del plasminógeno.

- Es un factor quimiotáctico para atraer leucocitos y estimular la desgranulación de eosinófilos, incrementando el número de neutrófilos en sangre y favoreciendo su extravasación.
- Produce la activación de células endoteliales e incrementa la expresión de las moléculas de adhesión.
- En el cerdo, como en humanos, está implicada en la destrucción de hueso y cartílago que se observa en varias enfermedades, como la erisipela.

b) IL-2

Está producida por los linfocitos T (principalmente CD4), linfocitos B, células NK y células LAK. Actúa como un importante regulador de la respuesta inmunitaria al ser el principal factor de proliferación y crecimiento de células T y, así mismo, produce la activación de macrófagos, células NK y células B (Murtaugh, 1994; Nelson y Willerford, 1998; Van Parijs *et al.*, 1997).

Existen tres tipos de receptores para IL-2, IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e IL-2R γ (CD132), los cuales pueden ser expresados de manera indistinta, independiente o conjunta en linfocitos y monocitos (Fernández-Botran *et al.*, 1996; Nelson y Willerford, 1998; Rebollo *et al.*, 1996; Smith, 1988). Tras estimulación de los linfocitos, las células se activan y se induce en ellas la transcripción de CD25 que se expresa en la membrana celular, considerándose un marcador de activación linfocitaria cuya expresión se induce por el reconocimiento y la presencia de IL-2 (Fernández-Botran *et al.*, 1996; Nelson y Willerford, 1998; Rebollo *et al.*, 1996). El receptor IL-2R β es expresado en células NK, monocitos/macrófagos, células T, células B y neutrófilos en reposo aunque su expresión se mantiene al activarse las células. El receptor IL-2R γ se expresa en diferentes células hematopoyéticas, células CD4, CD8, células B, células NK, monocitos/macrófagos, neutrófilos, granulocitos disminuyendo su expresión en las células activadas (Fernández-Botran *et al.*, 1996; Nelson y Willerford, 1998; Rebollo *et al.*, 1996).

b.1) Funciones (Fernández-Botran *et al.*, 1996; Janeway *et al.*, 2001; Knoblock y Canning, 1992; Nelson y Willerford, 1998; Rebollo *et al.*, 1996; Roitt *et al.*, 2000; Tizard, 2000):

- Es la principal responsable de la proliferación y expansión clonal de linfocitos T induciendo su crecimiento dependiente de la concentración de IL-2, la densidad del receptor para IL-2 y la duración de la interacción con el receptor .
- Produce la activación de macrófagos y la proliferación y actividad citotóxica de las células NK.
- Participa junto con la IL-4 en la proliferación y producción de inmunoglobulinas de las células B activadas.
- Estimula la producción de IL-1, TNF- α , TNF- β , INF- γ , ACTH, prolactina y tirotrópina.

c) **IL-4**

La principal fuente de producción son las células T activadas aunque también pueden producirla otros tipos celulares (mastocitos y basófilos activados, células B y algunas células Tc). Posee un receptor específico para IL-4 (CD124) que se expresa en diferentes células, describiéndose también la existencia de un receptor soluble que puede tener como función bloquear la actividad de esta citoquina (Fernández-Botran *et al.*, 1996). Es la principal inductora de la proliferación de células B.

c.1) Funciones (Lunney, 1998; Roitt *et al.*, 2001; Tizard, 2000; Zhou *et al.*, 1994):

- Actúa sobre células Th como factor de crecimiento y activación siendo uno de los factores más importante en dirigir la respuesta inmune hacia el predominio de la respuesta de tipo humoral (Th2).
- Induce la expresión de MHC-II en macrófagos y células B incrementando la función de ellas como APC.
- Estimula la proliferación y diferenciación de células B promoviendo la secreción de IgE e IgG.
- Inhibe la activación de células NK.

- Posee actividad anti-inflamatoria en monocitos y macrófagos, teniendo así mismo actividad antitumoral.
- Regula la expresión y secreción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e INF- γ lo que inhibe la respuesta Th1.

d) **IL-6**

Actúa sobre la mayoría de las células inmunitarias y es elaborada por diferentes células (células T y B, granulocitos, células del músculo liso, eosinófilos, condrocitos, osteoblastos, mastocitos y queratinocitos) pero son los monocitos/macrófagos, fibroblastos y células endoteliales los productores más importantes. Su secreción puede inducirse por IL-1, IL-4, IL-13, IL-17, endotoxinas bacterianas, TNF- α , infecciones víricas y situaciones de hipoxia (Mantovani *et al.*, 1997). Se han descrito dos receptores de IL-6, IL-6R α (CD126) e IL-6R β (CD130), así como un receptor soluble (Fernández-Botran *et al.*, 1996).

d.1) **Funciones** (Lunney, 1998; Scamurra *et al.*, 1996; Roitt *et al.*, 2001; Tizard, 2000)

- Actúa como factor de diferenciación de células B a células formadoras de anticuerpos aumentando la producción y secreción de inmunoglobulinas.
- Activación de células T.
- Es una citoquina pro-inflamatoria que induce fiebre y producción de proteínas de fase aguda en el hígado.
- Estimula la diferenciación y crecimiento de las células precursoras hematopoyéticas y la diferenciación mielomonocítica.
- Aumenta la producción de células precursoras de neutrófilos, monocitos, megacariocitos.
- En el riñón estimula la proliferación de células mesangiales
- Estimula la proliferación de timocitos.

e) **IL-10**

La interleuquina-10 es producida por los linfocitos T, linfocitos B y monocitos, siendo un factor muy importante en el control de la respuesta inmune al inhibir la síntesis de

citoquinas producidas por células Th1, NK y macrófagos, suprimir la inmunidad celular, la activación del macrófago e inhibir la expresión de MHC-II (Armstrong *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1994; Pretolani y Goldman, 1997).

e.1) Funciones inmunológicas (Armstrong *et al.*, 1996; Biron, 1994; Chen y Zlotnik, 1991; MacNeil *et al.*, 1990; Pretolani y Goldman, 1997; Thompson-Snipes *et al.*, 1991):

- Posee diversas propiedades inmunoestimulantes incrementando el crecimiento y diferenciación de células B, timocitos, células T periféricas, mastocitos y linfocitos Tc.
- Aumenta la respuesta proliferativa de los linfocitos T activados con IL-2 e IL-4.
- Induce la secreción de IgG, IgA e IgM por parte de las células formadoras de anticuerpos.
- Tiene un papel importante en la eliminación del número excesivo de eosinófilos en el lugar de inflamación.

f) IL-12

Esta citoquina es elaborada por macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos y células dendríticas. Existen dos receptores, IL-12R β 1 e IL-12R β 2, los cuales se expresan en células CD4, CD8 y NK activadas (Fernández-Botran *et al.*, 1996; Trinchieri y Scott, 1994; Trinchieri, 1998).

f.1) Funciones inmunológicas (Biron y Gazzinelli, 1995; Scott, 1993a; Scott, 1993b; Schijns *et al.*, 1995; Trinchieri, 1993; Trinchieri, 1998):

- Produce la diferenciación, junto a INF- γ , de células Th a Th1.
- Activa macrófagos y linfocitos Tc.
- Estimula el crecimiento y actividad funcional de las células NK y linfocitos T, estimulando la transcripción y secreción de INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-3 e IL-8.
- Incrementa los mecanismos de defensa antivírica al activar las células NK, linfocitos T e inducir INF- γ .
- Contribuye a incrementar la resistencia a infecciones bacterianas, parasitarias y tumores.
- Reduce la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-10 en linfocitos Th2.

g) TNF- α

Es secretado por macrófagos, monocitos, células T (básicamente CD4), neutrófilos, células NK, astrocitos, células de la microglía, células del músculo liso y fibroblastos. Posee un amplio espectro de actividad biológica, siendo muy importante para el control y resolución de infecciones (Marino *et al.*, 1997). Es uno de los principales factores pro-inflamatorios junto a IL-1, IL-6 e IL-8 induciendo la respuesta inflamatoria, fiebre, síntesis de proteínas de fase aguda y, en algunos casos, shock séptico. Se conocen dos receptores, TNF- α R1 (CD120a) y TNF- α R2 (CD120b), que son expresados en toda las células con núcleo (Fernández-Botran *et al.*, 1996; Marino *et al.*, 1997). El receptor TNF- α R1 es expresado particularmente por células susceptibles a la acción citotóxica de los TNF y está relacionado con la muerte celular programada (apoptosis). Por su parte, el receptor TNF- α R2 está presente en muchos tipos celulares y especialmente en aquellos de origen mieloide (Fernández-Botran *et al.*, 1996). Se han descrito también receptores solubles para TNF (T-BP-1 y T-BP-2) que modulan los efectos perjudiciales que puede provocar esta citoquina (Fernández-Botran *et al.*, 1996).

g.1) *Funciones* (Fernández-Botran *et al.*, 1996; Roitt *et al.*, 2001; Stabel *et al.*, 1995; Tizard, 2000):

- Es un importante factor pro-inflamatorio que induce la producción de otras citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8) y potencia la expresión de MHC-I.
- Produce la activación de monocitos, PMN y es coestimulador de linfocitos T y B.
- Incrementa la fagocitosis y la citotoxicidad de neutrófilos y macrófagos, siendo un potente quimiotáctico de neutrófilos.
- Junto con IL-1, es responsable de diversas alteraciones en el endotelio incrementando la expresión de moléculas de adhesión al endotelio, inhibiendo los mecanismos anticoagulantes y promoviendo los procesos trombocíticos.
- Junto al INF- γ posee un efecto antivírico.
- Estimula la liberación de INF- γ por parte de las células NK.

h) INF- γ

Las células T y células NK son las principales productoras de INF- γ . Esta citoquina tiene actividad antivírica e inmunomoduladora siendo una citoquina importante dentro de todo el proceso de la respuesta inmune. El receptor para INF- γ , denominado INF-R tipo 2, se expresa en todas las células excepto eritrocitos (Fernández-Botran *et al.*, 1996).

h.1) *Funciones* (Fernández-Botran *et al.*, 1996.; Janeway *et al.*, 2001; Roitt *et al.*, 2001; Tizard, 2000):

- Es el activador de macrófagos más potente que se conoce incrementando la expresión de MHC-I y MHC-II.
- Induce la secreción de TNF- α al actuar sobre los monocitos y macrófagos.
- Activa las células NK, neutrófilos y células endoteliales.
- Junto a IL-12 induce la diferenciación de células Th a Th1.
- Tiene actividad antivírica y antiparasitaria.
- Promueve la maduración de linfocitos Tc siendo un modulador del crecimiento y diferenciación de células T.
- Es un potenciador de la respuesta de estas células a los factores de crecimiento.
- Antagoniza el efecto de IL-4, inhibiendo el crecimiento de células B y la producción de IgG1 e IgE, favoreciendo la producción de IgG2.

4. Técnicas de medición de la respuesta inmune

Para el estudio y medición de la inmunidad se utilizan diversas técnicas con el objetivo de analizar células, anticuerpos, antígenos, proteínas, mediadores, secuencias genéticas, etc. En este apartado describiremos, brevemente, las técnicas utilizadas en nuestros estudios, sus ventajas e inconvenientes.

a) Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La técnica de RT-PCR consiste en la transcripción inversa de mRNA para la posterior amplificación de forma exponencial de secuencias específicas de DNA complementario (cDNA) a través de la síntesis enzimática. Este cDNA se desnaturaliza mediante calor en dos cadenas sencillas para la realización de la hibridación de los iniciadores o “*primers*” a los lugares específicos de cada una de las cadenas separadas, llevándose a cabo por último la extensión, por efecto del enzima DNA polimerasa. Este proceso se realiza múltiples veces para obtenerse un número de copias exponencial de la cadena original de DNA (Beverly *et al.*, 1993; MacPherson y Moller, 2000; Taylor, 1993) (figura 6).

