

V. ESTUDIOS IN VIVO

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Estudio A

a) Animales, grupos y tratamientos

Para evaluar la eficacia de INMD sobre la respuesta humoral y linfoproliferativa al ser utilizado como coadyuvante de la vacuna contra VEA, se utilizaron 85 cerdos convencionales de 8-10 semanas de edad seleccionados en una granja convencional de ciclo cerrado de 300 madres. Históricamente, la mayoría de los animales de esta granja eran seropositivos a VEA (gE), PRRS y *Mycoplasma hyopneumoniae* al final del engorde. Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos (A y B) y se crotalaron para su identificación individual. Ambos grupos estuvieron situados en la misma sección de una nave, se les ofrecía agua y alimentos *ad libitum* y se sometieron por igual a la rutina de manejo de la explotación. Los procedimientos utilizados en los animales fueron aprobados por el CEEAH.

Los cerdos del grupo A (N = 43) y del grupo B (N = 42) recibieron una dosis intramuscular, en la tabla del cuello, de $10^{5.5}$ TCID₅₀ de vacuna viva atenuada, gE negativa, contra la enfermedad de Aujeszky (Kultibiol®Aujeszky, Laboratorios Calier). Los animales del grupo B recibieron simultáneamente en la tabla del cuello, pero en otro sitio diferente, una dosis de INMD correspondiente a 20 µg/ml de LPS y 250 µg/ml de *P. granulosum* (1,2 µg/kg de peso vivo de LPS y 16 µg/kg de peso vivo de Pg). A los animales del grupo A se les administró 2 ml de solución salina estéril (SSE) como placebo. Todos los cerdos se revacunaron cuatro semanas más tarde, pero en esta ocasión no se administró dosis alguna de INMD (tabla 6).

Tabla 6. Tratamiento de los grupos A y B.

Grupo	Nro. cerdos	Primera dosis	Segunda dosis
A	43	vacuna viva VEA (IM) + INMD (IM)	vacuna viva VEA (IM)
B	42	vacuna viva VEA (IM)	vacuna viva VEA (IM)

VEA: virus de la enfermedad de Aujeszky, INMD: inmunomodulador, IM: intramuscular.

Previamente a este ensayo, se determinó el título de la vacuna contra la enfermedad de Aujeszky utilizada ($10^{5.5}$ TCDI₅₀), mediante una técnica de seroneutralización como la que se describirá posteriormente (Toma y Shibley, 1992).

b) Análisis inmunológicos

b.1) ELISA para glicoproteína E (gE) y glicoproteína B (gB) del virus de la enfermedad de Aujeszky.

Se realizaron tres tomas de muestras de sangre a los animales: inmediatamente antes de la primera vacunación, antes de la revacunación y cinco semanas posteriormente a ella. Los sueros se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos frente a gE y gB del virus de la enfermedad de Aujeszky, utilizando para ello un ELISA comercial, de bloqueo, según procedimiento descrito por el fabricante (Svanova Biotech).

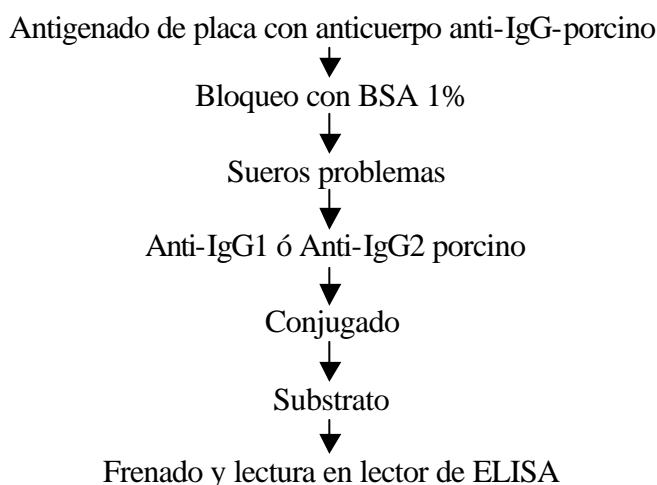
b.2) ELISA para inmunoglobulinas.

Para la semicuantificación de los isotipos IgG1 e IgG2 totales así como IgG1, IgG2 e IgA específicas frente VEA, se desarrollaron diferentes ELISAs. Previamente se analizaron diferentes anticuerpos comerciales para ser utilizados como anticuerpos de captura, de detección o como conjugado, a diversas diluciones y combinaciones. Para ello se utilizó IgG porcina (Sigma, Ref. I-4381) a diluciones seriadas (1:2) con una concentración inicial de 10 µg/ml hasta 0,019 µg/ml, determinándose al mismo tiempo la sensibilidad de la técnica.

Para la realización del ELISA de captura de las inmunoglobulinas totales (IgG1 e IgG2) se realizó el tapizado de placas de 96 pocillos (Costar) con un anticuerpo policlonal de cabra (IgG1) anti-IgG de porcino (Southern Biotechnology) a una concentración de 1 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6) incubándose toda la noche a 4°C. Todas las incubaciones siguientes se realizaron a 37 °C durante una hora y los lavados, por triplicado, así como las diluciones, se realizaron con PBS-T (PBS y 0,05% tween-20, pH 7,4). Así mismo todos los reactivos y sueros se utilizaron en volúmenes de 50 µl/pocillo.

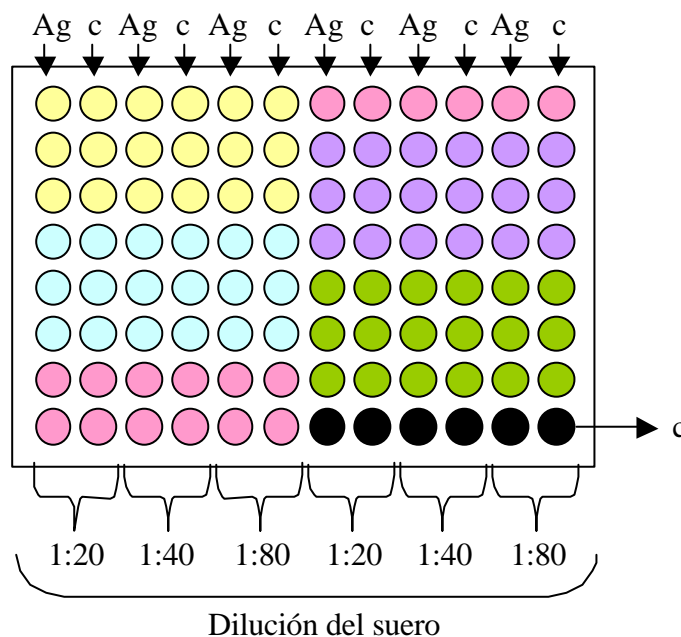
Tras el tapizado de la placa, se realizó el bloqueo con albúmina sérica bovina al 1% y, tras la incubación, se dispensaron, por triplicado, los sueros de cada uno de los animales diluidos 1:100 para IgG2 y 1:1600 para IgG1. Tras la incubación, se añadió el anticuerpo monoclonal de ratón (IgG1) anti-IgG1 porcino (clon K139-3C8) o el anticuerpo monoclonal de ratón (IgG1) anti-IgG2 porcino (clon K68Ig2) (ambos de Serotec) según el caso, a las diluciones 1:200 y 1:500 respectivamente. Una vez incubados los sueros, se añadió el conjugado, un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgG1 (cadena pesada) de ratón conjugado con peroxidasa, (clon LO-MG1-) (Labgen) a la dilución 1:10000. Seguidamente se dispuso el substrato, utilizándose para ello ABTS (ácido benzotiazolina-azino-sulfónico) (Calbiochem), deteniéndose la reacción a los 30 minutos con HCl 0,5 M. La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 405 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan C) (esquema 1).

Esquema 1. ELISA inmunoglobulinas totales (IgG1, IgG2)



Los ELISAs indirectos realizados para IgG1, IgG2 e IgA específicos frente al VEA, se llevaron a cabo mediante el antigenado de 48 pocillos de placas de ELISA (Costar) con el virus de la enfermedad de Aujeszky, utilizándose para ello la cepa vacunal Bartha K-61, gE⁻, empleada en los animales (Kultibiol[®] Aujeszky, Laboratorios Calier), a una dilución de $1,87 \times 10^5$ TCID₅₀ para los ELISAs de IgG1 e IgG2 y de $7,5 \times 10^4$ TCID₅₀ para IgA, preparados en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6), incubándose toda la noche a 4°C (figura 29). Todas las incubaciones posteriores se realizaron a 37 °C durante una hora y los lavados, por tres veces, se realizaron con PBS-T. Así mismo, todos los reactivos y sueros se utilizaron a razón de 50 µl/pocillo. En cada placa, el resto de los pocillos sin antigenar se utilizaron como controles para cada uno de los sueros y, así mismo, se incluyeron pocillos para controles positivos y negativo con sueros gB⁺gE⁻ y gB⁻gE⁻ respectivamente.

Figura 29. ELISA para Inmunoglobulinas específicas frente VEA.

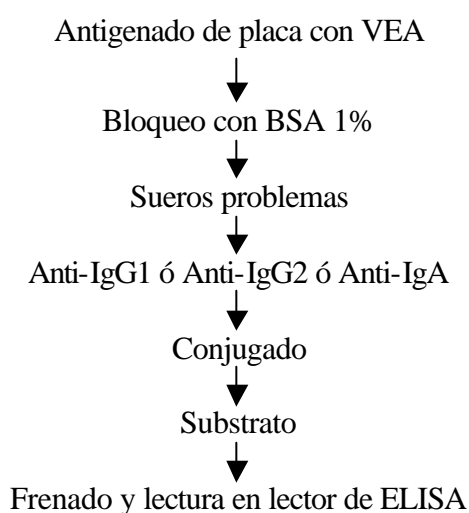


Ag: Pocillos antigenados con virus de la enfermedad de Aujeszky; c: control. Cada color representa el suero de un animal, excepto el color negro: controles para sueros gB⁺gE⁻ y gB⁻gE⁻.

Tras el bloqueo con albúmina sérica bovina al 1%, se añadieron los sueros de cada uno de los animales, por triplicado, a diluciones 1:20, 1:40 y 1:80. Posteriormente se añadió según la Ig a determinar, el anticuerpo monoclonal de ratón (IgG1) anti-IgG1 de porcino (1:200) (clon K139-3C8), el anticuerpo monoclonal de ratón (IgG1) anti-IgG2 de porcino

(1:500) (clon K68Ig2) o el anticuerpo monoclonales de ratón (IgG1) anti-IgA de porcino (1:8.000) (clon K61 1B4) (todos ellos de Serotec). Tras la incubación y lavados, se dispensó el conjugado, consistente en un anticuerpo monoclonal de rata (IgG1) anti-IgG1 de ratón marcado con peroxidasa (clon LO-MG1-) a las diluciones 1:8.000 para IgG2 e IgA y 1:10.000 para IgG1. Seguidamente se añadió el sustrato (ABTS), deteniéndose la reacción a los 30 minutos con HCl 0,5 M. La lectura de las absorbancias se realizó a una longitud de onda de 405 nm en el lector de ELISA (esquema 2). Las absorbancias obtenidas (densidad óptica) en ambos ELISAs (anticuerpos totales y específicos) se expresaron como una ratio entre la densidad óptica corregida para cada muestra y la del control positivo.