El uso del RT-PCR presenta una serie de ventajas y desventajas:

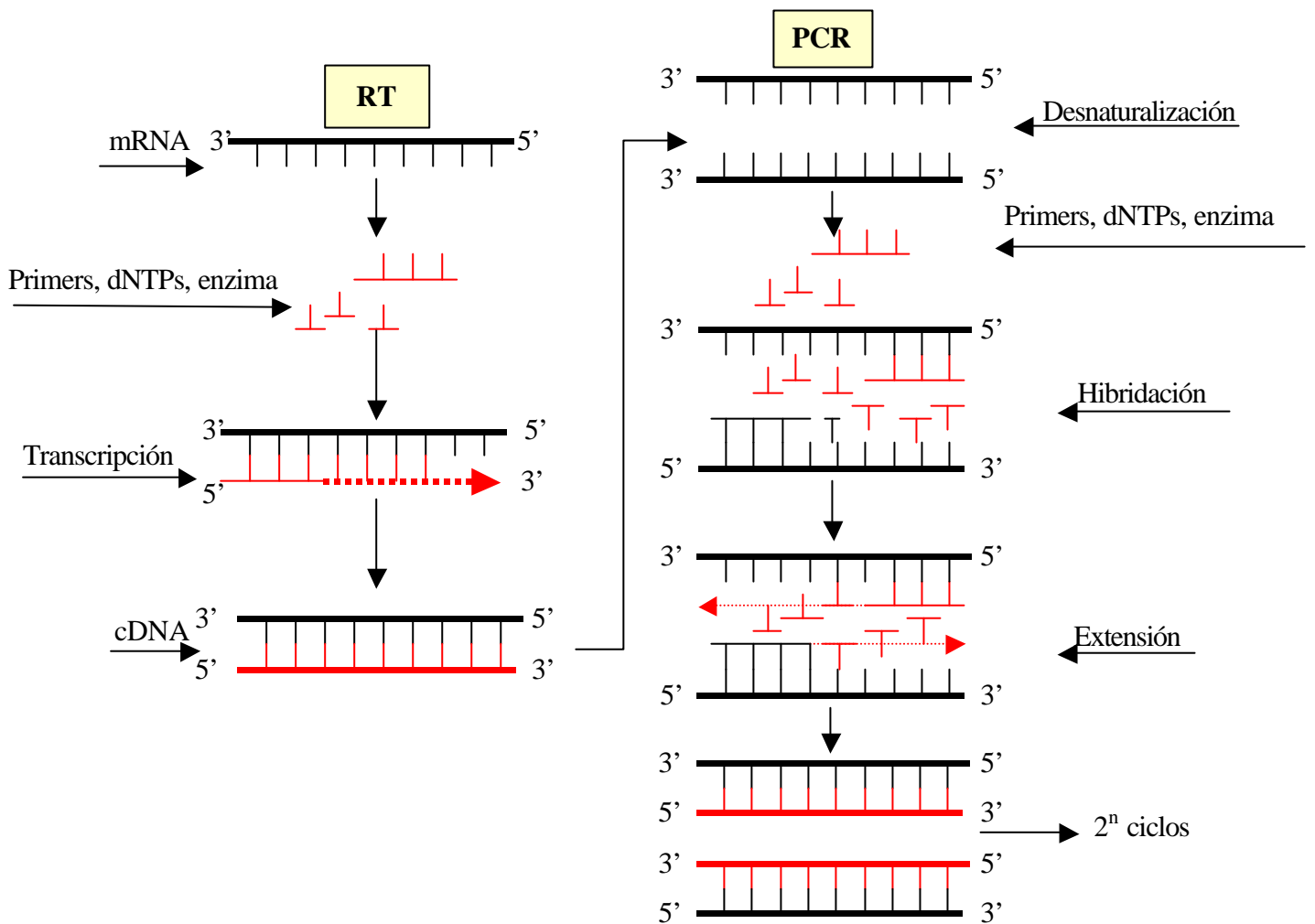
a.1) Ventajas:

- Es una prueba muy específica, sensible y relativamente rápida que permite la replicación del DNA a partir de segmentos muy pequeños.
- Se puede realizar a partir de diferentes tipos de muestras (sangre, tejidos, células, sudor, orina, semen, cultivos).
- Con una misma prueba y en un mismo procesamiento se pueden analizar varias citoquinas a la vez.
- A partir del segmento amplificado se puede realizar directamente su secuenciación
- Mediante esta técnica se pueden detectar mutaciones.
- Pueden detectarse varias citoquinas de forma simultánea mediante técnicas múltiplex.

a.2) Desventajas:

- Costo.
- Detecta la expresión de citoquinas, pero no la secreción de la misma por lo que los resultados obtenidos no implicaban necesariamente la producción de un efecto biológico.
- Errores muy pequeños pueden llevar a grandes fallos.

Figura 6. Esquema de la RT-PCR.



b) ELISA

La prueba de inmunoabsorción ligada a enzima es una técnica muy utilizada en inmunología por la posibilidad de estudiar muchas muestras a la vez así como su rapidez. La prueba de ELISA, se basa en una reacción antígeno-anticuerpo en la que una de las fases reaccionantes está inmovilizada en una superficie sólida. La unión antígeno-anticuerpo se revela mediante el uso de conjugados de tipo enzimático (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) y la adición de un sustrato que produce color al reaccionar con la enzima.

Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA que permiten aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba (ELISA indirecto, de captura, de competición, sandwich, etc.). Este método permite no solo detectar la proteína que se desea determinar sino realizar la cuantificación de la misma.

Al igual que otras técnicas, cuenta con ventajas y desventajas:

b.1) *Ventajas:*

- Es una técnica que permite el estudio de muchas muestras a la vez y la realización de un gran número de pruebas en un tiempo relativamente corto.
- Permite el estudio de la secreción de citoquinas, anticuerpos, etc., a partir de diferentes fluidos (suero, leche, calostro, etc.) y sobrenadantes de cultivos celulares.
- Se puede estudiar tanto cuantitativamente como cualitativamente la producción de factores solubles como citoquinas.
- Bajo coste.

b.2) *Desventajas:*

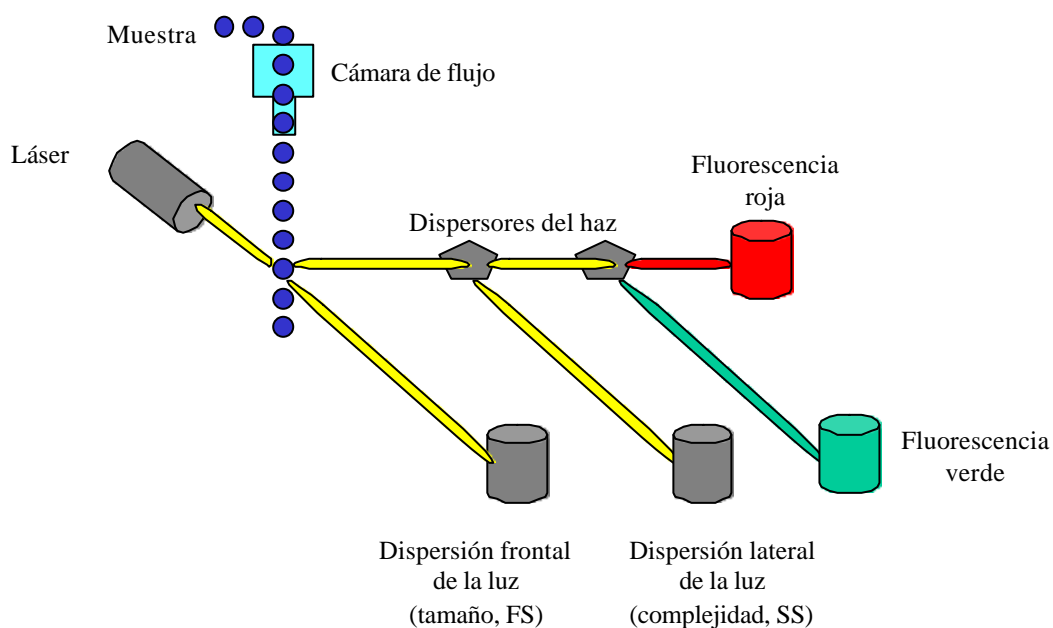
- En el caso de citoquinas, puede ocurrir la expresión de la citoquina pero no su secreción por lo que no se detectaría por esta técnica.
- Es necesario esperar varios días tras la infección para detectar una respuesta de anticuerpos.

- Pueden haber reacciones cruzadas.
- En el cerdo no están disponibles comercialmente anticuerpos monoclonales contra muchas de las citoquinas.

c) Citometría de flujo

La citometría de flujo permite realizar el análisis de la morfología y características de las células, el análisis de proteínas celulares, parámetros bioquímicos, citoquinas, etc. Se basa en la posibilidad de hacer fluir células de una suspensión celular de forma individual a través de un flujo líquido de tipo capilar. En su recorrido las células son interceptadas por un haz de luz láser. Al chocar con las células, se produce una dispersión frontal de la luz que permite determinar el tamaño de las mismas, y una dispersión lateral que será en función de la complejidad de la célula (gránulos, tamaño de núcleo, organelas, etc.). Las células que se analizan pueden marcarse con anticuerpos específicos para distintos epítomos (receptores, citoquinas, etc.) conjugados con sustancias fluorescentes que poseen la capacidad de excitarse al pasar por el haz de rayo láser. La intensidad de la fluorescencia emitida es proporcional al marcaje realizado (figura 7).

Figura 7. Citómetro de flujo.



Al tratarse de un análisis célula a célula, pueden determinarse tanto la frecuencia de células pertenecientes a un determinado fenotipo como la intensidad de la expresión de la molécula analizada en cada célula permitiendo determinar la presencia de la diana marcada.

En su aplicación en inmunología, las técnicas de citometría de flujo se han utilizado básicamente en la valoración de las subpoblaciones celulares, la medición de la producción de citoquinas y en ensayos destinados al estudio de la capacidad efectora de células fagocíticas (Carter y Ormerod, 2000; Groves *et al.*, 1993; Jensen-Waern *et al.*, 1994; Karkmann *et al.*, 1999; Maino y Picker, 1998; Wang *et al.*, 1988).

La citometría de flujo presenta una serie de ventajas y desventajas :

c.1) Ventajas:

- Permite realizar el análisis de la morfología y las características de gran cantidad de células de manera rápida.
- Se puede realizar el estudio de poblaciones y subpoblaciones de células de acuerdo a su complejidad, receptores y moléculas de superficie simultáneamente.
- Mediante un solo equipo se puede realizar el estudio de múltiples variables, parámetros funcionales y respuestas celulares como el contenido de ácido nucleico, actividad enzimática, influjo de calcio, potencial de membrana, fagocitosis, viabilidad celular, apoptosis, ciclos celulares, estado funcional y maduración de las células.

c.2) Desventajas:

- Se realiza por medio de un equipo sofisticado y caro.
- No permite la evaluación de factores solubles, proteínas libres, anticuerpos en sangre.
- Solo permite la evaluación simultánea de hasta cuatro parámetros al poseer solo cuatro sensores de luz de fluorescencia (FL).

5. Inmunomodulación

La inmunomodulación consiste en la manipulación del sistema inmunológico a través del uso de sustancias de origen biológico o químico para producir una respuesta inmune adecuada al estado que se desea tratar. Así, en algunos casos, la finalidad será aumentar la intensidad de la respuesta (inmunosupresión, estrés, vacunación, infecciones, etc.), mientras que en otros casos se tratará de reducirla (enfermedades autoinmunes, alergias, trasplantes, hipersensibilidad, etc.)

Según Quinn (1990), el uso de los inmunomoduladores en animales domésticos tiene como objetivos concretos:

- La producción de una respuesta más intensa y efectiva contra agentes productores de enfermedades clínicas o subclínicas.
- Acelerar la maduración de la inmunidad específica e inespecífica en animales neonatos, jóvenes y susceptibles de infecciones.
- Provocar reacciones inmunes intensas en tejidos y órganos invadidos por microorganismos, con la finalidad de incrementar la respuesta protectora en sitios como glándula mamaria, tracto gastrointestinal, respiratorio, genital, etc.
- Incrementar la respuesta inmune específica, celular y humoral, tras la vacunación.
- Reducir los efectos de la inmunosupresión causada por estrés o agentes infecciosos que interfieren en el funcionamiento de las células del sistema inmune o que producen infección permanente.
- La estimulación selectiva de componentes de la inmunidad específica y/o inespecífica que conlleve a una protección contra la replicación de los agentes patógenos.

Un inmunomodulador ideal debe poseer una serie de características para su uso en los animales domésticos (Quinn, 1990):

- No debe ser tóxico o pirogénico aún a altas dosis ni poseer actividad teratogénica, carcinogénica o tener algún efecto adverso a largo plazo.

- Si es administrado con vacunas debe poseer un efecto de adyuvante e incrementar la respuesta inmune.
- Debe estimular la inmunidad inespecífica frente a patógenos.
- Incrementar la respuesta primaria y secundaria a agentes infecciosos.
- El compuesto del producto debe ser inactivado o biodegradado en el medio ambiente y no debe excretarse en leche o huevos.
- Debe ser activo por vía oral y mantener su estabilidad en agua y alimentos.
- Debe ser compatible con otros fármacos incluidos antibióticos y antiparasitarios.

a) *Mecanismo de acción*

El modo de acción de muchos inmunomoduladores no es completamente conocido, aunque generalmente sus principales dianas en el sistema inmune son los linfocitos T y B, monocitos/macrófagos, granulocitos y células NK. Sin embargo, se han comprobado y propuesto diversas hipótesis que podrían explicar la actuación de algunos de estas sustancias.

Muchas de las formas de acción de los inmunomoduladores están basadas en la alteración que producen en la actividad de las células inmunes, cambios en la expresión genética, procesamiento del RNA mensajero, transporte intracelular de proteínas, síntesis proteica y la secreción y expresión de proteínas en la superficie celular lo cual induce cambios celulares que pueden influir en el inicio, consecución y regulación de la respuesta inmune (Quinn, 1990; Pell, 1995). En muchos casos, se ha observado que la acción de los inmunomoduladores está relacionada con el mecanismo y equilibrio del adenosina-mono-fosfato cíclico (cAMP) y la guanina-mono-fosfato cíclico (cGMP) (Kehrli y Thot, 1990; Quinn, 1990). Se ha demostrado que el aumento de los niveles de cAMP inhibe la función efectora de los linfocitos lo que conlleva a una inmunosupresión, mientras que altos niveles de cGMP promueven un incremento de la actividad de los linfocitos maduros lo que se traduce en una inmunoestimulación (Mulcahy y Quinn, 1986; Quinn, 1990).

b) Clasificación

La clasificación estricta de los inmunomoduladores de acuerdo a su actividad es difícil porque en muchos de los casos no se conocen exactamente los mecanismos de acción, así que nos basaremos en las clasificaciones realizadas por Mulcahy y Quinn (1986), Quinn (1990) y Reddy y Frey (1990), de acuerdo al origen de los compuestos utilizados como inmunomoduladores (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de inmunomoduladores según su origen

Origen microbiológico	Origen fisiológico	Origen químico o sintético
LPS	Citoquinas	Isoprinosines
Lípido A	Hormonas tímicas	Polinucleótidos sintéticos
Muramil-dipéptido	Hormonas neuroendocrinas	Dihidroheptaprenol
Polisacáridos fúngicos	Glucocorticoides	Avridine
Ciclosporina A	Péptidos opiáceos	Imutiol
<i>Propionibacterium</i> spp.		Glucan
<i>Cándida</i> spp.		Levamisol
<i>Klebsiella</i> spp.		Tiabendazol
<i>Mycobacterium</i> spp.		Derivados de ácido
<i>Streptococcus</i> spp.		ascórbico
<i>Staphylococcus</i> spp.		
Poxvirus		

En medicina humana y veterinaria, existen productos comerciales indicados como inmunomoduladores. En veterinaria se han utilizado, con buenos resultados, como inmunoestimulantes o como terapia complementaria al tratamiento de diversas enfermedades. Se han usado productos basados en *Propionibacterium acnes* para producir la estimulación de los macrófagos, la activación de linfocitos CD8, el incremento de la fagocitosis en neutrófilos y monocitos y la producción de citoquinas. Estos productos se han empleado en la resolución de patologías crónicas de piel en perros como demodicosis y pioderma, también se han demostrado útiles en el tratamiento de tumores mamarios caninos y en el complejo

respiratorio equino (Becker *et al.*, 1989; Cox, 1988; DeBoer *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1988; Flaminio *et al.*, 1998; Van Kampen, 1997).