Esquema 2. ELISA para inmunoglobulinas específicas anti-VEA (IgG1, IgG2, IgA)



Para la determinación de IgM, se realizaron ELISAs indirecto y de captura. Sin embargo en ninguno de ellos pudimos discernir con seguridad la diferencia entre los sueros IgM+ e IgM- debidos a los altos niveles de ruido de fondo, por lo que estos datos no fueron incluidos en el análisis.

c) Linfoproliferación

El estudio de la capacidad de linfoproliferación específica frente al VEA se realizó utilizando un ELISA comercial (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Boehringer Mannheim) que permite medir cuantitativamente la proliferación celular mediante la técnica

colorimétrica basándose en la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) en el DNA durante su síntesis en las células en proliferación.

Una vez obtenidos las PBMC de los animales del ensayo, como se ha descrito anteriormente, se ajustaron a una concentración de 3×10^5 células/pocillo, incubándose durante 48 horas con PHA ($10 \mu\text{g/ml}$), VEA (3×10^4 y 3×10^5 TCID₅₀) y sin estimular. Finalizado este tiempo, se añadieron $10 \mu\text{l}$ /pocillo de BrdU tras lo cual los cultivos se incubaron durante 24 horas más. Pasado este tiempo, se realizó la remoción de las células procediéndose al secado del fondo de los pocillos mediante aire caliente. Posteriormente se realizó la fijación y desnaturalización del DNA durante 30 minutos a temperatura ambiente para añadir el anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa, incubándose durante 90 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS para a continuación colocar el substrato (TMB) y realizar la lectura de las absorbancias en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

d) Títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VEA

La determinación de los títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VEA se llevó a cabo mediante la realización de la técnica de seroneutralización en placas de 96 pocillos (Toma y Shibley, 1992), utilizando para ello la línea celular PK-15 (células de riñón porcino), realizándose el análisis de sueros por duplicado.

En primer lugar se colocaron los sueros a analizar en placas de 96 pocillos ($100 \mu\text{l}$ /pocillo) realizando una dilución doble de cada uno de ellos ($1/4$ hasta $1/256$). Paralelamente, se colocaron controles positivos, negativos, de citotoxicidad de los sueros y el suero estándar de la OIE. Seguidamente se dispensaron $50 \mu\text{l}$ /pocillo del virus de la enfermedad de Aujeszky (Cepa Juanola) a una concentración de 2×10^3 TCID₅₀/ $50 \mu\text{l}$, incubándose durante 1 hora a 37°C y 5% de CO_2 . Al cabo de este tiempo se añadieron las células PK-15 ($150 \mu\text{l}$ /pocillo) a una concentración de 150.000 células/ml, incubándose durante 7 días a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

La observación de los cultivos se realizó todos los días para detectar el efecto citopático sobre las células por parte del VEA. El título de cada suero se determinó como la máxima dilución a la cual se encontró el tapiz celular intacto. Este título es expresado como título medio geométrico (TMG) (antilog_2 de la media aritmética del título) (Thrusfield, 1995).

1.2. Estudio B

Para determinar los efectos adversos que se pudieran derivar de la aplicación de INMD a una dosis superior de la recomendada por el fabricante, se utilizaron 8 cerdos de alta sanidad aportados por el IRTA. Estos animales se distribuyeron en tres grupos siendo alojados en una misma nave de la granja de la Facultat de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona. Todos los animales se sometieron por igual al manejo rutinario realizándose todos los días la observación de los cerdos. Los procedimientos a los que se sometieron los animales fueron aprobados por el CEEAH.

A los animales del grupo A se les administró intramuscularmente en la tabla del cuello 5 ml de INMD (1 ml/kg P.V.) (1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de LPS y 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de Pg) de acuerdo a la recomendación del fabricante. Los cerdos del grupo B recibieron 10 ml de INMD (2 ml/kg P.V.) (2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de LPS y 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de Pg), mientras que a los cerdos del grupo C se les administró 5 ml y 10 ml de SSE respectivamente como placebo (tabla 7).

Todos los animales fueron examinados a las 0, 1, 2, 4, 6 y 24 horas posteriores a la administración de INMD. En cada una de estas observaciones se obtuvieron muestras de sangre para determinar los niveles de TNF- α y, así mismo, se realizó la medición de la temperatura corporal.

Tabla 7. Tratamiento de los cerdos

<i>Grupo</i>	Dosis¹	
	LPS	Pg
	(<i>ng/kg PV</i>)	(<i>ng/kg PV</i>)
A	1,2	16
B	2,6	33
C	0	0

¹Grupo A: 5 ml de INMD intramuscular.

¹Grupo B: 10 ml de INMD intramuscular.

¹Grupo C: 5 ml y 10 ml de solución salina estéril intramuscular.

LPS: lipopolisacárido.

Pg: *Propionibacterium granulosum*.

PV: Peso vivo.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron los análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos (*in vitro* e *in vivo*) mediante estadística descriptiva (análisis de la varianza, análisis de regresión, Chi cuadrado y test Kruskal-Wallis), utilizando para ello el paquete estadístico Epi-Info versión 6.04 (Dean *et al.*, 1996).

3. RESULTADOS

3.1. Estudio A

3.1.1. Análisis inmunológicos

a) *ELISA para glicoproteína E (gE) y glicoproteína B (gB) del virus de la enfermedad de Aujeszky*

En la tabla 8, se puede observar el porcentaje de animales positivos a gB y gE tras realizarse cada una de las distintas tomas de sangre. Se observa un alto porcentaje de animales con anticuerpos frente a gB⁺ y gE⁺, de origen maternal, al inicio del estudio. Tras la segunda

vacunación, la mayoría de los animales de ambos grupos presentaron anticuerpos frente gB^+ desapareciendo los anticuerpos gE^+ .

Tabla 8. Porcentajes de animales que presentaban anticuerpos anti- gB ó anti- gE .

<i>Grupos</i>	Primer sangrado (8-10 sem. de edad)		Segundo sangrado (12-14 sem. de edad)		Tercer sangrado (17-19 sem. de edad)	
	$\% gB^+$	$\% gE^+$	$\% gB^+$	$\% gE^+$	$\% gB^+$	$\% gE^+$
A	97,6	11,6	97,56	0	96,4	0
B	100	19	84,61	2,56	87,1	0

b) *ELISA para inmunoglobulinas totales*

En el momento de la primera toma de sangre, la ratio para $IgG1$ de los grupos A (1,115) y B (1,069) fueron similares, siendo probablemente estos anticuerpos de origen maternal. Tras la administración de la primera dosis vacunal (grupos A y B) y la dosis de INMD (grupo B), la ratio fue superior en los animales del grupo B (1,448) con respecto a los del grupo A (0,844) ($p < 0,01$). Estas diferencias desaparecieron en la tercera toma de sangre.

Para $IgG2$, los resultados obtenidos fueron similares, aunque inferiores, a los de la $IgG1$, encontrándose así mismo una diferencia significativa en los animales del grupo B (0,707) con respecto a los del grupo A (0,375) ($p < 0,01$).

c) *ELISA para inmunoglobulinas específicas frente a VEA*

A diferencia de los resultados anteriores, no se observaron diferencias significativas para las Ig s específicas entre las vacunaciones. Sin embargo, para los isotipos $IgG1$ e IgA , se encontraron tendencias a la significación entre los grupos. En el caso de $IgG1$, esta tendencia se observó en el grupo B tras la primera vacunación ($p = 0,06$), mientras que para el isotipo IgA , se evidenció posteriormente a la revacunación ($p = 0,08$). Por otra parte, al agrupar los animales de cada grupo por títulos ($\leq 1:20$; $\geq 1:40$) se observó que un porcentaje significativo de animales del grupo B (25%), presentaban un título $\geq 1:40$ para el isotipo IgA tras la segunda vacunación ($p < 0,005$). Así mismo, se observó un mayor porcentaje de animales del

grupo B (38,48%) que presentaban títulos iguales o superiores a 1:40 comparado con el grupo A (14,81%) ($p < 0,01$).

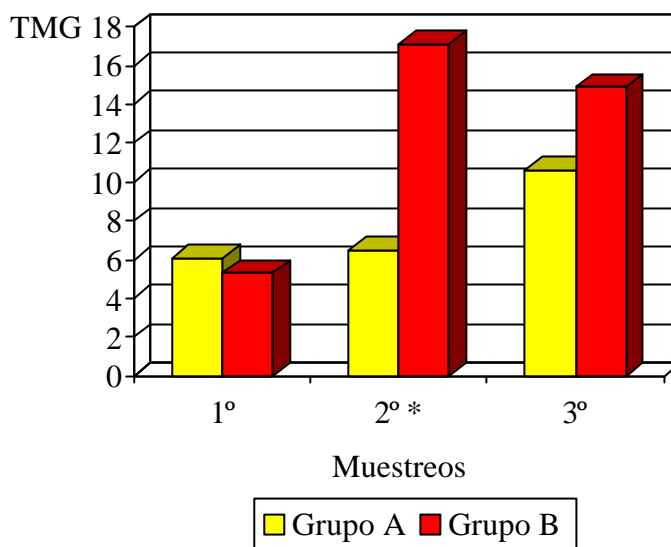
d) *Linfoproliferación*

Antes de la primera vacunación, todos los animales presentaron una respuesta negativa ante el VEA en la prueba de proliferación celular (densidad óptica $0,035 \pm 0,124$ para el grupo A y $0,022 \pm 0,020$ para el grupo B) aunque todos los grupos respondieron ante PHA (A = $0,736 \pm 0,183$; B = $0,681 \pm 0,121$). Tras la realización de la vacunación, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (A = $0,008 \pm 0,015$; B = $0,039 \pm 0,053$). Tras la segunda vacunación, si bien la lectura de las absorbancia se incrementó en ambos grupos (A = $0,136 \pm 0,122$; B = $0,101 \pm 0,099$), éstas fueron bajas comparadas con las PBMC estimuladas con PHA (A = $1,283 \pm 0,716$; B = $0,871 \pm 0,605$), no encontrándose diferencias significativas entre grupos.

e) *Títulos de anticuerpos neutralizantes frente a VEA*

Al inicio del ensayo, se observó que los TMG obtenidos para cada grupo eran similares (grupo A = $6,1 \pm 2,1$; grupo B = $5,3 \pm 2$). Cuatro semanas después de la primera vacunación, el TMG fue significativamente superior en el grupo B ($17,1 \pm 4$) respecto al grupo A ($6,5 \pm 4,3$) ($p < 0,005$). Tras la segunda vacunación, si bien la tendencia se mantuvo ($14,9 \pm 5,3$ grupo B; $10,6 \pm 3,7$ grupo A), la diferencia no fue significativa (figura 30).

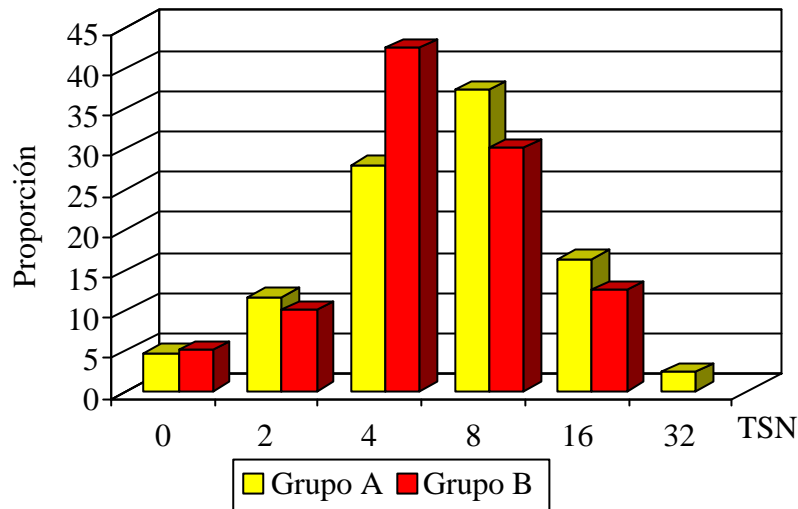
Figura 30. Título medio geométrico de anticuerpos neutralizantes frente al VEA al inicio del ensayo y tras las vacunaciones realizadas.



TMG: Título medio geométrico; Grupo A: animales vacunados contra el virus de la enfermedad de Aujeszky; Grupo B: animales vacunados contra el virus de la enfermedad de Aujeszky e inyectados con una dosis de INMD; * $p < 0,005$

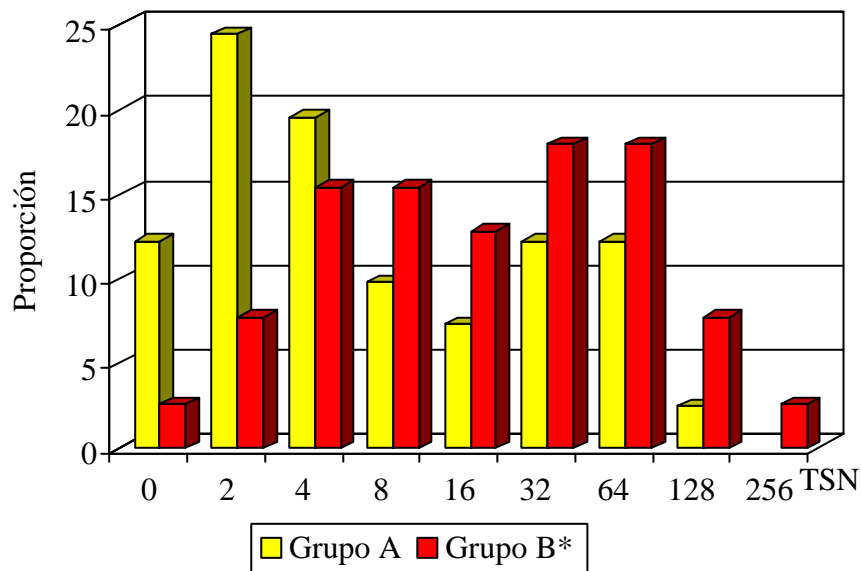
Agrupando los animales por cada uno de los títulos seroneutralizantes obtenidos (diluciones seriadas 1:2 a 1:256), se pudo observar que antes de la primera vacunación, la distribución de los títulos de anticuerpos neutralizantes para VEA eran similares entre los dos grupos (figura 31). Sin embargo, cuatro semanas posteriores a la primovacunaación, el 56,7% de los animales del grupo A (24 de 41) eran seronegativos o presentaban títulos neutralizantes iguales o inferiores a 1:4, mientras que el 25,6% de los cerdos del grupo B (10 de 39) eran seronegativos o presentaban títulos inferiores a 1:4 ($p < 0,05$) (figura 32). Esta diferencia desapareció tras la segunda vacunación.

Figura 31. Distribución de los títulos seroneutralizantes para el VEA previo a la primera vacunación.



TSN: título seroneutralizante; Grupo A: animales vacunados contra el virus de la enfermedad de Aujeszky; Grupo B: animales vacunados contra el virus de la enfermedad de Aujeszky e inyectados con una dosis de INMD.

Figura 32. Distribución de los títulos de seroneutralización para el VEA posterior a la aplicación de la primera vacunación.



TSN: título seroneutralizante. Grupo A: animales vacunados contra el virus de la enfermedad de Aujeszky; Grupo B: animales vacunados contra el virus de la enfermedad de Aujeszky e inyectados con una dosis de INMD;

*p<0,005.

3.2. Estudio B

Ninguno de los cerdos de los tres grupos manifestaron síntomas de dolor, vómito, anorexia, diarrea, letargia, decaimiento general, shock o fiebre alta (≥ 41 °C) dentro de las 24 horas posteriores a la administración de INMD (tabla 9). Así mismo, ninguno de los cerdos presentó niveles medibles del TNF- α , excepto el cerdo número 3 (grupo A) que tuvo niveles de 10 pg/ml 1 hora luego de administrado el producto.

Tabla 9. Máxima temperatura rectal por grupo en cerdos inyectados con INMD o placebo.

Grupo ¹	Número del cerdo	°C ²
A	1	40,76
B	4	40,79
C	8	40,00

¹Grupo A (cerdos 1, 2 y 3): 1,2 μ g/kg de LPS y 16 μ g/kg de Pg

¹Grupo B (cerdos 4, 5 y 6) : 2,6 μ g/kg de LPS y 33 μ g/kg de Pg.

¹Grupo C (cerdos 7 y 8) : solución salina estéril.

²Máxima temperatura rectal en un período de 24 horas (P>0.05).

VI. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, se ha estudiado la eficacia de distintos compuestos inmunomoduladores con relación a diversas infecciones, procesos cancerosos, inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes de importancia en medicina humana. Estos compuestos también se han utilizado en veterinaria con el objetivo de incrementar la resistencia a enfermedades, lo que permitiría minimizar el impacto económico de las mismas actuando como alternativa o complemento a otras medidas sanitarias y de manejo (Blecha, 1988; Kehrlí y Thot, 1990; Mulcahy y Quinn, 1986; Quinn, 1990; Stipkovits *et al.*, 1998).

El inmunoterápico INMD combina LPS y Pg, componentes que han demostrado tener la capacidad de estimular y regular la respuesta inmunitaria en personas y animales (Ko *et al.*, 1981; Norimatsu *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1994; Roszkowski *et al.*, 1980). Así mismo, la combinación de ambas sustancias puede dar lugar a efectos sinérgicos que incrementan su efectividad como inmunomodulador (Okamura *et al.*, 1982; Okamura *et al.*, 1987). En el presente estudio hemos realizado una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo* con el fin de conocer las bases inmunitarias de la acción de INMD.

1. Ensayos *in vitro*

a) Sobre la expresión de citoquinas

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* muestran que INMD induce la expresión y/o secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α . Estas citoquinas forman parte importante del complejo de eventos de la respuesta inicial frente a agentes infecciosos al poseer un espectro de actividad amplio que les permiten actuar sobre diferentes tipos celulares, fundamentalmente macrófagos.

La inducción de la expresión de estas citoquinas podría ser debida, mayoritariamente, a la acción del LPS, ya que este componente ha demostrado poseer la capacidad de producir la activación de monocitos/macrófagos y linfocitos con la consecuente producción y liberación de las citoquinas pro-inflamatorias, (Adams *et al.*, 1990; Chensue *et al.*, 1991; Fernández-Botran *et*

al., 1996; Klir *et al.*, 1997; Scamurra *et al.*, 1996). Sin embargo, las bacterias pertenecientes al género *Propionibacterium* también han demostrado ser capaces de inducir este efecto, especialmente para IL-1 y TNF- α (Mori *et al.*, 1994; Rossoll *et al.*, 1990). La capacidad de INMD para inducir estas citoquinas pro-inflamatorias podría determinar la utilidad del producto según el tipo de proceso en el que se aplique. En este caso particular, podría ser útil en situaciones en las cuales fuese adecuado un tipo de respuesta inflamatoria en patologías que cursan con invasiones bacterianas como en problemas respiratorios causados por bacterias, mastitis bacterianas, etc.

Así mismo, INMD indujo significativamente la secreción de INF- γ en las PBMC estimuladas con el producto. Este hecho se ha observado en personas y ratones en los que se obtuvo un incremento de los niveles de producción de INF- α , INF- β e INF- γ como respuesta a un sinergismo entre LPS y *Propionibacterium* (Okamura *et al.*, 1982; Okamura *et al.*, 1987; Sugiyama y Epstein, 1978). Sin embargo, en muchos de estos ensayos, al contrario que en los nuestros, *Propionibacterium* fue administrado previamente al LPS. La capacidad de INMD para inducir esta secreción refuerza la idea de que este compuesto induce una estimulación de tipo inflamatorio con activación de macrófagos. Además, la producción de INF- γ puede inducir un estado antivírico, importante en procesos infecciosos de relevancia en el cerdo.

Por otra parte, los macrófagos alveolares y PBMC estimulados con INMD expresaron IL-12, componente crítico para el desarrollo de la inmunidad tipo Th1 (Biron y Gazzinelli, 1995). Estudios anteriores han demostrado la relación entre la secreción de IL-12 y la inducción de la liberación de INF- γ por parte de células NK y células T en una retroalimentación positiva que induce la activación de macrófagos y células NK (Foss *et al.*, 1999). La elaboración de estas citoquinas durante procesos infecciosos es prioritaria para la activación de macrófagos, la inhibición de la replicación vírica y promoción de una respuesta inmune de tipo Th1 (D'Andrea *et al.*, 1992; Scamurra *et al.*, 1996; Schijs *et al.*, 1995)

En diversos ensayos se ha comprobado que tanto el LPS como *Propionibacterium* estimulan la producción de IL-12 en macrófagos y PBMC (Foss *et al.*, 1999; Hume *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2000; Verhasselt *et al.*, 1997). La inducción de la producción de INF- γ por parte de IMMD podría ser debido a una estimulación directa sobre linfocitos,

células NK u otras, o bien tener como mecanismo la inducción de la producción de IL-12. En PBMC de ratones pre-tratados con *Propionibacterium acnes* a los que posteriormente se les administró LPS, en presencia de IL-12, se incrementaron considerablemente los niveles de INF- γ (Okamura *et al.*, 1987). Otros autores han observado que *Propionibacterium* produce un incremento en la producción de INF- γ al estimular la producción de IL-12 en los macrófagos (Roszkowski *et al.*, 1990).