El *Propionibacterium granulosum* y lipopolisacárido, solos o combinados, están presentes en productos comerciales cuya acción sobre el sistema inmune ha sido parcialmente estudiada (Álvarez *et al.*, 1998, Gallego-Olivella *et al.*, 1998; González *et al.*, 1993; Ortiz *et al.*, 1996). Estos compuestos se han utilizado en el cerdo disminuyendo los efectos adversos de la inmunodepresión causada por enfermedades víricas como la enfermedad de Aujeszky y peste porcina clásica (Markowska-Daniel *et al.*, 1993a) ó para reducir las lesiones, morbilidad y mortalidad causada por la neumonía enzoótica porcina (Stipkovits *et al.*, 1998). Otros estudios apuntan su eficacia en la disentería hemorrágica (Ferro *et al.*, 1999b) y, en general, parecen producir una mejoría en los parámetros productivos y reproductivos (Erazo *et al.*, 2001; Ferro *et al.*, 1999b; Markowska-Daniel *et al.*, 1993a).

Cepas de distintos *Mycobacterium* también se encuentran entre estos productos. Su efecto es la activación de macrófagos, la producción de citoquinas y el incremento en la actividad y número de linfocitos (Comack *et al.*, 1991; Kleinschuster *et al.*, 1981; Van Kampen, 1997). Su administración en bovinos afectados por mamitis ha contribuido a mejorar el cuadro clínico (Blecha, 2001) y, así mismo, producir una reducción en la progresión de carcinoma ocular en bovinos (Kleinschuster *et al.*, 1981). En equinos se ha utilizado como terapia complementaria en el complejo respiratorio con buenos resultados (Blecha, 2001).

En leucemia felina se ha utilizado un poxvirus lográndose incrementar la supervivencia de los animales afectados (Hartmann *et al.*, 1999) Así mismo existen comercialmente otros productos a base de *Staphylococcus aureus*, ciclosporina, derivados de levaduras, muramil-dipéptido, etc., que, en general, estimulan la funcionabilidad de las células que participan en la respuesta inmune y la producción de citoquinas (Blecha, 2001; Gialdroni-Grassi y Grassi, 1985; Quinn, 1990; Van Kampen, 1997).

Entre las diversas sustancias y productos utilizados como inmunomoduladores están el lipopolisacárido (LPS) y el *Propionibacterium granulosum* (Pg).

c) Lipopolisacárido

El LPS es un componente que se encuentran en mayor proporción en la pared de bacterias gram negativas, siendo una de las mayores toxinas que poseen. El LPS induce en el hospedador una serie de alteraciones y manifestaciones clínicas como fiebre, vómito, anorexia, soñolencia, letargia, diarrea, decaimiento general, hipotensión, coagulación intravascular diseminada, necrosis tisular, degradación de proteína muscular, disminución del rendimiento cardíaco, apoptosis, inducción de mediadores inflamatorios y shock endotóxico (Adams *et al.*, 1990, Klir *et al.*, 1997; Norimatsu *et al.*, 1995; Webel *et al.*, 1997). El LPS está compuesto por dos partes, una cadena de oligosacáridos-polisacáridos y el lípido A los cuales son, estructuralmente, similar en todas las especies de bacterias gram negativas (Jacobs, 1982; Mulcahy y Quinn, 1986; Sunwo *et al.*, 1996).

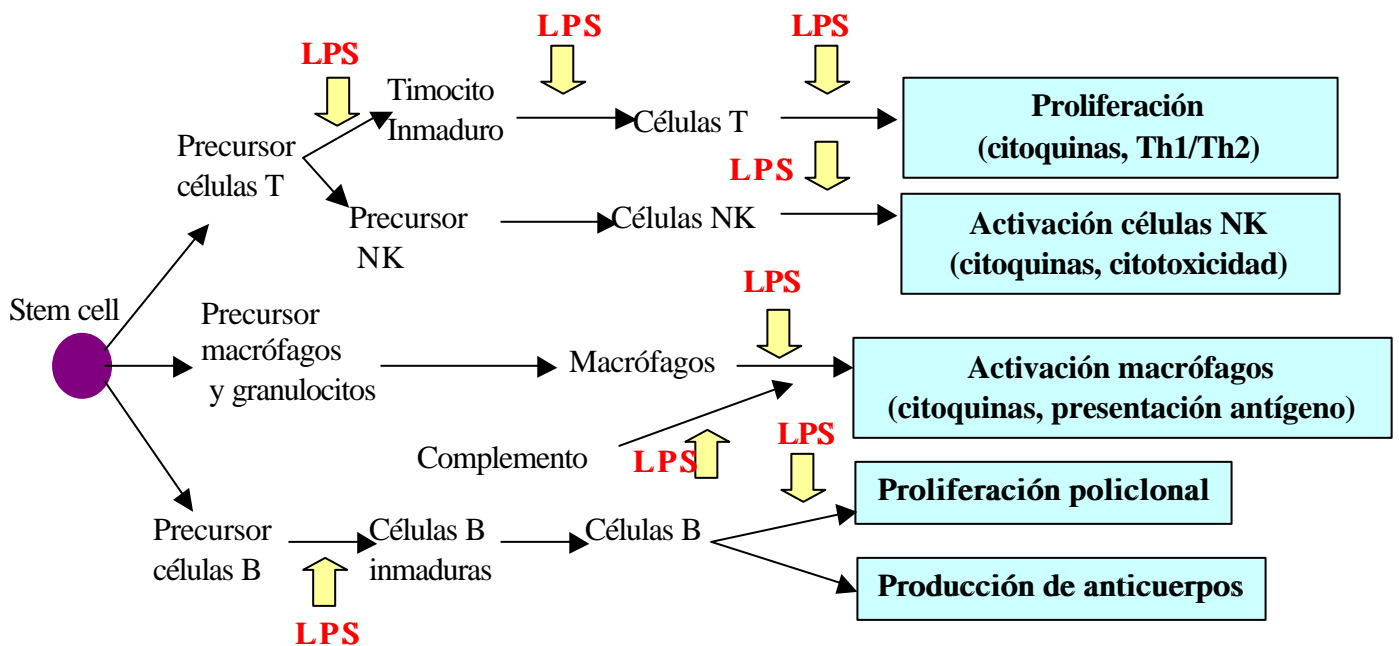
Sin embargo, el LPS es un potente estimulante del sistema inmunitario con diferentes efectos biológicos e inmunoestimulantes. Su efecto inmunológico depende, básicamente, del lípido A, el cual esta constituido por una estructura de monosacáridos y disacáridos así como de ácidos grasos (Alving, 1993). El LPS o el lípido A aplicados perenteralmente, dejan rápidamente el torrente sanguíneo y se acumulan en los macrófagos donde se unen a su receptor, CD14. Seguidamente se produce la fosforilación y activación de determinada proteína kinasa, así como el aumento en los mecanismos de transducción de señal, lo que produce la estimulación de las funciones de los macrófagos y la secreción de citoquinas por parte de éstos (Alving, 1993; Basta *et al.*, 2001).

En muchos casos, el LPS puede inducir una respuesta inmune exacerbada que contribuye a las lesiones que se producen en el ámbito local en el sitio de infección, como por ejemplo sucede en la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Baarsch *et al.*, 1995). Sin embargo, a pesar de esto, existen LPS seguros y detoxificados que se utilizan como estimulantes para el estudio del sistema inmunitario y como inmunomoduladores (Hadden, 1993). En medicina humana se ha utilizado el lípido A como adyuvante para incrementar la respuesta inmune frente a la toxina del cólera, *Herpes simplex*, virus de Epstein Barr, *Plasmodium falciparum* y *Neisseria meningitidis* (Alving, 1993; Verma *et al.*, 1992)

Diversos autores han comprobado los efectos que el LPS produce sobre el sistema inmunitario (Charley, 1986; Jacobs, 1982; Marshall y Zielger, 1989; Mulcahy y Quinn, 1986; Norimatsu *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2000; Zabala y Lipsky, 1982) (figura 8):

- Es un activador de neutrófilos, células T y macrófagos, incrementando en estos últimos la actividad citotóxica antitumoral siendo considerado como un potente inmunomodulador.
- Actúa como mitógeno directamente sobre las células B, independiente de células T.
- Es un estimulante policlonal de las células productoras de inmunoglobulina y actúa como un adyuvante inespecífico
- Estimula la producción y liberación de IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y molécula intracelular de adhesión-1 (ICAM-1) por parte de macrófagos, linfocitos, células NK y fibroblastos duodenales.
- Incrementa la respuesta inmune de las placas de Peyer y el cGMP en los linfocitos.
- Activa la cascada de reacciones de la respuesta de fase aguda.
- Utilizado de manera intrauterina en vacas incrementa el conteo de leucocitos.

Figura 8. Sitios de acción de LPS en el sistema inmune (Hadden, 1993)



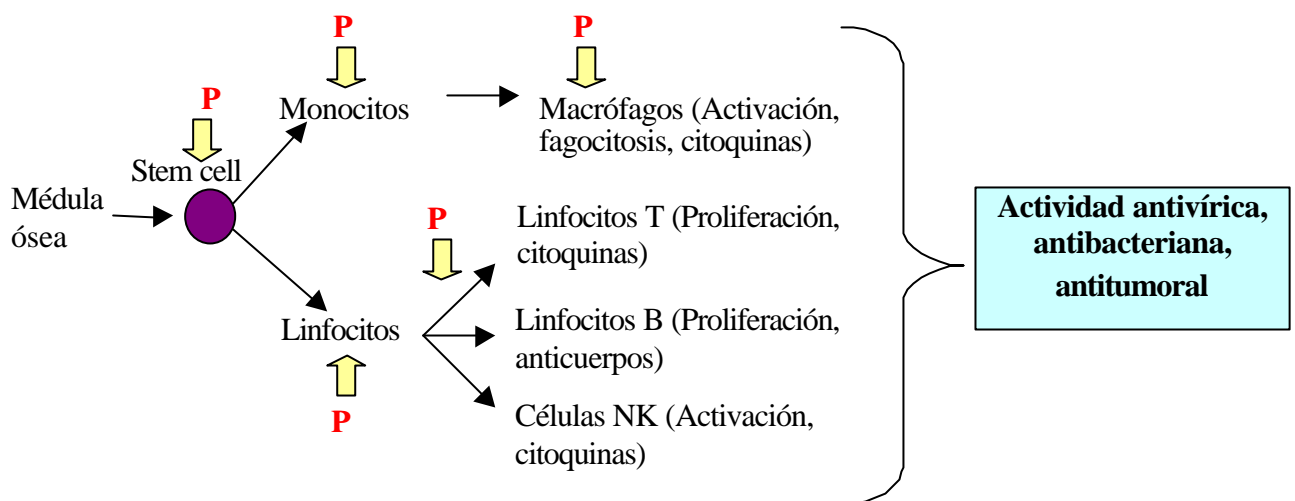
d) *Propionibacterium granulosum*

El género *Propionibacterium* esta conformado por bacterias corineformes gram positivas (*P. granulosum*, *P. acnes*, *P. avidum*) que poseen entre sí una homología de 12% a 50%. Se encuentran en la piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal y urogenital, pudiendo algunas de ellas causar infecciones como acné y endocarditis (Cummins, 1989). Tienen una particular composición de la pared celular, carbohidratos, peptidoglicán, muramildipéptido y lípidos, que los hace resistentes a la degradación intracelular (Dawes *et al.*, 1974; Ko *et al.*, 1981; Quinn, 1990).