A pesar de observarse *in vitro* la expresión de IL-12 a través de RT-PCR en los macrófagos alveolares y PBMC de cerdos estimulados con INMD, en el ensayo de linfoproliferación no se observaron diferencias entre los animales sólo vacunados y los que recibieron INMD. En ensayos realizados en PBMC de porcinos, INMD combinado con un mitógeno, a dosis subóptima, presenta una actividad proliferativa (Álvarez *et al.*, 1998). Podríamos explicar esta discrepancia mediante cuatro hipótesis:

- 1) En primer término se podría pensar que no se produce la secreción de otras citoquinas, principalmente IL-2, que participan de alguna manera en la linfoproliferación (IL-4, IL-6, INF- γ). Sin embargo en nuestros ensayos se determinó la producción de INF- γ así como la expresión de CD25, lo que podría sugerir la producción de IL-2. Se han realizado ensayos en los que se ha observado que IL-2 puede inducir la expresión de CD25 (Sereti *et al.*, 2000), sin embargo, en algunos de ellos no se han observado correlación entre la expresión de este receptor y la producción de IL-2 (Lai *et al.*, 1991).
- 2) En segundo término, se sabe que la infección por *Herpesvirus* en PBMC reduce la respuesta proliferativa de estas células, incluso a mitógenos e IL-2, lo que podría estar relacionado con una disminución en la producción de IL-12 (Carter *et al.*, 1989; Chinsakchai y Molitor 1992; Lan *et al.*, 1996). Es posible que el período de exposición de las PBMC al VEA durante la elaboración de ELISA (72 horas) haya causado una disminución de la respuesta proliferativa de las PBMC.
- 3) Así mismo, podríamos asumir que los macrófagos, a pesar de expresar IL-12 tras la estimulación con INMD, no la secretan. En este caso se produciría un incremento de la transcripción de RNA, un incremento del número de células que expresan IL-12 o una reducción de la degradación de la misma (RNA). En el caso de ser esta teoría correcta, ello implicaría la existencia de algún mecanismo de regulación post-transcripcional. Esta

divergencia entre la expresión y producción se ha observado, *in vivo* con TNF- α , en ratones, donde se determinó por RT-PCR un incremento de los niveles de expresión de esta citoquina pero no se detectó en suero mediante ELISA (Favre *et al.*, 1997). Sin embargo en el cerdo, Verfaillie *et al.* (2001) observaron en otras citoquinas (IL-10, INF- γ), una correlación entre su expresión, analizadas por RT-PCR, y la secreción de las mismas.

- 4) Por último existe la posibilidad de que el ELISA comercial utilizado para determinar la linfoproliferación no sea lo suficientemente sensible como para poder distinguir diferencias en la linfoproliferación, si es que las hubo, en este caso concreto.

Con relación a IL-4, pudimos observar su expresión tanto en macrófagos alveolares como en PBMC. Esta citoquina actúa de manera determinante en la polarización de la respuesta inmune. Si esta expresión se traduce en secreción, podríamos pensar que INMD podría actuar en la clonación de las células Th a Th2 y controlar la polarización Th1.

Respecto a IL-10, se observó su expresión al cabo de las 24 horas de estimulación en las PBMC, no así en los macrófagos alveolares. La IL-10 es un importante regulador de los mecanismos inmunes al inhibir la activación de monocitos/macrófagos, células NK, Th1, suprimir la inmunidad celular e inhibir la expresión de MHC-II y podría, por lo tanto, producirse como un mecanismo de regulación natural (Armstrong *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1994; Pretolani y Goldman, 1997), aunque no se puede descartar que su expresión fuese inducida por un efecto tardío de INMD.

b) *Sobre la fagocitosis de los neutrófilos polimorfonucleares*

INMD tuvo un efecto positivo sobre la fagocitosis al incrementarla considerablemente, hecho que estuvo correlacionado básicamente con el componente Pg. Sin embargo, observamos que el aumento de la capacidad fagocítica se debió a un incremento en el número de células que se activaron y fagocitaron más que a un incremento de la capacidad fagocítica individual. Este aumento de la fagocitosis por parte de Pg se ha observado en macrófagos murinos y humanos (Roszkowski *et al.*, 1980; Roszkowski *et al.*, 1990).

Es posible que el Pg estimule la inducción de algún factor, como podría ser una quimioquina y/o citoquina, que produzca un incremento en el número de células activadas para fagocitar. Se sabe que los neutrófilos son células receptoras y productoras de una serie de citoquinas y quimioquinas que pueden, además de actuar como sustancias quimiotácticas, incrementar la activación y capacidad fagocítica de los neutrófilos aumentando su actividad antibacteriana (Cassatella, 1995; Reinard *et al.*, 2000). En estudios realizados en PMN de bovinos, se ha observado que el TNF- α incrementa la actividad fagocítica y bactericida en estas células (Reinard *et al.*, 2000). En humanos, la IL-8, IL-13, IL-15 y el péptido activador de neutrófilos-2 (NAP-2), incrementan la producción de citoquinas, quimioquinas y la fagocitosis en neutrófilos (Bazzoni *et al.*, 1991; Detmers *et al.*, 1991; Girad *et al.*, 1996; Hachicha *et al.*, 1998; Musso *et al.*, 1998; Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Cual de estas sustancias u otras pudo estar involucrada en la activación de neutrófilos resulta, por ahora, desconocido para nosotros. En macrófagos se ha comprobado que el efecto de las citoquinas que se producen como respuesta a la administración del *Propionibacterium*, podrían influir en el incremento de la endocitosis, pinocitosis, fagocitosis y el aumento de macrófagos activados (Billiau, 1996).

Los neutrófilos a pesar de ser células muy importante por su función fagocitaria, son fagocitos que directamente no son capaces de desplegar su máximo potencial fagocítico y bactericida, teniendo una limitación y menor capacidad de fagocitosis y eliminación de agentes externos en comparación con los monocitos/macrófagos. Sin embargo, estos mecanismos se ven incrementados por parte de los PMN por contacto previo con un agente primario o un factor antes de realizar la fagocitosis (Reinard *et al.*, 2000). Por este motivo, sustancias con la capacidad de producir un efecto estimulante directo o indirecto sobre estas células, incrementando su índice de fagocitosis, son interesantes para mejorar u obtener una adecuada respuesta frente a infecciones bacterianas.

c) *Sobre la expresión de MHC-II*

Nuestros resultados indican que los macrófagos alveolares expuestos a los diferentes estímulos expresaron MHC-II. Así en macrófagos no infectados, la mayor expresión se obtuvo con INMD. Por el contrario, entre los macrófagos alveolares infectados con el VEA,

la máxima expresión de MHC-II se obtuvo con LPS. Resulta llamativo que fuesen estímulos diferentes los que indujeron la máxima expresión de MHC-II en células no infectadas (INMD) y en células infectadas con VEA (LPS). Esta discrepancia podría atribuirse, hipotéticamente, a la modificación de la funcionabilidad del macrófago alveolar que produciría el virus.

Así mismo, observamos que la infección de los macrófagos alveolares durante 18-20 horas con VEA produjo un incremento los niveles de expresión de MHC-II, independientemente del estímulo utilizado. En infecciones con Herpesvirus en bovinos (BHV-1), se ha observado un ligero incremento de la expresión de MHC-II en los macrófagos alveolares entre las 24 y 96 horas post-infección (Bielefeldt y Babiuk, 1986). Por otra parte, en macrófagos pre-tratados con LPS se ha observado un potencial incremento de la respuesta inmune de los macrófagos frente a antígenos (Alving, 1993). Por este hecho, se podría pensar que la estimulación realizada con LPS podría inducir en el macrófago un estado de sensibilidad o preparación que le permitiría reaccionar de manera más intensa en el posterior contacto con el VEA, aunque esto no se observaría en la combinación de LPS y Pg.

Una de las características de los macrófagos estimulados con LPS es la expresión de MHC-II en la superficie celular (Alving, 1993; Behbehani *et al.*, 1985; Marshall y Ziegler, 1989). En macrófagos de ratones se ha comprobado que durante la infección de bacterias gram negativas el LPS incrementa la inducción de MHC-II (Marshall y Ziegler, 1989). Este efecto del LPS podría realizarse de dos maneras, bien por un efecto directo sobre el macrófago o mediante la inducción de la producción de algún factor soluble como IL-1 o INF- γ (Behbehani *et al.*, 1985). En nuestros ensayos observamos la inducción de la expresión de IL-1 por parte de los macrófagos alveolares estimulados con INMD y VEA, así que podría suponerse que el incremento de la expresión de MHC-II, en las células estimuladas con LPS e infectadas con VEA, podría producirse por esta vía, ya que entre las células no infectadas, si bien el LPS estimuló la expresión de MHC-II, éste no fue el mayor índice de expresión.

Por otra parte, en nuestros ensayos, Pg fue el segundo estímulo que indujo la máxima expresión de MHC-II, tanto en las células infectadas como las que no lo estaban. En estudios realizados utilizando el muramil-dipéptido, componente de *Propionibacterium*, se ha

observado un ligero incremento de la expresión de MHC-II aunque no de manera significativa (Behbehani *et al.*, 1985). En otros estudios, *P. acnes*, ha demostrado su capacidad para inducir la expresión de MHC-II en macrófagos peritoneales de ratones (Woods *et al.*, 1997). Sin embargo, en fagocitos derivados de médula ósea de ratones, expuestos por 24 horas a *P. acnes*, no se observó un incremento significativo de la expresión de MHC-II comparado con otros estímulos (*Listeria*, INF- γ y linfoquina activadora de macrófagos) (Keller *et al.*, 1988). Es posible que diferentes especies presenten distinto tipo de respuesta a los mismos estímulos.

Esta inducción de MHC-II por parte de INMD en los macrófagos alveolares podría favorecer la presentación de antígenos por parte de estas células y, probablemente, contribuiría a desencadenar de una manera más rápida e intensa la respuesta inmune.

d) Sobre la expresión de CD25

INMD y cada uno de sus componentes produjeron la activación de las PBMC, observándose un efecto sinérgico en la expresión de CD25 como respuesta a la combinación de LPS y Pg. Este hecho nos indicaría que INMD sería capaz de actuar directamente sobre estas células o indirectamente, a través de la producción y liberación de citoquinas como TNF- α e IL-1, para inducir su activación.

Utilizando monocitos humanos, se ha comprobado que LPS puede inducir la expresión de CD25 (Kniep *et al.*, 1992; Scheibenbogen *et al.*, 1992). Así mismo, *Propionibacterium* puede inducir la activación de linfocitos (Roszkowski *et al.*, 1980). En el mencionado estudio, la activación linfocitaria se midió a través del transporte de iones en la membrana así como la inducción de la síntesis de RNA, sin embargo, no se determinó la expresión de CD25. En nuestros ensayos comprobamos que Pg en cerdos sanos induce la expresión de CD25, indicando que se produjo activación celular. Es posible que el incremento de la expresión de CD25 en las células estimuladas con INMD se deba a la suma de efecto de sus compuestos sobre las PBMC. Otros autores (Álvarez *et al.*, 1998), han obtenido inducción de la expresión de CD25 en PBMC de porcinos estimuladas con INMD, si bien el incremento no fue significativo.

En nuestros ensayos, entre las PBMC infectadas, procedentes de animales no vacunados frente al VEA, observamos la mayor expresión de CD25 con INMD, sin haber diferencias significativas en el porcentaje de expresión con las células no infectadas. Posteriormente a la administración de la vacuna contra la enfermedad de Aujeszky, se mantuvo INMD como el estímulo que indujo la mayor expresión de CD25 aunque también se incrementó la expresión entre todos los estímulos, incluyendo el valor basal (de $3,22\% \pm 0,88$ a $14,62\% \pm 0,97$). Sin embargo, en este caso tampoco se observó diferencias entre los grupos de células sin infectar y las que fueron infectadas con VEA, donde se esperaría un incremento de la expresión de CD25. Otros autores han realizados ensayos en bovinos y humanos con Herpesvirus donde la infección de PBMC induce un incremento de la expresión de CD25 (Carter *et al.*, 1989; Koide *et al.*, 1998; Lan *et al.*, 1996; Vockerodt *et al.*, 2001).

La similitud de porcentaje de expresión de CD25 entre las PBMC sin infectar e infectadas con VEA, podrían explicarse, posiblemente, como un efecto debido a las condiciones de los animales. Las muestras utilizadas pertenecían a cerdos de control de un experimento de infección realizado por otro grupo de investigación. Entre las tomas de muestras transcurrieron 15 días, con la realización de la vacunación frente al VEA, seis días antes del segundo sangramiento. Cabe la posibilidad que en el momento de la primera toma (12-13 semanas de edad) estos animales aún tuvieran anticuerpos maternos por lo que no respondieron como se esperaba a la vacunación y a la estimulación de sus células con el VEA. Por otra parte, para la segunda toma de muestra es posible que al haber transcurrido apenas seis días desde el momento de la vacunación, aún no fuese detectable una respuesta ligada a CD25 o IL-2.

2. Ensayos *in vivo*

Es frecuente que al vacunar lechones frente al virus de la enfermedad de Aujeszky a la entrada en transición (8–10 semanas de edad), muchos de ellos aún posean anticuerpos maternos y que por este u otros motivos, la respuesta a una primovacuna no sea eficiente. Por otro lado, si bien la presencia de la inmunidad pasiva anti-VEA reduce la gravedad del cuadro clínico si los lechones se infectan, ésta no previene completamente el establecimiento de la infección ni la posterior excreción vírica. Además, la presencia de estos

anticuerpos de origen maternal puede bloquear el desarrollo de una respuesta inmune activa al realizarse la vacunación (Bouma *et al.*, 1998; Kimman, 1993; Van Oirschot, 1987).

En el estudio A, se observó que en cerdos con anticuerpos maternos frente VEA a los que se les administró simultáneamente la vacuna e INMD, se redujo la proporción de animales que no responden adecuadamente a la primera aplicación de un antígeno, incrementando significativamente el porcentaje de animales con títulos seroneutralizantes $\geq 1:4$ tras la primera vacunación. El incremento de esta respuesta humoral ante la aplicación de la vacuna para el VEA e INMD podría atribuirse a una serie de hechos: se podría inducir una mayor o más eficiente presentación de antígeno por parte de los macrófagos u otras APC y un aumento de la activación celular. En nuestros ensayos *in vitro*, observamos que INMD era capaz de activar los macrófagos y linfocitos induciendo la expresión de MHC-II y CD25, tanto en macrófagos alveolares y PBMC infectadas o no con VEA, lo que reforzaría la idea de la presentación de antígeno y activación como la principal vía para el incremento de la respuesta humoral. Así mismo, se podría pensar en un incremento de la producción de anticuerpos bien sea por un aumento en la actividad cooperadora de las células CD4 o a un estímulo directo de las células B, hecho que se ha observado por parte del LPS (Jacobs, 1982).

Esta diferencia en los títulos seroneutralizantes no se mantuvo tras la revacunación. Esto podría deberse a que inicialmente se produce una respuesta primaria intensa, posiblemente por parte de IgM, que desaparece posteriormente. Sin embargo, cabría la posibilidad de que se produjese una saturación de la respuesta humoral o, por otro lado, un corto efecto de la estimulación por parte de INMD. Todos estos hechos nos podrían indicar que la administración *in vivo* de INMD junto a este antígeno vírico, incrementa la eficiencia de la respuesta primaria, incluso en cerdos que poseían niveles moderados de anticuerpos calostrales frente al VEA. En un ensayo previo realizado en el estudio B (datos no presentados), se evaluó la cinética de aparición de anticuerpos neutralizantes frente al VEA tras la vacunación. Cinco días posteriores a la vacunación, 25% de los animales eran positivos, observándose una seroconversión en el 100% de los animales a los 11 días, no existiendo diferencia en el tiempo de aparición y duración de los anticuerpos neutralizantes entre el grupo de animales tratados con INMD y el grupo únicamente vacunado. Utilizando cepa Bartha, en animales con inmunidad pasiva, Kimman *et al.* (1992),

observó la aparición de anticuerpos neutralizantes entre 8 y 10 días, niveles que se mantuvieron hasta terminado dicho ensayo (100 días).

Teniendo en cuenta que la entrada en el engorde es uno de los momentos críticos para la circulación del VEA en una granja, podría suponerse que la administración de este inmunomodulador en la primovacunación, contribuiría sustancialmente en la reducción del número de animales susceptibles a la infección del VEA durante este período, contribuyendo a homogeneizar el estatus inmunitario entre la mayoría de los lechones en una primovacunación. Esto sería particularmente importante en aquellas granjas endémicamente infectadas en las que es necesario un buen aporte de anticuerpos maternos pero, a la misma vez, una vacunación lo antes posible. Así mismo, se pudo observar que este inmunomodulador no interfiere de ninguna manera en la seroconversión de los animales frente a VEA, sino que al contrario, potencia la respuesta inmune de los animales frente a la aplicación de la vacuna con un significativo incremento de la producción de anticuerpos seroneutralizantes. Se sabe que en cerdos con inmunidad maternal frente VEA, se produce una temprana eliminación de células infectadas por parte de los linfocitos CD8 y otros tipos celulares, con lo cual no se desarrollan linfocitos B de memoria los cuales son muy importantes para inducir una adecuada inmunidad vacunal (Kimman *et al.*, 1992).

Nuestros resultados para los isotipos IgG1 e IgG2 resultaron contradictorios entre los anticuerpos totales y específicos frente VEA. Entre grupos se observaron diferencias significativas para IgG1 e IgG2 totales tras la aplicación del inmunomodulador y la vacuna, sin embargo, no se observaron estas diferencias en los anticuerpos específicos frente al VEA, aunque se produjo una tendencia a la significación entre los animales a los que se les administró INMD. Esta discrepancia podría deberse a un incremento en la respuesta total de IgG1 e IgG2 (específicas e inespecíficas), tras la aplicación de INMD. Así mismo, existe la posibilidad que se produzca un incremento de la inmunidad inespecífica general, la formación de anticuerpos contra LPS y Pg o algún efecto de bloqueo por parte de los anticuerpos maternos específicos para VEA, sin embargo, observamos que en la evaluación de los anticuerpos neutralizantes específicos frente al VEA si se observó diferencias entre grupos. En animales con inmunidad pasiva adquirida, Kimman *et al* (1992), observaron que la aplicación del VEA no indujo una respuesta efectiva tras la primera inoculación, encontrando niveles detectables de IgG1, IgG2,

IgA y anticuerpos neutralizantes luego de un segundo enfrentamiento con el VEA, aunque éstos fueron bajos y por corto periodo de tiempo (Kimman *et al.*, 1992).

Con respecto a IgA, observamos que tras la segunda aplicación intramuscular de la vacuna contra la enfermedad de Aujeszky, se obtuvieron niveles significativos de IgA en los animales que habían recibido el inmunomodulador. En otros ensayos llevados a cabo con la administración intramuscular del VEA, se observó una respuesta de IgA mucosal, aunque fue baja y de corta duración (Kimman *et al.*, 1992). Se sabe que el LPS y la toxina del cólera son unos de los estimulantes mucosales más potentes y suelen ser muy eficaces en la inducción de anticuerpos IgA (Flo *et al.*, 1996; Hann *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998; Van Der Verg *et al.*, 1996; Verweij *et al.*, 1998). Debido a nuestros resultados, cabría suponer que en caso de realizarse una aplicación simultánea de VEA e INMD vía intranasal, no solo produciría isotipos de anticuerpos en sangre, sino también anticuerpos mucosales así como una reacción inmunitaria celular local.

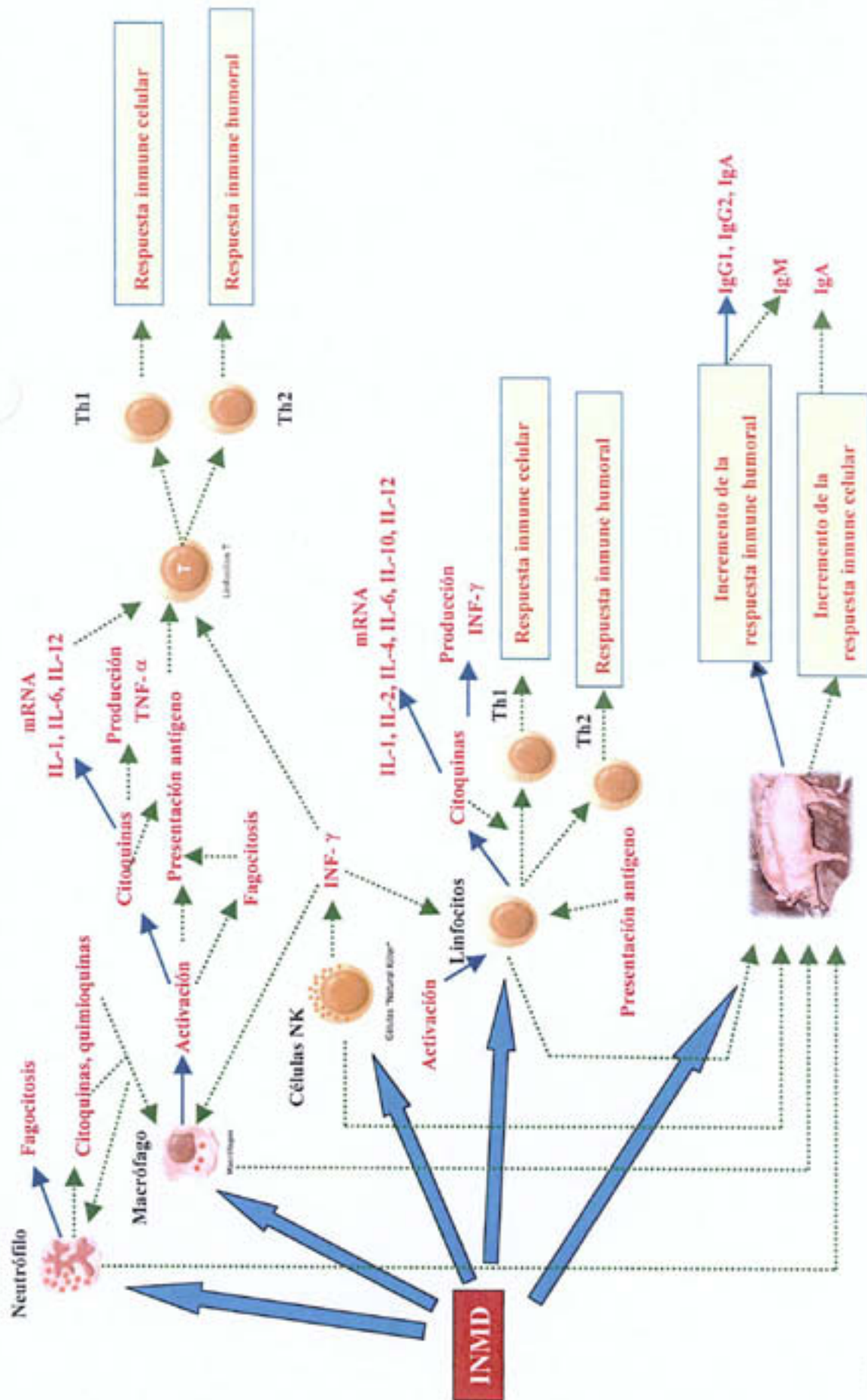
En infecciones con Herpesvirus, el LPS y *Propionibacterium* han demostrado poseer un efecto clínico favorable. En ratones, tratados con Pg entre 3 y 7 días previos a la infección con *Herpesvirus simplex tipo 1* (HSV-1), se incrementó considerablemente la tasa de supervivencia (95%) comparado con los animales controles (15%-30%) (Szmigielski *et al.*, 1980). En cerdos inoculados intranasalmente con el VEA (cepa NIA-3) tras la administración de *Propionibacterium acnes* (100 µg/ml vía intravenosa) y la vacuna contra la enfermedad de Aujeszky, se obtuvo una reducción del 60% en los efectos secundarios causados por la aplicación de la vacuna (fiebre, depresión, anorexia, decaimiento general) comparado con los animales solos vacunados (30%), observándose un título de anticuerpos superior en los animales que recibieron la bacteria así como una reducción en la disminución de la ganancia de peso diaria (Markowska-Daniel *et al.*, 1992a; Markowska-Daniel *et al.*, 1993a). En estos ensayos, la aplicación de *Propionibacterium acnes* influyó significativamente en el curso de la infección del virus debido a que se produjo un incremento de la resistencia antivírica, un incremento en la activación primaria de monocitos/macrófagos, inducción de interferón y la estimulación de células NK, lo cual produjo el establecimiento de todos los mecanismos naturales de resistencia antivírica.