En el ámbito inmunológico, producen una serie de efectos sobre el sistema inmune entre los cuales se encuentran (Hirt *et al.*, 1978; Kirchner *et al.*, 1977; Kirchner *et al.*, 1978; Okamura *et al.*, 1982; Okamura *et al.*, 1987; Roszkowski *et al.*, 1990; Sugiyama y Epstein, 1978) (figura 9):

- Modula la respuesta celular incrementando la activación de macrófagos, la fagocitosis, las propiedades adhesivas de los fagocitos, la aparición de vacuolas en el citoplasma, aumentando el número de fagocitos en bazo, pulmones, hígado y nódulos linfáticos.
- Incrementa la habilidad de los macrófagos para cooperar con los linfocitos T y B mejorando el procesamiento y presentación de antígenos, incrementando la respuesta humoral tanto de manera dependiente como independiente de linfocitos T, aumentando significativamente los títulos de anticuerpos al ser utilizado como adyuvante.
- Incrementa la actividad de las células NK.
- Produce un aumento en la producción de TNF e INF incrementando la resistencia antivírica y antibacteriana.
- Produce hiperplasia linfoide en timo y nódulos linfáticos.
- Incrementa la proliferación e infiltración de histiocitos y células hematopoyéticas.
- Produce estimulación del sistema retículo endotelial.
- Posee actividad antitumoral reduciendo el crecimiento de tumores.

Figura 9. Efecto de *Propionibacterium* (P) en el sistema inmune (Roszkowski *et al.*, 1990).



Estas bacterias se han utilizado en medicina humana y veterinaria como tratamiento complementario en pacientes con cáncer (Gialdroni-Grassi y Grassi, 1985; Quinn, 1990), para incrementar la resistencia frente a enfermedades víricas y bacterianas (Blecha, 2001; Kirchner *et al.*, 1977; Kirchner *et al.*, 1978; Markowska-Daniel *et al.*, 1993b; Quinn 1990) y para producir incremento de la activación de fagocitos y maduración de granulocitos (Ko *et al.*, 1981; Markowska-Daniel *et al.*, 1992b; Quinn, 1990; Roszkowski *et al.*, 1990).

e) Asociación LPS-*Propionibacterium*

En diversos ensayos se ha estudiado la efectividad de la combinación de lipopolisacárido y la bacteria *Propionibacterium* como inmunomodulador, siendo uno de los efectos más relevantes el incremento significativo de los niveles de excreción de INF- γ en ratones y humanos (Okamura *et al.*, 1982; Okamura *et al.*, 1987; Sugiyama y Epstein, 1978). INMD es un inmunomodulador compuesto por LPS detoxificado de *Escherichia coli* (*Master CM29:145*), obtenido por solubilización selectiva de componentes de la membrana, y células inactivadas de *Propionibacterium granulosum*.

En diversos ensayos, INMD ha demostrado ejercer efectos sobre el sistema inmune. En ensayos *in vitro*, utilizando células mononucleares de sangre periférica de cerdos, INMD produjo la transcripción de RNA para IL-1 y TNF- α , expresión de CD25 así como la proliferación de

linfocitos al ser utilizado con dosis subóptimas de concavalina A (Álvarez *et al.*, 1998). Así mismo en diversos experimentos realizados *in vivo*, se ha observado su efecto sobre la respuesta inmune humoral. Utilizado en cerdas preñadas, que fueron vacunadas contra el virus de la enfermedad de Aujeszky 21 días pre-parto se incrementó significativamente la concentración de IgA frente al virus de la enfermedad de Aujeszky en calostro (Ortiz *et al.*, 1996). Administrado en cerdas gestantes, 96 horas previas al parto, redujo la mortalidad de lechones pre-destete en un 20%, incrementándose, así mismo, la ganancia de peso y el índice de conversión. Por otra parte, estas cerdas tratadas con INMD tuvieron una menor incidencia de metritis post-parto (Erazo *et al.*, 2001). Aplicado directamente en lechones sometidos al estrés de transporte, desde una granja reproductora al sitio de engorde donde se realizó un posterior reagrupamiento, INMD redujo en un 13,8% los niveles de cortisol en sangre en los animales tratados (Ducha *et al.*, 1996).

La aplicación de este inmunomodulador frente a diferentes patologías porcinas ha demostrado ejercer un efecto positivo en el control y resolución de las mismas, mejorando los parámetros productivos. En lechones expuestos a *Mycoplasma hyopneumoniae* se ha observado una reducción de lesiones pulmonares incrementándose la ganancia de peso (Marca *et al.*, 1996; Stipkovits *et al.*, 1998). En procesos entéricos causados por *Escherichia coli* y *Brachyspira hyodysenteriae*, se observó que el uso de INMD produjo una reducción del número de cerdos con diarrea así como los que tuvieron que ser tratados parenteralmente (Ferro *et al.*, 1999a; Ferro *et al.*, 1999b).

Para aves de corral existe comercialmente un compuesto inmunomodulador similar a INMD (LPS detoxificado de *Escherichia coli* y células inactivadas de *Propionibacterium acnes*), que utilizado en aves inmunosuprimidas con ciclofosfamida, fue capaz de incrementar la respuesta humoral primaria y el crecimiento y peso de la bolsa de Fabricio (Sisquella, 2000). En otro ensayo donde las aves fueron inoculadas con del virus de la enfermedad de Marek, se observó una supervivencia mayor de las aves tratadas con INMD, produciéndose así mismo una disminución en el daño histológico en la bolsa de Fabricio (Sisquella, 2000).

En ratones, también esta combinación de LPS y Pg ha producido la activación específica de linfocitos B (Gallego-Olivella *et al.*, 1998) y, administrado en ratones inmunosuprimidos, fue capaz de inducir un incremento en la proliferación de las células B IgA+ e IgM+ en los nódulos

mesentéricos, así como de linfocitos B IgA+ en la lámina propia de las vellosidades intestinales (Gonzalez *et al.*, 1993).

II. HIPÓTESIS

INMD:

- a) Producirá la estimulación de la expresión/secreción de citoquinas por parte de macrófagos alveolares y linfocitos.
- b) Aumentará la capacidad fagocítica de neutrófilos así como la presentación de antígenos de macrófagos.
- c) Producirá la activación de linfocitos.
- d) Incrementará la producción de inmunoglobulinas por parte de linfocitos B.

III. OBJETIVOS

1. General

Determinar los mecanismos de acción y efecto del compuesto inmunomodulador INMD sobre el sistema inmunológico del cerdo.

2. Específicos

Determinar el efecto de INMD y/o sus componentes por separado sobre :

- a) Las respuestas de producción y/o expresión de citoquinas en macrófagos alveolares y linfocitos.
- b) La activación de la fagocitosis en neutrófilos polimorfonucleares.
- c) La activación celular en linfocitos T y B a través de la determinación del receptor para IL-2 (CD25) y la presentación de antígeno por macrófagos (MHC-II).
- d) La respuesta humoral y celular, *in vivo*, frente a un antígeno específico.

IV. ESTUDIOS IN VITRO

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Expresión y producción de citoquinas

Para la determinación de la expresión de las citoquinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 se utilizó la técnica de RT-PCR semicuantitativa, mientras que la producción de TNF- α e INF- γ se evaluó mediante un ELISA de captura.

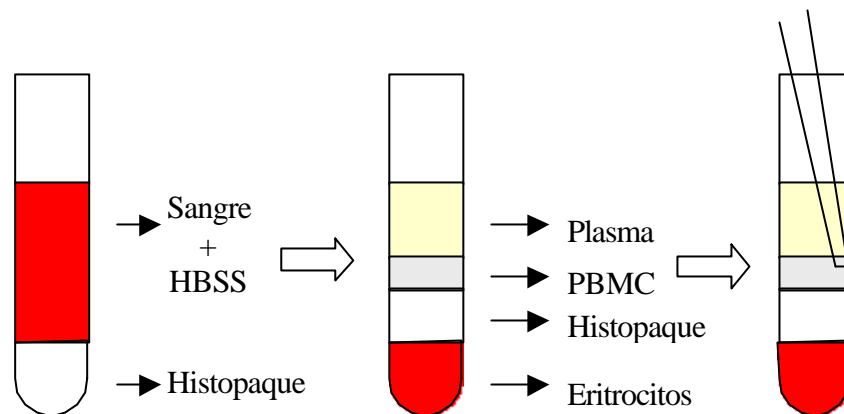
1.1.1. RT-PCR

a) *Células mononucleares de sangre periférica (PBMC).*

Para este ensayo se utilizaron cuatro cerdos Landrace-York de alta sanidad (libres del virus de la enfermedad de Aujeszky, síndrome respiratorio reproductivo porcino y Micoplasma) aportados por el Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentaries (IRTA, Barcelona), a partir de los cuales se obtuvieron muestras de sangre colectadas en tubos con heparina mediante punción de la vena cava anterior o yugular. Todos los procedimientos a los que se sometieron estos animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Las PBMC se separaron del resto de tipos celulares por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Histopaque 1.077 (Sigma). Para ello, se realizó una dilución (1:1) de la sangre entera en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Sigma) (5 ml : 5 ml). A continuación se añadió Histopaque 1.077 a un volumen igual que el utilizado de sangre entera (5ml), formándose 2 fases, una que contenía la sangre diluida y otra donde se encontraba el Histopaque. Tras una centrifugación (500 xg, 30 minutos), se formaron cuatro fases (plasma, PBMC, Histopaque y resto de fracciones celulares) de las cuales se tomó, por medio de una pipeta pasteur estéril, la interfase que contenía las células mononucleares (figura 10).

Figura 10. Obtención de PBMC por gradiente de densidad



Seguidamente se realizaron dos lavados de las PBMC con HBSS durante 10 minutos a 200 xg para posteriormente resuspenderlas en 5 ml de RPMI-1640 completo (1mM de aminoácidos no esenciales, 1mM de piruvato sódico, 5mM de 2-mercaptoetanol, 50.000 UI/l de penicilina, 50 mg/l de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal bovino) (Life Technologies). Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml tras recuento en cámara de Neubauer, usando azul tripan para la evaluación de la viabilidad. Se aceptaron únicamente aquellas suspensiones que presentaron una viabilidad igual o superior a 95%. Posteriormente se dispuso 1 ml de la suspensión celular en placas de 24 pocillos de fondo plano (Costar), estimulándose con INMD ($5 \mu\text{g/ml}$ de LPS y $62,5 \mu\text{g/ml}$ de Pg), $5 \mu\text{g/ml}$ de LPS de *E. coli* (Sigma), $10 \mu\text{g/ml}$ fitohemaglutinina (PHA)(Sigma), cepa Juanola del virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) a una multiplicidad de infección (MI) de 0,1. Todos los cultivos se realizaron por triplicado y se incluyeron controles sin estimular. Las incubaciones se realizaron en una estufa a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO_2 durante 24 horas.

b) Macrófagos alveolares

Se realizó el sacrificio de los animales por medio de sobredosis de pentobarbital sódico, extrayéndose inmediatamente los pulmones. Los macrófagos alveolares se obtuvieron mediante lavados broncoalveolares utilizando HBSS a través de la traquea, según técnica descrita por Williams (1978). La suspensión obtenida se centrifugó durante 15 minutos a 500 xg, realizándose posteriormente dos lavados de las células con HBSS durante 5 minutos a 250

xg para proceder a la resuspensión de las células en 5 ml de RPMI-1640 completo. Seguidamente, los macrófagos alveolares se ajustaron a una concentración de 1×10^5 células/ml dispensando 1 ml/pocillo de la suspensión celular en placas de 24 pocillos. Las células se estimularon con INMD y LPS (a la misma concentración que para los PBMC) o no se estimularon. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda en 5% de CO₂, realizándose los diferentes cultivos por triplicado. A los tiempos 0 (10 minutos posteriores a la colocación del estímulo), 1 h, 4 h, 6 h y 24 horas tras la estimulación se procedió a la recolección de los macrófagos y los sobrenadantes del cultivo.

c) *Extracción de RNA*

La extracción del RNA total se realizó utilizándose Trizol (Life Technologies) y solventes orgánicos. Una vez recolectada la suspensión celular de los cultivos de PBMC o macrófagos alveolares, se realizó una centrifugación a 500 xg durante 5 minutos separándose el sobrenadante, el cual se congeló a -80 °C, utilizándose las células para la extracción del RNA. Se añadió 1 ml de Trizol por cada millón de células y se añadieron 200 µl de cloroformo y 5 µg/tubo de glucógeno. A continuación se centrifugó durante 15 minutos entre 2-8 °C (< 12.000 g), tras lo que se formaron dos fases, una inferior que contenía el Trizol y otra fase superficial acuosa que contenía el RNA. Esta fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, al cual se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico con el objetivo de precipitar el RNA. A continuación se incubó la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente para inmediatamente centrifugarla durante 10 minutos entre 2-8 °C (< 12.000 g), formándose, en el fondo del tubo, un depósito de RNA. Inmediatamente se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se agregó etanol al 75% centrifugándose durante 5 minutos entre 2-8 °C (<7.500 xg). Este depósito se dejó secar al aire y se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNAsas y DNAsas (Sigma). Cuando las muestras de RNA no se utilizaron inmediatamente, se congelaron a -80°C.

d) *Transcripción inversa (RT)*

Tanto la transcripción inversa como la reacción en cadena de la polimerasa, se realizaron basadas en protocolos descritos anteriormente (Beverly *et al.*, 1993; Lagoo-Deenadaylan *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994).

Para la transcripción inversa se utilizó la suspensión de RNA obtenida de las PBMC ó macrófagos alveolares, que, inicialmente, se incubó en baño de maría a 70°C durante 10 minutos, refrigerándose inmediatamente. De la suspensión de RNA, se añadieron 3 µl a una mezcla (mezcla-RT) que contenía 1X tampón para PCR, 5 mM MgCl₂, 1mM dNTPs, 10 U de inhibidor de RNAsa, 2,5 µM hexámeros aleatorios (todos de Perkin-Elmer) y 50 U de transcryptasa inversa (Life Technologies) para un volumen final de 20 µl. Posteriormente, se realizó la incubación de la mezcla-RT durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se incubaron los tubos en el termociclador durante 15 minutos a 42 °C y 5 minutos a 99 °C para detener la reacción e inactivar el enzima. Tras refrigerarse a 4°C, el cDNA resultante se diluyó en 30 µl de agua libre de RNAsas y DNAsas congelándose a -80°C cuando no se utilizó inmediatamente.

e) *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

El diseño de los "*primers*" utilizados (tabla 3), se realizó a partir de las secuencias correspondientes disponibles en GenBank, utilizando para ello el programa Primer 0,5 (Napiwotzki *et al.*, 1995), excepto para el enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), que se tomó de una referencia publicada (Rottman *et al.*, 1996). El enzima G3PDH participa en la glucólisis y está presente en todas las células de forma constante independientemente del estado de activación celular (Rottman *et al.*, 1996). Por este motivo se utilizó como control positivo en la determinación de la expresión de las citoquinas mediante PCR.

Para realizar la prueba de PCR, se mezclaron 5 µl del cDNA diluido con 1X tampón para PCR, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 2,5 U de DNA-polimerasa (Taq Gold) (todos de Perkin-Elmer) y 0,5 µM del "*primer*" a utilizar (1 µM para IL-4) para un volumen final de

50 µl (mezcla-PCR). Se colocó la mezcla-PCR en el termociclador 12 minutos a 95 °C, 4 minutos a 94 °C y 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos, excepto para IL-4 (anillado a 48°C) y 72 °C 30 segundos, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. En experimentos anteriores se había realizado la determinación del número de ciclos necesarios para obtener la máxima expresión de las citoquinas sin llegar a la saturación, utilizando para ello 25, 30, 35 y 40 ciclos. Observamos que el número de ciclos ideal era de 35 ya que por debajo de esto, si bien se obtenía la banda determinada, la intensidad de la misma era baja, mientras que a 40 ciclos la reacción se encontraba saturada.

Tabla 3. "Primers" utilizados para IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 y G3PDH.

Citoquina		Primers	Tamaño producto (bp)
IL-1	sentido	5'-AGTTTAAATCAGTTCATCAC-3'	271
	antisentido	5'-ATCATTTGATGTATAAGCAG-3'	
IL-2	sentido	5'-AACGGTGCACCTACTTCAAGCTCTAC-3'	407
	antisentido	5-GTCAGTGTTGAGTAGATGCTTTGAC-3'	
IL-4	sentido	5'-TCAACACTTTGAGTATTTTC-3'	329
	antisentido	5'-CAGAAGTGCGACATCAC-3'	
IL-6	sentido	5'-GCTGCTTCTGGTGATGGCTACTGCC-3'	318
	antisentido	5'-TGAAACTCCACAAGACCGTGTGTGA-3'	
IL-10	sentido	5'-TTTACCTGGAAGACGTAATG-3'	331
	antisentido	5'-TAGAGTTTAGTAGAGTCGTC-3'	
IL-12	sentido	5'-CATCAAACCAGACCCTCCCAAG-3'	329
	antisentido	5'-CCACTTTTCCTCCATGGTTTTG-3'	
G3PDH	sentido	5'-CCTTCATTGACCTCCACTACAT-3'	400
	antisentido	5'-CCGAAGTTGTCATGGATGACC-3'	

IL: Interleuquina, G3PDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, bp: Pares de base.

En las células mononucleares de sangre periférica, se estudiaron los perfiles de citoquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12) tras 24 horas de incubación. Este tiempo se basó en estudios anteriores realizados por nuestro grupo en los que se determinaron las cinéticas de expresión de estas citoquinas en las PBMC (E. Mateu, datos sin publicar). La cinética de

expresión de citoquinas para los macrófagos alveolares (IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12) se determinó en los diferentes tiempos de recolección. La evaluación de los productos de PCR se realizó basados en la clasificación semi-cuantitativa descrita por Lago-Deenadayalan *et al.* (1993), de acuerdo a la intensidad de las bandas observadas comparadas con la enzima G3PDH (1: banda escasamente visible, 2: banda medianamente visible, 3: banda altamente visible, 4: máxima visibilidad de banda).

1.1.2. ELISA

A partir de los sobrenadantes de los cultivos de los macrófagos alveolares y PBMC, se determinaron los niveles de producción de TNF- α e INF- γ , utilizando para cada una un ELISA de captura comercial (Pig ELISA TNF- α , Pig ELISA INF- γ ; ENDOGEN). Una vez obtenidos los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos alveolares y PBMC, se añadieron 50 μ l de cada uno de ellos en pocillos de la placa de ELISA tapizados con el anticuerpo monoclonal contra la citoquina a evaluar (TNF- α ó INF- γ). Luego de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente (20-25 °C) y tres lavados posteriores, se procedió a la colocación de un segundo anticuerpo biotinilado (100 μ l/pocillo). Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, se añadió 100 μ l/pocillo del conjugado (estreptavidina-peroxidasa) incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente, para finalmente colocar el substrato y realizarse la lectura de las absorbancias en el lector de ELISA (Labsystems Multiskan RC). Con la lecturas obtenidas se realizó una curva para determinar los niveles (picogramos) de producción de citoquina en base a la dilución de controles ("standard diluent") del ELISA, diluidos en una serie 1:2,5 para TNF- α (1.500 pg/ml, 600 pg/ml, 240 pg/ml, 96 pg/ml, 38,4 pg/ml y 0 pg/ml) ó una serie 1:2 para INF- γ (500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62 pg/ml, 31 pg/ml, 16 pg/ml, 8 pg/ml y 0 pg/ml)

1.2. Fagocitosis

1.2.1. *Neutrófilos polimorfonucleares*

Se utilizaron cuatro cerdos Landrace-York de alta sanidad cedidos por el IRTA. Para obtener los PMN se tomaron muestras de sangre por punción de la vena cava anterior o yugular en tubos con heparina. Todos los procedimientos a los que fueron sometidos los animales fueron aprobados por el CEEAH.

Una vez obtenida la sangre, se separaron los neutrófilos PMN del resto de tipos celulares según procedimientos descritos (Crujisen *et al.*, 1992; Goldner *et al.*, 1983). Inicialmente se procedió a la dilución de las muestras de sangre, 1:1, en medio HBSS (5 ml: 5ml). Inmediatamente se añadieron 0,3 ml de una solución de dextrano, (PM 70.000) al 6% en PBS, por cada mililitro de la sangre diluida y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se formaron dos fases, de las cuales se tomó el sobrenadante que era rico en leucocitos sanguíneos. Seguidamente se realizó una centrifugación a 180 xg durante 10 minutos resuspendiéndose el depósito obtenido en solución salina tamponada (PBS: 0,123 M NaCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 0,0032 M KH₂PO₄; pH 7,2) eliminando los eritrocitos mediante lisis con cloruro de amonio (0,155M). Se procedió a la centrifugación, dos veces, de la suspensión celular durante 5 minutos a 120 xg, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el depósito en 5 ml de RPMI-1640 completo sin antibióticos. La suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^7 células/ml determinándose la viabilidad celular con azul tripan ($\geq 95\%$ en todos los casos). La suspensión celular se dispensó en placas de 48 pocillos (1 ml/pocillo) estimulándose con INMD (5 μ l/ml de LPS y 62,5 μ g/ml de Pg), 5 μ l/ml de LPS de INMD, 62,5 μ g/ml de Pg de INMD y manteniéndose sin estimular. Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda en 5% de CO₂, realizándose su recolección a las 18-20 horas posteriores a la colocación de los estímulos.

1.2.2. *Suspensión bacteriana*

Para la evaluación de la capacidad fagocítica, se utilizó una cepa de *Streptococcus suis* tipo-II procedente de pulmón de cerdo aislada en el Laboratori Veterinari de Diagnòstic de

Malalties Infeccioses de la Universitat Autònoma de Barcelona. La bacteria se recuperó del banco de cepas (-80 °C) y se colocó en caldo BHI (caldo cerebro-corazón) incubándose a 37 °C durante toda la noche. A partir del caldo, se preparó una suspensión bacteriana a una concentración final de 10⁹ UFC/ml la cual se determinó por dilución y contaje en placas de agar.

1.2.3. Marcaje y opsonización de la bacteria.

El marcaje de la bacteria utilizada se realizó basándonos en protocolos descritos anteriormente (Fernández-Botran y Vetvicka, 2000). La suspensión bacteriana se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos para su posterior resuspensión en 1 ml de solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC: 0,1 mg/ml en 0,1 M NaHCO₃), incubándose a temperatura ambiente en agitación (≤ 100 rpm) durante 60 minutos. Transcurrido ese tiempo, la bacteria marcada con FITC se lavó tres veces en PBS a 400 xg durante cinco minutos resuspendiéndose seguidamente en 1 ml de RPMI-1640 completo sin antibiótico. Inmediatamente se procedió a su inactivación a 60 °C por una hora en baño de maría. Para la confirmación de la correcta tinción fluorescente, se realizó la observación de la suspensión bacteriana en el microscopio de fluorescencia. La opsonización del *Streptococcus suis*, se realizó incubándose durante 30 minutos a 37 °C con suero porcino al 10%.

1.2.4. Fagocitosis

El procedimiento utilizado se basó en métodos descritos (Busque *et al.*, 1998; Fernández-Botran y Vetvicka, 2000; Goldner *et al.*, 1983). En primer lugar se procedió a la recolección de los neutrófilos polimorfonucleares para centrifugarlos a 500 xg durante 5 minutos resuspendiéndolos en 200 µl de PBS. Seguidamente se colocó en cada uno de los tubos donde correspondía, 10 µl de la suspensión bacteriana a una relación de 10 bacterias por neutrófilo polimorfonuclear (10:1) incubándose en agitación a 37 °C durante 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la fagocitosis se detuvo adicionando PBS frío (4 °C) a las muestras, colocándolas en hielo. Inmediatamente se realizaron tres lavados a 500 xg durante 5 minutos para eliminar las bacterias no fagocitadas, siendo finalmente resuspendidas las células en PBS-"flow" (PBS, 10% de suero fetal bovino y 0,01% de azida sódica). Para poder discriminar entre

las bacterias que se encontraban en la superficie celular o intracelular, así como determinar la viabilidad celular, se utilizó bromuro de etidio (50 µg/ml). La determinación de la fagocitosis de las bacterias marcadas por parte de los PMN, se realizó utilizando como técnica la citometría de flujo (Coulter Epic XL-MCL).

El índice de fagocitosis se determinó mediante la siguiente fórmula, modificada, de Reinard *et al.* (2000):

$$\text{Índice de fagocitosis} = \text{Porcentaje de células fluorescentes} \times \text{logaritmo de la media del canal de fluorescencia.}$$

Donde:

Porcentaje de células fluorescentes: Porcentaje de macrófagos que presentan fluorescencia.

Logaritmo de la media del canal de fluorescencia: Indicador del número de bacterias/células.

1.3. Análisis MHC-II

Se utilizaron macrófagos alveolares cedidos por el IRTA obtenidos de cerdos Landrace-York de alta sanidad. Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml dispensándose 1 ml/pocillo de la suspensión celular en placas de 48 pocillos. Los cultivos se realizaron por triplicado y fueron estimulados con 5 µg/ml de LPS de INMD, 62,5 µg/ml de Pg de INMD, cepa Juanola del VEA (0,1 MI), 10 ng/ml de Interferón recombinante porcino (rINF- γ -Po; Endogen), INMD (5 µg/ml de LPS y 62,5 µg/ml de Pg), combinaciones de VEA con LPS, Pg e INMD a las mismas concentraciones anteriores y células sin estimular (tabla 4).

Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda en 5% de CO₂ durante 18-20 horas, tras las cuales se procedió a la toma de las células y los sobrenadantes. Tras ello, las células se lavaron y centrifugaron tres veces a 500 xg durante 5 minutos. Seguidamente las células se incubaron en 50 µl (dilución 1:10) del anticuerpo monoclonal de ratón (IgG1) anti-MHC-II porcino (clon K274.3G, Labgen) o en PBS-*flow*", durante 30 minutos a 4 °C. Tras tres lavados con PBS-*flow*", se resuspendieron en 50 µl (dilución 1:10) del anticuerpo policlonal de cabra F(ab')₂ anti-IgG1 de ratón conjugado con FITC (Southern-Biotechnology Associates), o

en PBS-“flow”, y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron nuevamente tres lavados resuspendiéndose el depósito en PBS-“flow” con 0,5% de formol para realizar inmediatamente su análisis por citometría de flujo. La infección de las células con el VEA se comprobó mediante la técnica de inmunofluorescencia directa.

Tabla 4. Grupos y estímulos de los macrófagos alveolares

Grupo	Estímulo
Control	RPMI-1640 completo (sin tinción posterior)
Control MHC-II	RPMI-1640 completo (sin estimular)
LPS	Lipopolisacárido
Pg	<i>Propionibacterium granulosum</i>
INMD	Inmunomodulador (Lipopolisacárido + <i>P. granulosum</i>)
Control VEA	Virus de la enfermedad de Aujeszky
VEA-LPS	Virus de la enfermedad de Aujeszky + Lipopolisacárido
VEA-Pg	Virus de la enfermedad de Aujeszky + <i>P. granulosum</i>
VEA-INMD	Virus de la enfermedad de Aujeszky + Inmunomodulador
Control INF- γ	Interferón-gamma porcino recombinante.