La aplicación de este producto podría ser interesante como coadyuvante de la vacunación aunque en algunas patologías el título de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna no necesariamente tiene correlación con la resistencia a la infección (Martín y Wardler, 1986).

Por otra parte, pudimos observar que INMD tendría presumiblemente la capacidad de estimular la producción y liberación de citoquinas a niveles suficientes para producir los efectos deseados sin provocar reacciones adversas como las inducidas por LPS de bacterias, por la producción de altos niveles de citoquina o la liberación prolongada en el tiempo de citoquinas (fiebre, letargia, anorexia, caquexia, shock, etc.). Se ha descrito en cerdos que la administración de LPS de *E. coli* a dosis iguales o superiores a 1 µg/Kg P.V. resulta en una elevación de los niveles de TNF- α en suero así como el desarrollo de signos clínicos adversos (Klir *et al.*, 1997; Norimatsu *et al.*, 1995). En nuestro estudio con una dosis de INMD correspondiente a 0,0012 ó 0,0026 µg/kg P.V. de LPS, según el grupo, no se observaron los signos descritos anteriormente en ninguno de los animales. Por otra parte, observamos que los niveles de expresión y producción de las citoquinas inducidas por INMD *in vitro*, fueron inferiores que en las células estimuladas con LPS de *E. coli*, excepto para INF- γ .

En resumen se podría decir que este inmunomodulador influye en la respuesta inmune del cerdo actuando básicamente sobre las células del sistema inmune estimulando en ellas una serie de mecanismos que participan de manera primordial en la respuesta inmunitaria. En la figura 33, pretendemos resumir los efectos de INMD determinados directamente (flechas continuas, color azul) y los efectos que se derivan o que se producirían tras la estimulación con INMD (flechas discontinuas, color verde).

Figura 33. Hipótesis del posible efecto de INMD sobre el sistema inmune del cerdo.



VII. CONCLUSIONES

1. La inducción del patrón de citoquinas pro-inflamatorias así como de IL-2, IL-4 e IL-12, sugiere que INMD tiene un potencial efecto sobre la activación de las células mononucleares de sangre periférica, macrófagos alveolares y neutrófilos polimorfonucleares, lo que actuaría sobre todo el proceso de la respuesta inmune donde participan estas citoquinas.
2. En el cerdo la combinación de lipopolisacárido y *Propionibacterium granulosum* promueve la producción y liberación de INF- γ , lo que podría inducir en los animales un incremento en la activación y funciones de los macrófagos, un estado antivírico y contribuiría a la polarización de la inmunidad de tipo Th1.
3. INMD potencia positivamente la función de fagocitosis de los neutrófilos polimorfonucleares, incrementando considerablemente el número de células que fagocitan. Este hecho podría incrementar la resistencia frente patógenos bacterianos en las primeras fases de la respuesta inmune.
4. La inducción de la expresión de MHC-II por parte de INMD indicaría que este producto actuaría positivamente en la presentación de antígenos y en el posterior desarrollo de la respuesta inmune.
5. INMD induce la expresión de CD25, marcador de activación de linfocitos, lo que sugeriría su potencial capacidad para aumentar la intensidad de la respuesta linfocitaria.
6. Al ser utilizado como coadyuvante frente a la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky, INMD es capaz de incrementar la repuesta inmune humoral primaria, incluso en presencia de anticuerpos maternos, lo que contribuye a disminuir las diferencias en el estatus inmunitario en una población de animales que se vacunan por primera vez.
7. Los niveles de citoquinas fueron inferiores con INMD que con LPS extraído con fenoles, excepto para INF- γ . Además, los animales a los que se les administró INMD a dosis superiores a las recomendadas no presentaron efectos adversos, lo que indica la seguridad del producto.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Adams J.L., Semrad S.D., Czuprynski Ch.J. 1990. Administration of bacterial lipopolysaccharide elicits circulating tumor necrosis factor- α in neonatal calves. *J Clin Microbiol* **28**:998-1002.
- Álvarez B., Ezquerro A., Gomez del Moral M., Alonso F., Tarés J., Marca J., Dominguez J. 1998. Analysis of the in vitro effects of the compound Inmodulen[®] of several parameters of the pig immune response. Proceeding 15th IPVS, Birmingham, Reino Unido., pp 24.
- Alving C.R. 1993. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiol* **187**:430-446.
- Armstrong L., Jordan N., Millar A. 1996. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor α (TNF- α) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* **51**:143-149.
- Arnaiz-Villena A., Regueiro J.R., Lopez C. 1995 *Inmunología*. Ed. Editorial Complutense; (Madrid, España).
- Baarsch M.J., Scamurra R.W., Burger K., Foss D.L., Maheswaran S.K., Murtaugh M.P. 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **63**:3587-3594.
- Basta S., Knoetig S., Summerfield A., McCullough K.C. 2001. Lipopolisaccharide and phormol 12-myristate 13 acetate both impair monocyte differentiation, relaing cellular function to virus susceptibility. *Immunology* **103**:488-497.
- Bazzoni F., Cassatella M.A., Rossi F., Ceska M., Dewald B., Baggiolini M. 1991. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin-8. *J Exp Med* **173**:771-774.
- Becker A.M., Janik T.A., Smith E.K., Sousa C.A., Peters B.A. 1989. *Propionibacterium acnes* immunotherapy in chronic recurrent canine pyoderma. *J Vet Int Med* **3**:26-30.
- Behbehani K., Beller D.I., Unanue E.R. 1985. The effects of beryllium and other adjuvants on Ia expression by macrophages. *J Immunol* **134**:2047-2079.
- Beverly C.D., Lynch J.P., Peloso J.J., White B.A. 1993. Polymerase chain reaction: basic protocols. En: PCR Protocols: current methods and applications. Ed. White B.A.; Humana press (NJ, USA); pp 1-30.
- Bielefeldt O., Babiuk L.A. 1986. Alteration of alveolar macrophage functions after aerosol infection with bovine herpesvirus tipo 1. *Infect Immun* **51**:344-347.

- Billiau A. 1996. Interferon- γ : biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* **62**:61-130.
- Binns R.M. 1982. Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet Immunol Immunophatol* **3**:95-146.
- Biron Ch.A. 1994. Cytokines in the generation of immune response to, and resolution of virus infection. *Curr Opin Immunol* **6**:530-538.
- Biron Ch.A., Gazzinelli R.T. 1995. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol* **7**:485-496.
- Blecha, F. 1988. Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock. *J Anim Sci* **66**:2084-2090.
- Blecha F. 1991. Cytokines: Applications in domestic food animals. *J Dairy Sci* **74**:328-339.
- Blecha F. 2001. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. *Vet Clin North Am Food Anim Proct* **17**:621-6-33.
- Bouma A., De Jong M.D.M., Kimman T.G. 1998. The influence of maternal immunity on the development of the in vitro lymphocyte proliferation response against pseudorabies virus in pigs. *Res Vet Sci* **64**:167-171.
- Brown W.C., Woods V.M., Chitko-Mckown, C.G., Hash S.M., Rice-Ficht A.C. 1994. Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper an unrestricted parasite- specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infect Immun* **62**:4697-4708.
- Brown E.J. 1995. Phagocytosis. *BioEssays* **17**:109-117.
- Busque P., Higgins R., Sénéchal S., Marchand R., Quessy S. 1998. Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. *Med Microbiol* **63**:229-238.
- Butler J.E. 1998. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertorie development in large farm animals. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **17**:43-70.
- Carter J.J., Weinberg A.D., Pollard A., Reeves R., Magnuson J.A., Magnuson N.S. 1989. Inhibition of T-lymphocytes mitogenic responses and effects on cell functions by bovine *herpesvirus 1*. *J Virol* **63**:1525-1530.
- Carter N.P., Ormerod M.G. 2000. Introduction to the principles of flow cytometry. En: *Flow Cytometry*. Ed. Ormerod M.G., Oxford University Press (Oxford, Reino Unido), pp 1-22.
- Cassatella M.A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* **16**:21-26.

- Celada A., Nathan C. 1994. Macrophage activation revisited. *Immunol Today* **14**:100-102.
- Charley B. 1986. Effects of immunopotentiating agents on alveolar macrophage properties. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* **9**:155-159.
- Chen W.F., Zlotnik A. 1991. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* **147**:528-534.
- Chensue S.W., Terebuh D., Remick D.G., Scales W.W., Kunkel S.L. 1991. In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. *Am J Pathol* **138**:395-402.
- Chinsakchai S., Molitor T.W. 1992. Replication and immunosuppressive effects of *Pseudorabies virus* on swine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunophatol* **30**:247-260.
- Comack S., Alkemade S., Rogan D. 1991. Clinical study evaluating a purified mycobacterial cell wall extract for the treatment of equine respiratory disease. *Equine Practice* **13**:8-12.
- Cox W. 1988. Examining the immunologic and hematopoietic properties of an immunostimulant. *Vet Med* **83**:424-428.
- Crujisen T.L.M., Van Leengoed L.A.M.G., Dekker-Nooren T.C.E.M., Shoeffers E.J., Verheijden J.H.M. 1992. Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect Immun* **60**:4867-4871.
- Cummins C.S. 1989. The Coryneform bacteria. En Practical Handbook of Microbiology. **Ed.** William M. O'Leary; CRC Press Inc (Florida, USA); pp 141-149.
- D'Andrea A., Rengaraju M., Valiante N.M., Chehimi J., Kubin M., Aste M., Chan S.H., Kobayashi M., Young D., Nickbarg E. 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* **176**:1387-1398.
- Davies M.E., Horner A., Franz B., Schuberth H.J. 1992. Detection of cytokine activated chondrocytes in arthritic joints from pigs infected with *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Ann Rheum* **51**:978-982.
- Dawes J., Tuach S.J., McBride W.H. 1974. Properties of an antigenic polysaccharide from *Corynebacterium parvum*. *J Bacteriol* **120**:24-30.
- Dean A.G., Dean J.A., Coulombier D., Bendel K.A., Smith D.C., Burton A.H., Dicker R.C., Sullivan K., Fagan R.F., Arner T.G. 1996. EpiInfo, Version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputer. Center for Disease control and prevention. Atlanta. Georgia. USA.