La expresión de MHC-II se determinó mediante la ratio:

$$\text{Índice de expresión MHC-II: } \frac{\text{muestra problema} - \text{control negativo}}{\text{control positivo} - \text{control negativo}} \times 100$$

Donde:

Muestra problema: macrófagos alveolares estimulados (% de células fluorescentes x logaritmo de la media del canal de fluorescencia).

Control negativo: macrófagos alveolares sin estimular (% de células fluorescentes x logaritmo de la media del canal de fluorescencia).

Control positivo: macrófagos alveolares estimulados con INF- γ (% de células fluorescentes x logaritmo de la media del canal de fluorescencia).

1.4. Análisis CD25

Se utilizaron PBMC obtenidas por gradiente de densidad a partir muestras de sangre de cuatro cerdos de alta sanidad, tal como se describió anteriormente. Por razones de manejo se realizó una vacunación de los animales frente VEA ($10^{7.5}$ TCID₅₀, cepa NIA-4, Kivac[®], Fort Dodge). La primera extracción de sangre se realizó una semana antes de la vacunación (90 días de vida) y la segunda a los seis días de la misma (113 días de vida). Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml, dispensándose, por triplicado, 1 ml/pocillo de la suspensión en placas de 48 pocillos. Las células se estimularon con INMD (5 µg/ml de LPS y 62,5 µg/ml de Pg), 5 µg/ml de LPS de INMD, 62,5 µg/ml de Pg de INMD, 10 µg/ml de PHA, cepa Juanola del VEA (0,1 MI), las combinaciones de VEA con LPS, Pg o INMD a las mismas concentraciones descritas anteriormente y sin estimular (tabla 5).

Tabla 5. Grupos y estímulos de los PBMC.

Grupo	Estímulo
Control	RPMI-1640 completo (sin tinción posterior)
Control CD25	RPMI-1640 completo (sin estimular)
LPS	Lipopolisacárido
Pg	<i>Propionibacterium granulosum</i>
INMD	Inmunomodulador (Lipopolisacárido + <i>P. granulosum</i>)
PHA	Fitohemaglutinina
Control VEA	Virus de la enfermedad de Aujeszky
VEA-LPS	Virus de la enfermedad de Aujeszky + Lipopolisacárido
VEA-Pg	Virus de la enfermedad de Aujeszky + <i>P. granulosum</i>
VEA-INMD	Virus de la enfermedad de Aujeszky + Inmunomodulador

Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas. Tras este tiempo, se procedió a la recolección de los sobrenadantes y las células. Tras la obtención de las células por centrifugación (500 xg. durante 5 minutos), se incubaron a 4 °C durante 30 minutos con 50 µl (dilución 1:10) del anticuerpo monoclonal de ratón (IgG1) anti-CD25 porcino (clon 231.3B2, Serotec) o PBS-“flow”. Tras la incubación, se lavaron 3 veces con PBS-“flow”, y se incubaron con 50 µl (dilución 1:10) de un anticuerpo de cabra F(ab')₂ anti-

IgG1 de ratón conjugado con ficoeritrina, o PBS-“*flow*”, durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados y las muestras se fijaron con PBS-“*flow*” y 0,5% de formaldehído. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el citómetro de flujo. La infección de las células con VEA se comprobó mediante la técnica de inmunofluorescencia directa.

La expresión de CD25 para cada estímulo se analizó como el porcentaje de células que expresaron esta molécula por encima del valor basal, el cual se determinó en el grupo control CD25. Así mismo, se utilizó el índice de expresión, calculado mediante la ratio para la comparación entre INMD y sus componentes:

$$\text{Índice de expresión CD25: } \frac{\text{muestra problema} - \text{control negativo}}{\text{control positivo} - \text{control negativo}} \times 100$$

Donde:

Muestra problema: PBMC estimulados (% de células fluorescentes x logaritmo de la media del canal de fluorescencia).

Control negativo: PBMC sin estimular (% de células fluorescentes x logaritmo de la media del canal de fluorescencia)

Control positivo: PMBC estimulados con PHA (% de células fluorescentes x logaritmo de la media del canal de fluorescencia).

Previamente, se determinó el tiempo (horas) donde se producía la máxima expresión de CD25 en los PBMC. Las células se estimularon con PHA (10 µg/ ml) y se analizaron por citometría de flujo utilizándose los anticuerpos, diluciones, incubaciones y lavados descritos anteriormente. La recolección de las células y sobrenadantes se realizó a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas posteriores a la estimulación con PHA, determinándose que la expresión de CD25 era máxima en las células que habían sido estimuladas como mínimo durante 24 horas. Así mismo, se realizaron ensayos a fin de verificar la especificidad de cada uno de los anticuerpos utilizados para determinar la expresión de CD25 y MHC-II, utilizando anticuerpos irrelevantes.

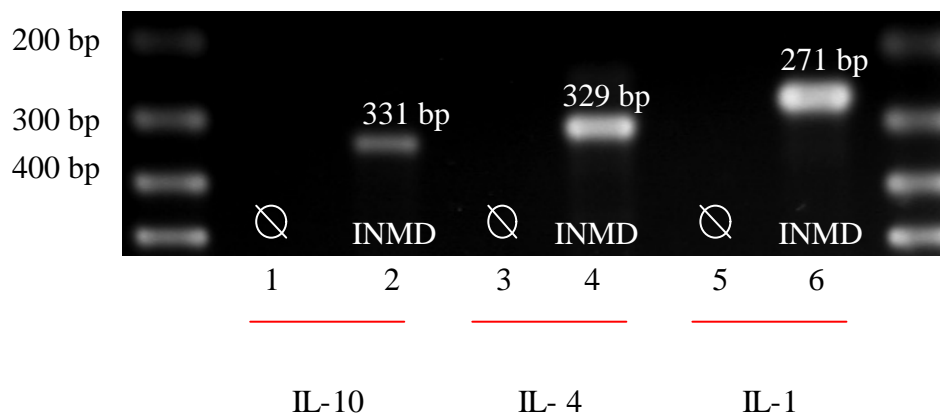
2. RESULTADOS

2.1. Expresión y producción de citoquinas

2.1.1. *Células mononucleares de sangre periférica*

Las PBMC estimuladas con INMD, LPS, PHA y VEA expresaron IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 a las 24 horas tras la estimulación (figura 11). Los niveles de INF- γ detectados fueron superiores en las células estimuladas con INMD ($58,14 \pm 35,39$ pg/ml) que en las células estimuladas con LPS ($5,78 \pm 2,54$ pg/ml). Las células estimuladas con PHA (> 400 pg/ml) y VEA (> 500 pg/ml) fueron las que produjeron la mayor producción de INF- γ (figura 12).

Figura 11. IL-10, IL-4 e IL-1 expresadas por PBMC estimuladas con INMD y sin estimular.



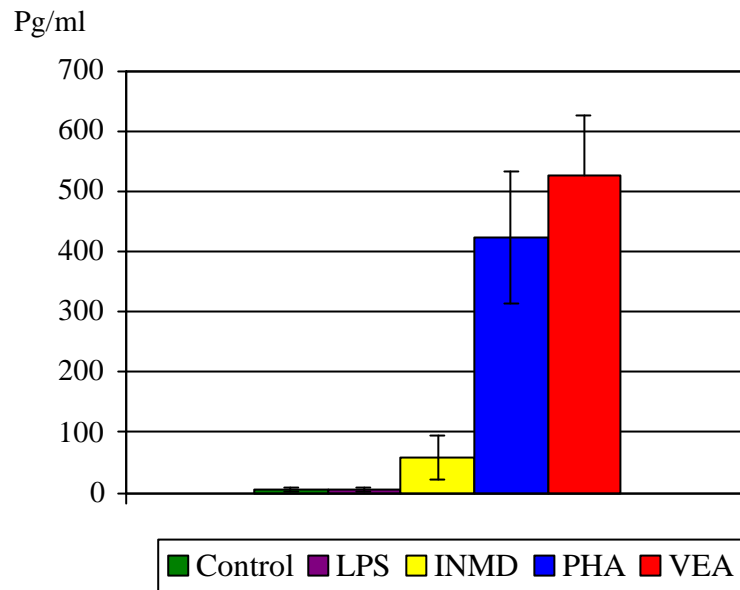
IL: Interleuquina.

INMD: Inmunomodulador.

bp: Pares de bases.

⊗ : Control.

Figura 12. Niveles de producción de INF- γ en sobrenadantes de cultivos de PBMC determinados por ELISA cuantitativo.



LPS: lipopolisacárido.

INMD: inmunomodulador.

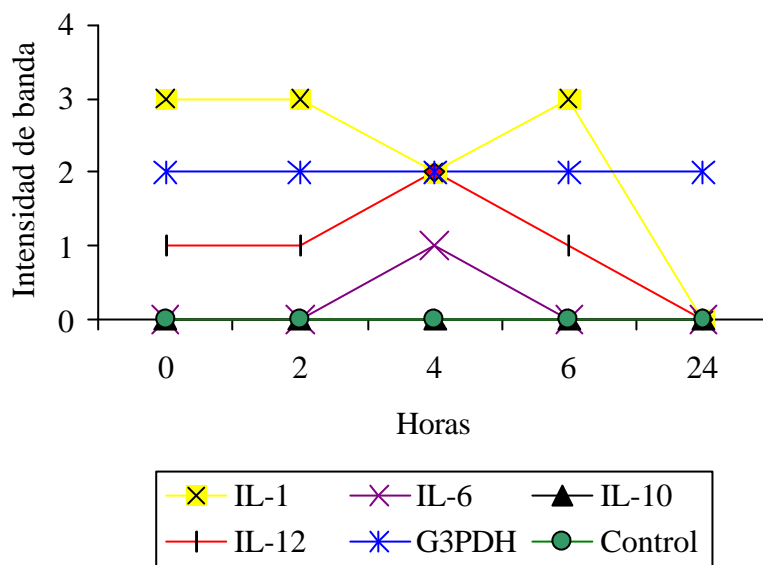
PHA: fitohemaglutinina.

VEA: virus de la enfermedad de Aujeszky.

2.1.2. *Macrófagos alveolares*

El patrón de expresión y producción de citoquinas fue similar en los macrófagos alveolares estimulados con INMD y con LPS, aunque los niveles de expresión fueron menores en las células estimuladas con INMD (figuras 13 y 14). En ambos casos se indujo la expresión de IL-1, IL-6 e IL-12, no observándose la expresión de IL-10 dentro de las 24 horas post-estimulación (figura 15). Con INMD, la expresión de IL-1, se observó desde el momento de la colocación del estímulo, posiblemente inducido por el manejo de las células. Esto también se observó en el grupo control (datos no presentados). La IL-6 fue detectada únicamente a las 4 horas y la IL-12 tuvo una cinética de expresión similar a la de la IL-1. En cuanto a TNF- α , los patrones de producción fueron similares para LPS e INMD, si bien, al igual que en las otras citoquinas, se observó que fueron inferiores con INMD. La máxima producción observada de esta citoquina fue a las 6 horas, siendo prácticamente indetectable a las 24 horas. El grupo control presentó bajos niveles de producción las primeras 2 horas (figura 16).

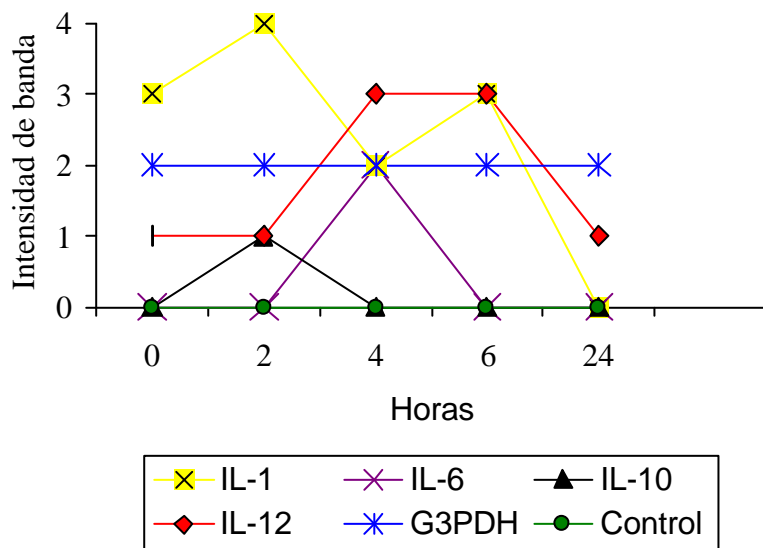
Figura 13. Cinética de expresión de IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 en macrófagos alveolares estimulados con INMD comparadas con la enzima G3PDH.



IL: Interleuquina.

G3PDH: Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa.

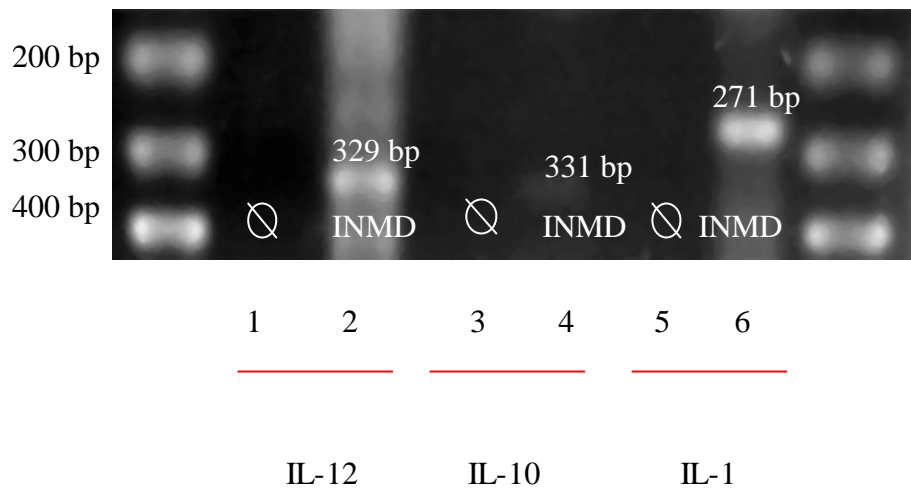
Figura 14. Cinética de expresión de IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 en macrófagos alveolares estimulados con LPS de *E. coli* comparadas con la enzima G3PDH.