- Deboer D.J., Moriello K.A., Thomas C.B., Schultz K.T. 1990. Evaluation of a commercial staphylococcal bacterin for management of idiopathic recurrent superficial pyoderma in dog. *Am J Vet Res* **51**:636-639.
- Detmers P.A., Powell D.E., Walz A., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Cohn Z.A. 1991. Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocytes adhesion and phagocytosis. *J Immunol* **147**:4211-4217.
- Dinarello Ch.A. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**:1627-1652.
- Ducha J., Marca J., Muñoz J.M., Torras M., Moragrega A. 1996. Cortisol production in stressed pigs. Decrease of levels by the administration of a new immunomodulator: Inmodulen[®]. Proceeding 14th IPVS, Bologna, Italia, pp 386.
- Edwards S. W., Watson F. 1995. The cell biology of phagocytes. *Immunol Today* **16**:508-510.
- Erazo G.P., Marca J., Navarrete E. 2001. Evaluación zootécnica y sanitaria de la administración del inmunoterápico Inmodulen[®] en madres gestantes y lechones neonatos. Resúmenes XXII Symposium ANAPORC. Santiago de Compostela. España, pp 342-345.
- Euzeby J.P. 1993. Le système immunitaire de l'appareil respiratoire du porc: revue bibliographique. *Revue Med Vet* **144**:8-9.
- Evans D.L., Jaso-Friedmann L. 1993. Natural killer (NK) cells in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation. *Vet Res Comm* **17**:429-447.
- Evans D.R., Rollins J.B., Huff G.K., Hartgrove T.B., Van Kampen K.R. 1988. Inactivated *Propionibacterium acnes* (ImmunoRegulin[®]) as adjunct to conventional therapy in the treatment of equine respiratory disease. *Equine Practice* **10**:17-21.
- Favre N., Bordmann G., Rubin W. 1997. Comparison of cytokine measurement using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods* **204**:57-66.
- Fernandez-Botran R., Chilton P. M., Ma Y. 1996. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Adv Immunol* **63**:269-336.
- Fernandez-Botran R., Vetvicka V. 2000. Advanced methods in cellular immunology. CRC press (Boca Ratón, Florida, Estados Unidos).
- Ferro A., Marca J.; Navarrete E.; Stipkovits L. 1999a. Aplicación de Inmodulen en una pira afectada por PRSS para el tratamiento de la disentería Porcina. Resúmenes XX Symposium ANAPORC, Talavera de la Reina, España, pp 199.
- Ferro A., Marca J.; Navarrete E.; Stipkovits L. 1999b. Efecto de la combinación Lincomicina + Inmodulen para el tratamiento de la disentería porcina. Resúmenes XX Symposium ANAPORC, Talavera de la Reina, España, pp 200.

- Flaminio M.J.B.F., Rush B.R., Shuman W. 1998. Immunologic function in horse after non-specific immunostimulant administration. *Vet Immuno Immunopathol* **63**:303-315.
- Flo J., Golmand H., Roux M.E., Massouh E. 1996. Oral administration of bacterial immunomodulator enhances the immune response to cholera toxin. *Vaccine* **14**:1167-1173.
- Foss D.L., Zilliox M.J., Murtaugh M.P. 1999. Differential regulation of macrophages interleukin-1 (IL-1), IL-12, and CD80-CD86 by two bacterial toxins. *Infect Immun* **67**:5275-5281.
- Gallego-Olivella J., Martín-Ruiz J.M., Fadura-Torres E. 1998. Study of the immunostimulating effect of IM-104 in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**:331-333.
- Garside P., Mowat A. McI. 1995. Polarization of Th-cells responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence?. *Immunol Today* **16**:220-223.
- Gialdroni-Grassi G., Grassi C. 1985. Bacterial products as immunomodulating agents. *Int Arch Allergy Appl Immun* **76**:119-127.
- Girard D., Paquin R., Naccache P.H., Beaulieu A.D. 1996. Effects of interleukin-13 on human neutrophils functions. *J. Leukoc Biol* **59**:412-419.
- Goldner M., Himsley H.F., Kormendy A., Skinner M. 1983. Bacterial phagocytosis monitored by fluorescence and extracellular quenching: ingestion and intracellular killing. *Lab Med* **14**:291-294.
- Gonzalez S., Florin A., Roux M.E. 1993. Efectos del inmunomodulador IM-104 sobre la población linfocitaria de la mucosa intestinal de ratas inmunodeficientes. *Inmunología* **12**:59-63.
- Groves T.C., Wilkie B.N., Kenndy B.W., Mallard B.A. 1993. Effect of selection of swine for high and low immune responsiveness of monocyte superoxide anion production and class II MHC antigen expression. *Vet Immunol Immunopathol* **36**:347-358.
- Hachicha M., Rathanaswami P., Naccache P.H., McColl S.R. 1998. Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. *J Immunol* **160**:449-454.
- Hadden J.W. 1993. Immunostimulants. *Immunol Today* **14**:275-280.
- Hann L., Verweij W.R., Holtrop M., Brands R., Van Scharrenburg G.J., Palache A.M., Agsteribbe E., Wilschut J. 2001. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induce IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine* **19**:2898-2907.

- Harding C.V., Song R., Griffin J., France J., Wick M.J., Pfeifer J.D., Geuze H.J. 1995. Processing of bacterial antigens for presentation to class I and MHC-restricted T lymphocytes. *Infect Agents Dis* **4**:1-12.
- Hartmann K., Block A., Ferk G., Beer B., Vollmar A., Lutz H. 1999. Treatment of feline leukemia virus (FeLV) infection. *Vet Microbiol* **69**:111-113.
- Hirt H.M., Becker H., Kirchener H. 1978. Induction of interferon production in mouse spleen cell cultures by *Corinebacterium parvum*. *Cell Immunol* **38**:168-175.
- Hume D.A., Underhill D.M., Sweet M.J., Ozinsky A.O., Liew F.Y., Aderem A. 2001. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol* **2**:11-22.
- Jacobs D.M. 1982. Lypopolisaccharide and the immune response. En: Recent advances in Mucosal Immunology, **Ed.** Shober W., Hansom L.A., Sell K.W.; Flaven press (Nueva York, Estados Unidos); pp 47-55.
- Janeway Ch.A., Travers P., Walport M., Capra J.D. 2001. Immunobiology: the immune system in health and disease. **Ed.** Emma Hunt, Current Biology Publications (Londres, Reino Unido).
- Jensen-Waern M., Johannisson A., Ederoth M., Trowald-Wigh G. 1994. Methods for evaluation of the adhesive and phagocytic capacities of porcine granulocytes. *J Vet Med B* **41**:625-638.
- Joling P., Bianchi A.I.J., Kappe A.L., Zwart R.J. 1994. Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. *Vet Immunol Immunopathol* **40**:105-117.
- Kacskovics I., Sun J., Butler J.E. 1994. Five putative subclasses of swine IgG identified from the cDNA sequences of a single animal. *J Immunol* **153**:3565-3573.
- Karkmann U., Radbruch A., Hölzel V., Scheffold A. 1999. Enzymatic signal amplification for sensitive detection of intracellular antigens by flow citometry. *J Immunol Methods* **230**:113-120.
- Kaufmann, S.H.E. 1996. $\gamma\delta$ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do?. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:2272-2279.
- Keller R., Joller P., Keist R., Binz H., van der Meiden P.H. 1988. Modulation of major histocompatibility complex (MHC) expression by interferons and microbial agents. Independent regulation of MHC class II expression and induction of tumoricidal activity in bone marrow-derived mononuclear phagocytes. *Scand J Immunol* **28**:113-121.

- Kherli M.E., Toth J.A. 1990. Chemically induced immunomodulation in domestic food animals. *Adv Vet Sci Com Med* **35**:103-119.
- Kim P.H., Eckmann L., Lee W.J., Han W., Kagnoff M.F. 1998. Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF-beta 1. *J Immunol* **160**:1198-11203.
- Kimman T.G., Oei-Lie N., Van Zaane D. 1992. Role of memory B-cell response in serum and mucosal fluids on swine for protective immunity against *pseudorabies* virus. *Am J Vet Res* **53**(11):1992-1998.
- Kimman T.G. 1993. Characterization of the *Pseudorabies* virus-specific immunoglobulin M response and evaluation of its diagnostic use in pigs with pre-existing to the virus. *J Clin Microbiol* **31**:2309-2314.
- Kirchner H., Hirt H.M., Becker H., Munk K. 1977. Production of an antiviral factor by murine spleen cells after treatment with *Corynebacterium parvum*. *Cell Immunol* **31**:172-176.
- Kirchner H., Scott M.T., Hirt H.M., Munk K. 1978. Protection of mice against viral infection by *Corynebacterium parvum* and *Bordetella pertussis*. *J Gen Virol* **41**:97-104.
- Kleinschuster S.J., Rapp H.J., Green K.R., Bier J., Van Kampen K. 1981. Efficacy of intratumorally administered mycobacterial cell wall in the treatment of cattle with ocular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **67**:1165-1171.
- Klir J.J., Shahbazian M., Matteri R.L., Fritsche K.L., Becker B.A. 1997. Effects of thermal environment on response to acute peripheral lipopolysaccharide challenge exposure in neonatal pig. *AJVR* **58**:364-369.
- Kniep E.M., Strelow I., Lohmann-Matthes M.L. 1992. The monocyte interleukin-2 receptor light chain: production of cell-associated and soluble interleukin-2 receptor by monocytes. *Immunology* **75**:299-304.
- Knoblock K.F, Canning P.C. 1992. Modulation of *in vitro* porcine natural killer cell activity by recombinant interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-4. *Immunology* **76**:299-304.
- Ko H.L., Roszkowski J., Jeljaszewics J., Pulverer G. 1981. Comparative study on the immunostimulatory potency of different *Propionibacterium* strains. *Med Microbiol Immunol* **170**:1-9.
- Koide W., Ito M., Torigoe S., Ihara T., Kamiya H., Sakurai M. 1998. Activation of lymphocytes by *HHV-6* antigen in normal children and adults. *Viral Immunol* **11**:19-25.