IL: Interleuquina.

G3PDH: Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa.

Figura 15. IL-12 e IL-4 expresadas por macrófagos alveolares estimulados con INMD y sin estimular.



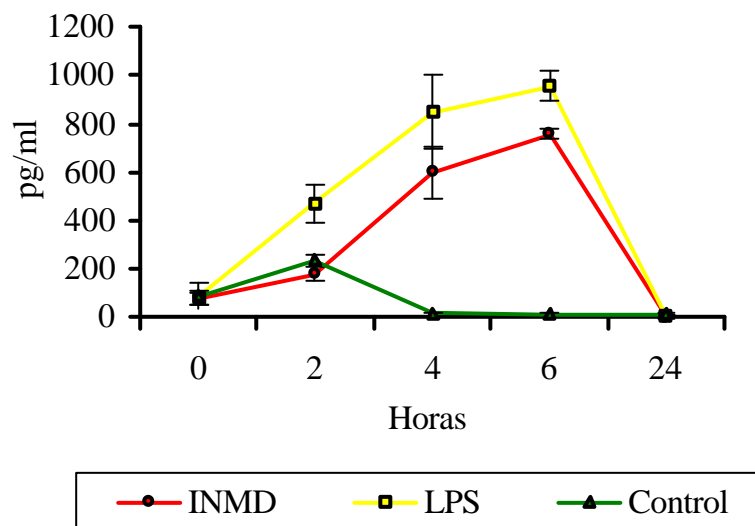
IL: Interleuquina.

INMD: Inmunomodulador.

bp: Pares de bases.

Ø : Control.

Figura 16. Cinética de producción de TNF- α en sobrenadantes de cultivos celulares de macrófagos alveolares determinado por ELISA cuantitativo.



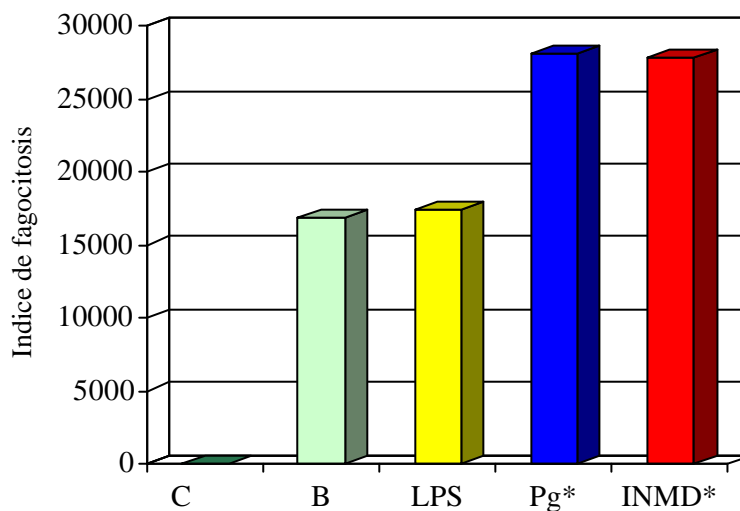
INMD: inmunomodulador.

LPS: lipopolisacárido.

2.2. Fagocitosis

Se observó un índice de fagocitosis significativamente superior en las células estimuladas con Pg e INMD ($p < 0,05$), con relación a los PMN estimulados con LPS o sin estimular, entre las cuales no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) (figura 17). Comparado con los PMN sin estimular que fagocitaron, se observó que el incremento se debía al mayor número de neutrófilos que fagocitaron (figuras 18 y 19). Así mismo, se observó una alta correlación entre el incremento del índice de fagocitosis por parte de las células estimuladas con INMD y los PMN estimulados con Pg ($r = 0,97$), lo que indica que este efecto es debido, básicamente, a esta bacteria (figura 20).

Figura 17. Índice de fagocitosis de los PMN



C: Células polimorfonucleares sin *S. suis*.

B: Células polimorfonucleares con *S. suis*.

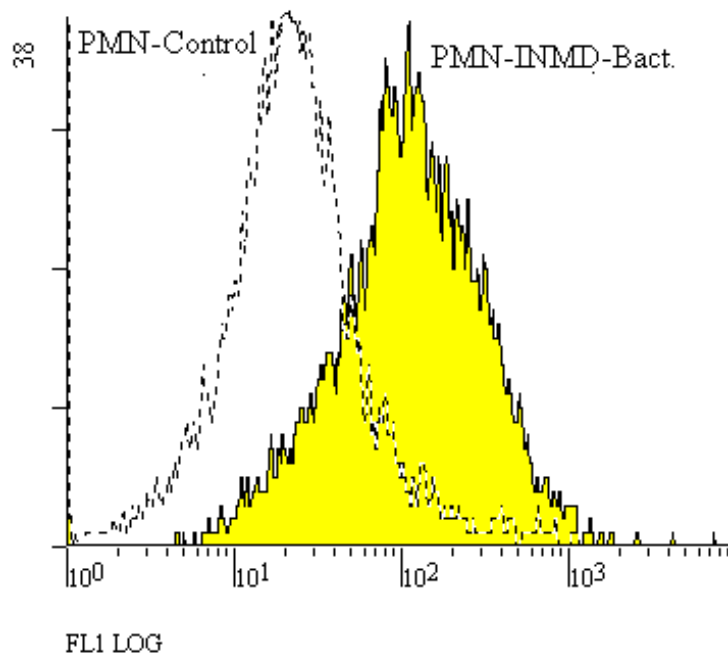
LPS: Células polimorfonucleares con *S. suis* y lipopolisacárido de INMD.

Pg: Células polimorfonucleares con *S. suis* y *Propionibacterium granulosum* de INMD.

INMD: Células polimorfonucleares con *S. suis* e INMD.

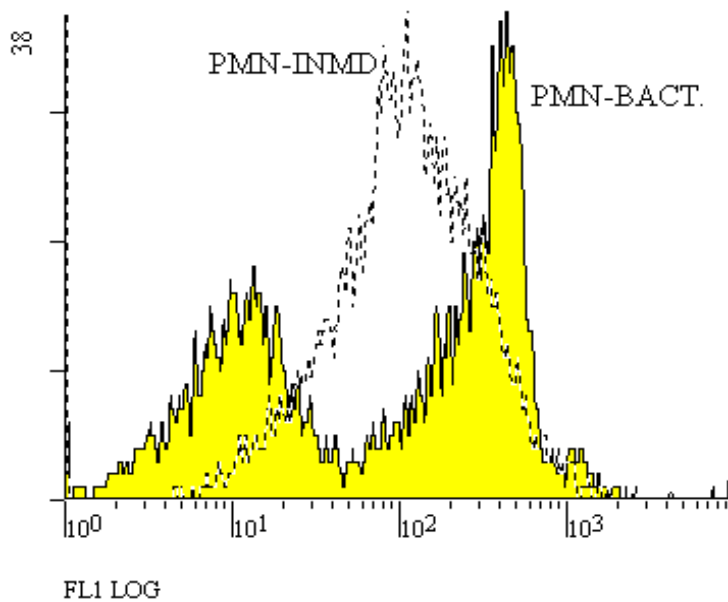
* $p < 0,05$.

Figura 18. Comparación de la fagocitosis entre los PMN estimulados con INMD y control.



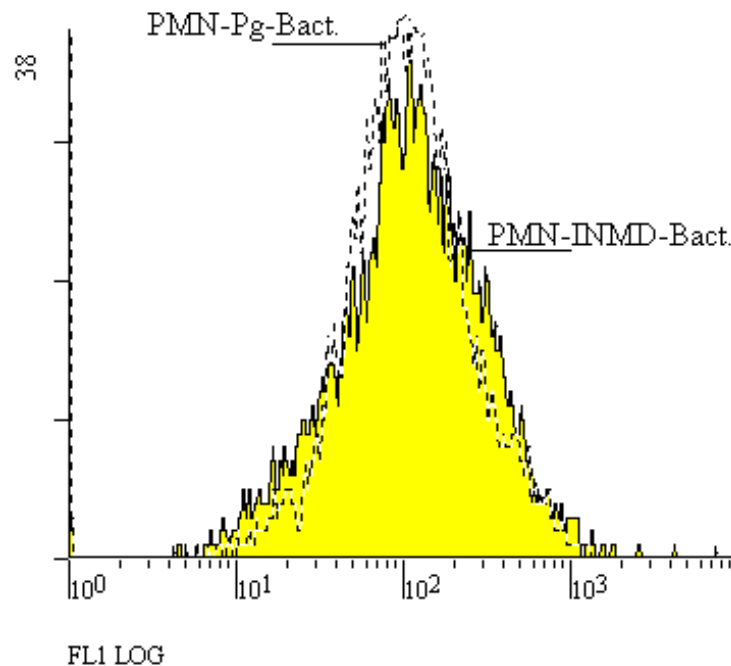
PMN-control: neutrófilos polimorfonucleares sin estímulo y sin bacterias; PMN-INMD-Bact: neutrófilos polimorfonucleares con el inmunomodulador y bacterias.

Figura 19. Comparación de fagocitosis de PMN sin estimular y estimulados con INMD.



PMN-INMD: neutrófilos polimorfonucleares con el inmunomodulador y bacterias. PMN-Bact: neutrófilos polimorfonucleares con bacteria.

Figura 20. Comparación entre los PMN estimulados con INMD y estimulados con Pg.

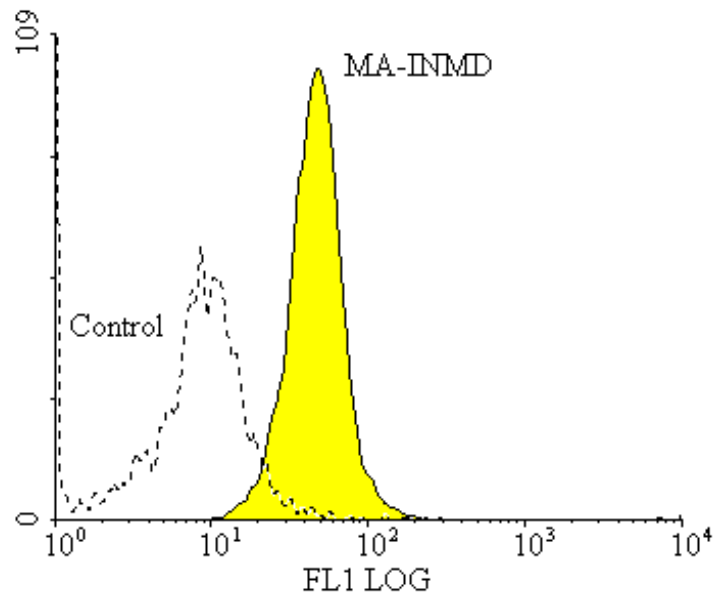


PMN-Pg-Bact: neutrófilos polimorfonucleares estimulados con *Propionibacterium granulosum* y bacterias; PMN-INMD-Bact: neutrófilos polimorfonucleares con el inmunomodulador y bacterias.

2.3. Análisis MHC-II

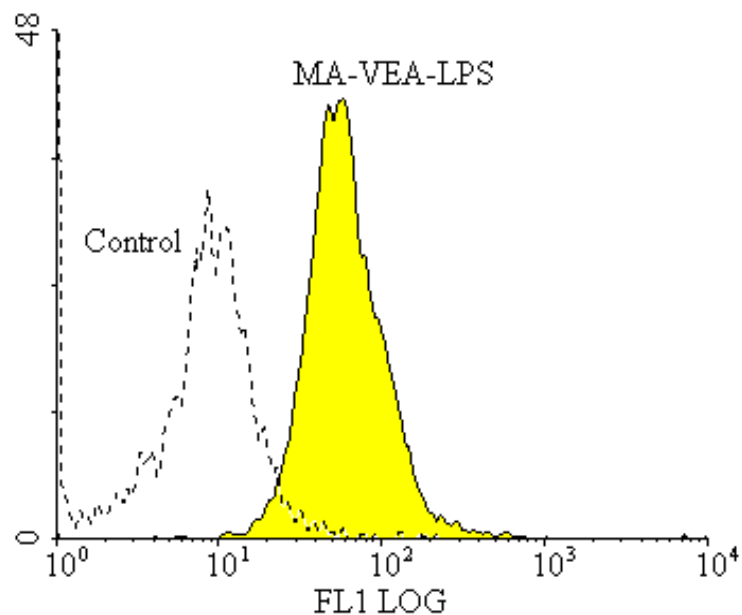
En los macrófagos alveolares, el máximo índice de expresión de MHC-II se observó en las células estimuladas con $\text{INF-}\gamma$. Entre las células estimuladas con INMD y sus componentes, se indujo la mayor expresión de MHC-II cuando se utilizó INMD ($52,02\% \pm 1,12$), significativamente superior que cualquiera de sus componentes por separado ($39,97\% \pm 1,36$ para LPS, $44,27\% \pm 1,44$ para Pg) ($p < 0,05$). Sin embargo, cuando se utilizaron macrófagos infectados con VEA el mayor índice de expresión de MHC-II se observó entre las células que fueron estimuladas con el lipopolisacárido ($88,89\% \pm 1,03$) y VEA ($76,98 \pm 1,06$) ($p < 0,01$) (figuras 21, 22 y 23).

Figura 21. Comparación de la expresión de MHC-II macrófagos alveolares estimulados con INMD y sin estimular.



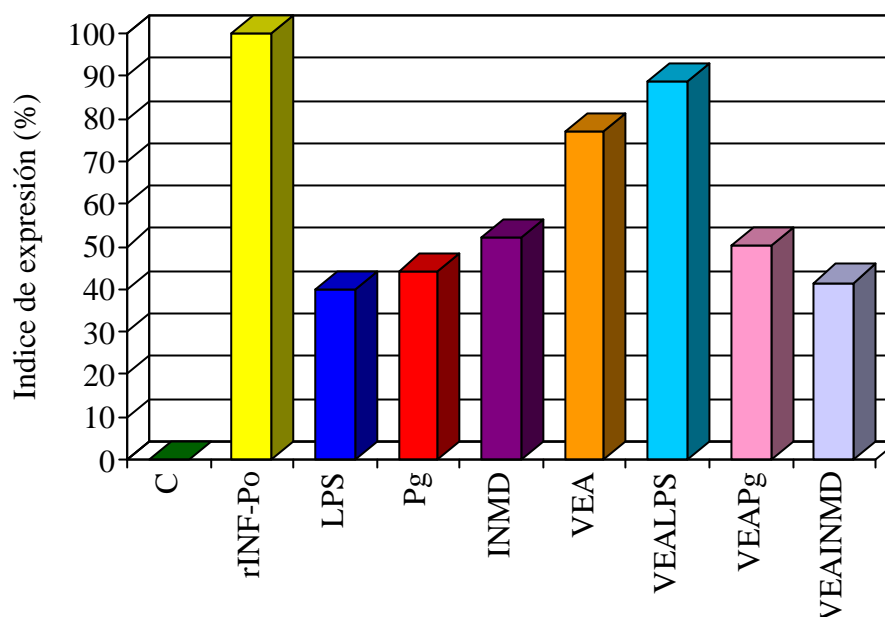
Control: macrófagos alveolares sin estimular; MA-INMD: macrófagos alveolares estimulados con INMD.

Figura 22. Comparación de la expresión de MHC-II en macrófagos alveolares estimulados con LPS e infectados con VEA y sin estimular.



Control: macrófagos alveolares sin estimular; MA-VEA-LPS: macrófagos alveolares infectados con el virus de la enfermedad de Aujeszky y estimulados con LPS.

Figura 23. Índice de expresión de MHC-II en macrófagos alveolares.



C: control; rINF-Po: gamma-interferón; LPS: lipopolisacárido de INMD; Pg: *Propionibacterium granulosum* de INMD; INMD: Inmunomodulador; VEA: virus de la enfermedad de Aujeszky; VEALPS: virus de la enfermedad de Aujeszky y lipopolisacárido de INMD; VEAPg: virus de la enfermedad de Aujeszky y *Propionibacterium granulosum* de INMD; VEAINMD: virus de la enfermedad de Aujeszky e INMD.

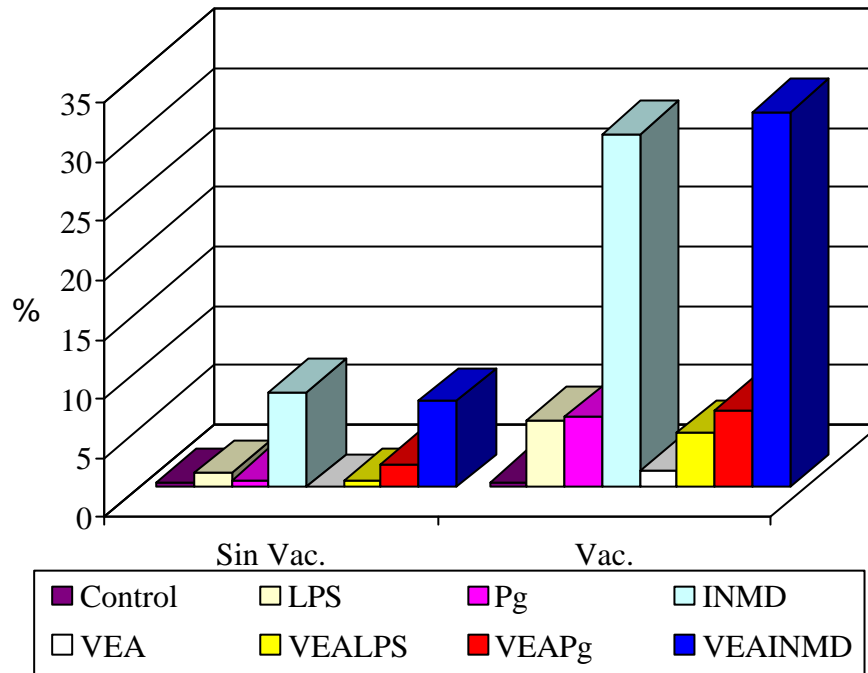
2.4. Análisis CD25

En los experimentos realizados, todos los estímulos indujeron la expresión de CD25, observándose la máxima expresión entre las células estimuladas con PHA ($60,8\% \pm 4,35$ en PBMC de animales no vacunados y $64,54\% \pm 3,28$ en animales vacunados) (figura 25). Al analizar el efecto de INMD y sus componentes, el máximo porcentaje de expresión se obtuvo con INMD (figura 24), tanto en las PBMC procedentes de animales sin vacunar ($7,98\% \pm 3,1$) ($p < 0,05$) como de los vacunados, aunque en estos últimos fue superior ($29,8\% \pm 5,4$) ($p < 0,01$) (figura 26). El mismo resultado se obtuvo con INMD entre las células estimuladas e infectadas con VEA ($7,26\% \pm 3,06$ en animales no vacunados y $31,628\% \pm 4,53$ en animales vacunados) (figura 27).

Comparando los índices de expresión, INMD, fue superior que sus componentes por separado en todos los casos ($p < 0,05$). Llama la atención que no se observó un incremento

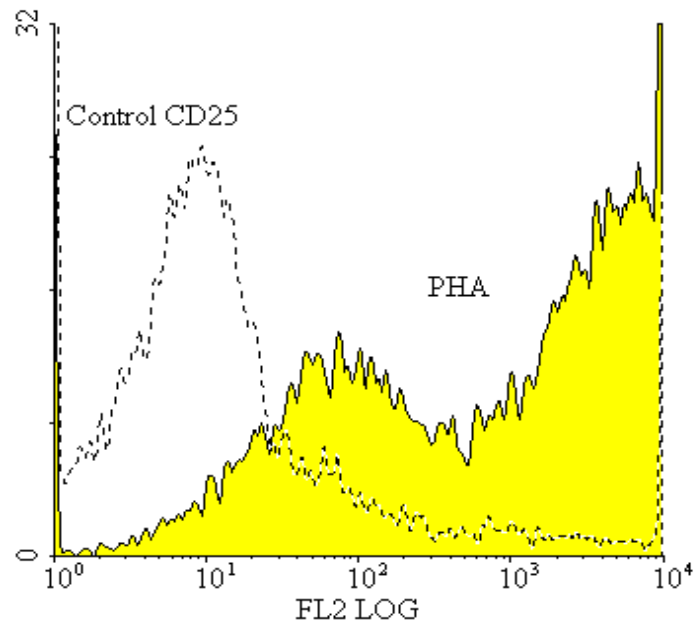
marcado entre las células infectadas con VEA así como en la combinación del virus con INMD (figura 28) y sus componentes.

Figura 24. Porcentaje de expresión de CD25 en las PBMC de los animales antes y después de la vacunación contra VEA.



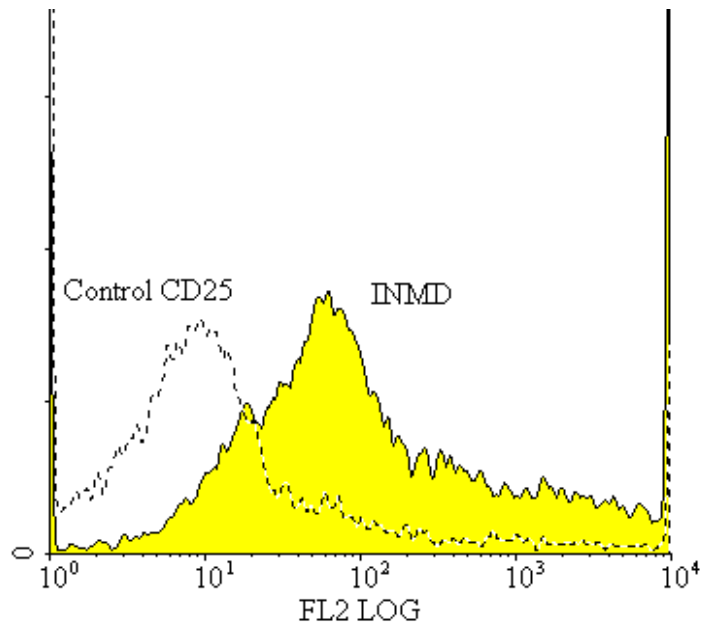
Sin Vac: animales sin vacunar contra VEA; Vac: Animales vacunados contra VEA; Control: sin estimular; LPS: Lipopolisacárido de INMD; Pg: *Propionibacterium granulosum* de INMD; INMD: Inmunomodulador; VEA: virus de la enfermedad de Aujeszky; VEALPS: virus de la enfermedad de Aujeszky y lipopolisacárido del INMD; VEAPg: virus de la enfermedad de Aujeszky y *Propionibacterium granulosum* de INMD; VEAINMD: virus de la enfermedad de Aujeszky e INMD.

Figura 25. Comparación de la expresión de CD25 entre PBMC estimuladas con PHA y sin estimular.



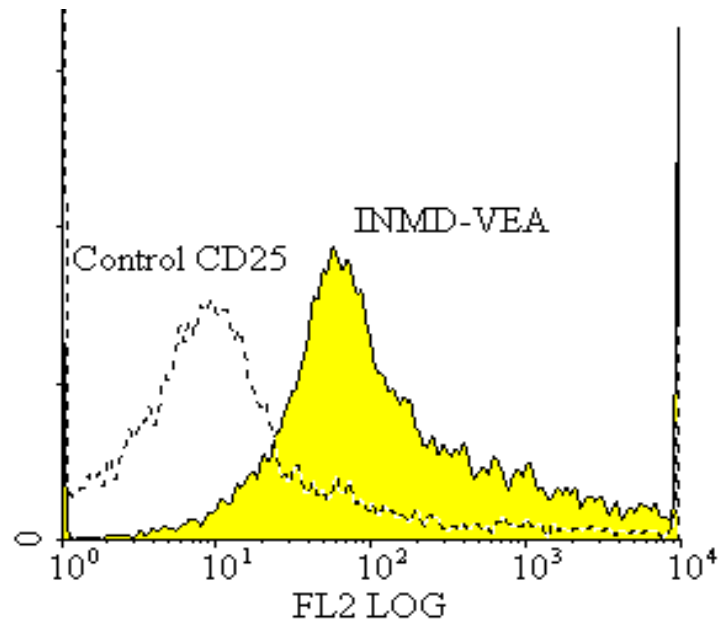
Control CD25: Células sin estimular marcadas con CD25; PHA: Células estimuladas con fitohemaglutinina.

Figura 26. Comparación de la expresión de CD25 entre PBMC estimuladas con INMD y sin estimular.



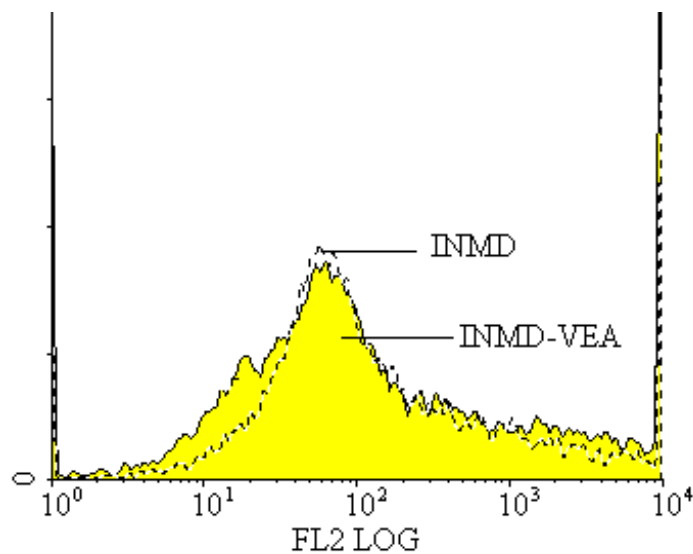
Control CD25: Células sin estimular marcadas con CD25; INMD: Células estimuladas con el Inmunomodulador.

Figura 27. Comparación de la expresión de CD25 entre PBMC infectados con VEA estimuladas con INMD y sin estimular.



Control CD25: Células sin estimular marcadas con CD25; INMD-VEA: Células estimuladas con el inmunomodulador e infectadas con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

Figura 28 Comparación de la expresión de CD25 entre PBMC infectadas con VEA estimuladas con INMD y estimuladas con INMD.



INMD: Células estimuladas con el inmunomodulador.; INMD-VEA: Células estimuladas con el inmunomodulador e infectadas con el virus de la enfermedad de Aujeszky.