- Lagoo-Deenadaylan S., Lagoo A.S., Barber W.H., Hardy K.J. 1993. A standardized approach to PCR-based semiquantitation of multiple cytokine gene transcripts from cell samples. *Lymphokines Cytokines Res* **12**:59-67.
- Lai K.N., Leung J.C., Lai F.M. 1991. Soluble interleukin-2 receptor release, interleukin-2 production, and interleukin-2 receptor expression in activated T-lymphocytes in vitro. *Pathology* **23**:224-228.
- Lan H.C, Chamber M.A., Ferguson J.A., Srivastava K.K., Reddy P.G. 1996. Effect of bovine *herpesvirus-1* on expression of interleukin-2 receptors and effect of interleukin-12 on lymphocyte proliferation. *Vet Microbiol* **49**:59-66.
- Lunney J.K. 1998. Cytokines orchestrating the immune response. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **17**:84-94.
- MacNeil I.A., Suda T., Moore K.W., Mosmann T.R., Zlotnik A. 1990. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* **15**:4167-4173.
- MacPherson M., Moller S.G. 2000. PCR. **Ed.** Basche A., BIOS Scientific publishers Ltd, (Oxford, Reino Unido), pp 1-19.
- Maino V., Picker L.J. 1998. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* **34**:207-215.
- Mantovani A., Bussolino F., Introna M. 1997. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* **18**:251-240.
- Marca J., Caldentey L., Torras M., Irrure P. 1996. Efficacy of Inmodulen[®] in pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proceeding 14th IPVS, Bologna, Italia, pp 387.
- Marino M.W., Dunn A., Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.J. 1997. Characterization on tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* **94**:8093-8098.
- Markowska-Daniel I., Pejsak S., Szmigielski S., Jeljaszewics J., Pulverer G. 1992a. Adjuvant properties of *Propionibacterium avidum* kp-40 in vaccination against endemic viral and bacterial infections I. Swine immunized with live attenuated Aujeszky's disease virus vaccine and experimental infected with virulent viruses. *Zbl Bakt* **277**:529-537.
- Markowska-Daniel I., Pejsak S., Szmigielski S., Jeljaszewics J., Pulverer G. 1992b. Stimulation of granulopoiesis in pregnant swine and their offspring by *Propionibacterium avidum* KP-40. *Br Vet J* **148**:133-145.
- Markowska-Daniel I., Pejsak S., Szmigielski S., Jeljaszewics J., Pulverer G. 1993a. Prophylactic application of *Propionibacterium avidum* kp-40 in swine with acute experimental infections I. Viral infection-Aujeszky's disease and classical swine fever. *Dtsch Tierärztl Wschr* **100**:129-168.

- Markowska-Daniel I., Pejsak S., Szmigielski S., Jeljaszewics J., Pulverer G. 1993b. Prophylactic application of *Propionibacterium avidum* kp-40 in swine with acute experimental infections II. Bacterial infections: Pleuropneumonia and swine erysipelas. *Dtsch tierärztl Wschr* **100**:169-208.
- Marshall N.E., Ziegler H.K. 1989. Role of lipopolysaccharide in induction of Ia expression during infection with gram-negative bacteria. *Infect Immun* **57**:1556-1560.
- Martin S., Wardley R.C. 1986. Functional antibody response in pigs vaccinated with live and inactivated Aujeszky's disease virus. *Res Vet Sci* **41**:331-342.
- Matsui K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Hyodo Y., Hayashi N., Horishi K., Kawada N., Okamura H., Nakanishi K., Higashino K. 1997. *Propionibacterium acnes* treatment diminishes CD4+NK1.1+T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from kupffer cells. *J Immunol* **159**:97-106.
- Mollinedo F., Borregaard N., Boxer L.A. 1999. Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol Today* **20**:535-537.
- Mori H., Mihara M., Uesugi Y., Nagai H., Koda. 1994. Mechanism for macrophages activation against *Corynebacterium parvum*--participation of T cells and this its lymphokines. *Microbiol Immunol* **38**:983-988.
- Moskov M., Schiwatschewa T., Boney S. 1969. Comparative histological study of lymph nodes in mammals lymph nodes of the dolphin. *Anat Anz* **124**:49-67.
- Mulcahy G., Quinn P.J. 1986. A review of immunomodulators and their applications in veterinary medicine *J. Vet Pharmacol Therapy* **9**:119-139.
- Murtaugh M.P. 1994. Porcine cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* **43**:37-44.
- Musso T., Calosso L., Zucca M., Millesimo M., Puliti M., Bulfone-Paus S., Merlino Ch., Savoia D., Caballo R., Ponzi A.N., Badolato R. 1998. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect Immun* **66**:2640-2647.
- Napiwotzki J., Becker A., Damian M.S. 1995. Primer desing (primer 0,5) v.1.10. En <http://www.chemie.uni-marburg.d/~becker/pdhome.html>.
- Nelson B.H., Willerford D.M. 1998. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunology* **70**:1-81.
- Norimatsu M., Ono T., Aoki A., Ohishi K., Takahashi T., Watanabe G., Taya K., Sasamoto S., Tamura Y. 1995. Lipopolysaccharide-induced apoptosis in swine lymphocytes in vivo. *Infect Immu* **63**: 1122-1126.

- Ober B.T., Summerfield A., Mattlinger Ch., Wiesmüller K.H., Jung G., Pfaff E., Saalmüller A., Rziha H.J. 1998. Vaccine-induced, *Pseudorabies* virus-specific: extrathymic CD4⁺CD8⁺ memory T-helper cells in swine. *J Virol* **72**:4866-4873.
- O'Garra A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**:275-283.
- Okamura H., Kawaguchi K., Shoji K., Kawade Y. 1982. High-level induction of gamma interferon with various mitogens in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *Infect Immun* **38**:440-443.
- Okamura H., Wada M., Nagata K., Tamura T., Shoji K. 1987. Induction of murine gamma interferon production by lipopolysaccharide and interleukin-2 in *Propionibacterium acnes*-induced peritoneal exudates cells. *Infect Immun* **55**:335-341.
- Ortiz J.M., Velasco F., Dominguez J., Alvarez B., Marca J., Irrure P., Caldentey L. 1996. Niveles de IgA en el calostro de cerdas tratadas con Inmodulen®. Resúmenes XVII Symposium ANAPORC. Santiago de Compostela, España, pp 138.
- Pang G., Couch L., Batey R., Clancy R., Cripps A. 1994. GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin. Exp. Immunol.* **96**:437-443.
- Pell J.M. 1995. Principles of immunomodulation. *Livest Prod Sci* **42**:123-133.
- Pescovitz M.D. 1998. Immunology of the pig. En: Handbook of vertebrate immunology. **Ed.** Pastoret P.P., Griebel P., Bazin H., Govaerts A., Academic press (San Diego, California, Estados Unidos), pp 373-419.
- Pistoia V. 1997. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* **18**:343-350.
- Pretolani M., Goldman M. 1997. IL-10: a potential therapy for allergic inflammation?. *Immunol Today* **18**:277-280.
- Quinn P.J. 1990. Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine *Adv Vet Sci Com Med* **35**:43-99.
- Rebollo A., Gomez J., Martinez-A C. 1996. Lessons from immunological, biochemical and molecular pathways of the activation mediated by IL-2 and IL-4. *Adv Immunol* **63**:127-196.
- Reddy P.G., Frey R.A. 1990. Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. *Adv Vet Sci Com Med* **35**:255-281.

- Reddy N.R., Borgs P., Wilkie B.N. 2000. Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* **74**:31-46.
- Reinard P., Riollet C., Poutrel B., Paape M.J. 2000. Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by bovine neutrophils after priming by tumor necrosis factor- α and the des-arginine derivative of C5a. *AJVR* **61**:951-959.
- Richards C.D., Rafferty J.A., Reynolds J.J., Saklatvala J. 1991. Porcine collagenase from synovial fibroblasts: cDNA sequence and modulation of expression of RNA in vitro by various cytokines. *Matrix* **11**:161-167.
- Roitt I., Brostoff J., Male D. 2001. Immunology. **Ed.** Roitt, Brostoff, Male; Mosby Cop.; (Edinburgh, Reino Unido).
- Romagnani S. 1992. Induction of T_H1 and T_H2 responses: a key role for the 'natural' immune response?. *Immunol Today* **13**:379-381.
- Romagnani S. 1996. Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends Microbiol* **4**:470-473.
- Romagnani S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* **18**:263-266.
- Rossol S., Voth R., Brunner S., Muller W.E., Buttner M., Gallati H., Meyer zum Buschenfelde K.H., Hess G. 1990. *Corynebacterium parvum* (*Propionibacterium acnes*): an inducer of tumor necrosis factor-alpha in human peripheral blood mononuclear cells and monocytes in vitro. *Eur J Immunol* **20**:1761-1765.
- Roszkowski W., Szmigielski S., Ko H.L., Janiak M., Wrembel J.K.; Pulverer G., Jeljaszewicz J. 1980. Effect of three strains of *Propionibacteria* (*P. Granulosum*, *P. avidum*, *P. Acnes*) and cell-wall preparations on lymphocytes and macrophages. *Zbl Bakt Hyg* **246**:393-404.
- Roszkowski W., Roszkowski K., Ko H.L., Beuth J., Jeljaszewicz J. 1990. Immunomodulation by *Propionibacteria*. *Zbl Bakt* **274**:289-298.
- Roth J.A. 1999. The immune system. En: Disease of swine. **Ed.** Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D. J., Iowa State University press (Ames, Iowa, Estados Unidos), pp 799-820
- Rottman J.B., Tompkins W.A.F., Tompkins M.B. 1996. A reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals. *Vet Pathol* **33**:242-248.
- Rumyantsev S.N. 1998. Constitutional and non-specific immunity to infection. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **17**:25-42.

- Saalmüller A. 1996. Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. *Immunol. Today* **17**:352-353.
- Saalmüller A. 1998. Antigen-specific immune response of porcine T lymphocytes to various pathogens. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **17**: 71-83.
- Saklatvala J., Sarsfield S.J., Townsend Y. 1985. Pig interleukin 1. Purification of two immunologically different leukocyte proteins that cause cartilage reabsorption, lymphocyte activation, and fever. *J Exp Med* **162**:1208-1222.
- Scamurra R.W., Arriaga C., Sprunger L., Baarsch M.J., Murtaugh M.P. 1996. Regulation of interleukin-6 expression in porcine immune cells. *J Interferon Cytokine Res* **16**:289-296.
- Scheibenbogen C., Keilholz U., Richter M., Adreesen R., Hunstein W. 1992. The interleukin-2 receptor in human monocytes and macrophages: regulation of expression and release of the alpha and beta chains (p55 and p75). *Res Immunol* **143**:33-37.
- Schijns V.E.C.J., Haagmans B.L., Horzinek M.C. 1995. IL-12 stimulates an antiviral type 1 cytokine response but lacks adjuvant activity in IFN- γ -receptor-deficient mice. *J Immunol* **155**:2525-2532.
- Scott P. 1993a. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* **260**:496-497.
- Scott P. 1993b. Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets . *Curr Opin Immunol* **5**:391-397.
- Sereti I., Gea-Banacloche J., Kan M.Y., Hallahan C.W., Lane H.C. 2000. Interleukin-2 leads to dose-dependent expression of alpha chain of the IL-2 receptor on CD25-negative T lymphocytes in the absence of exogenous antigenic stimulation. *Clin Immunol* **97**:266-276.
- Singh J., Sidhu S.S., Dhaliwal G.S., Pangoankar G.R., Nanda A.S., Grewal A.S. 2000. Effectiveness of lipopolisaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim Reprod Sci* **59**:159-166.
- Sisquella L. 2000. Estudio de un inmunomodulador en aves. Tesis para título de Doctor. Departament de Fisiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
- Smith K.A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**:1169-1176.
- Solbach W., Moll H., Röllinghoff M. 1991. Lymphocytes play the music but the macrophages calls the tune. *Immuno Today* **12**:4-6.
- Stabel T.J., Fredorka-Cray P.J., Gray J.T. 1995. Tumor necrosis factor- α production in swine after oral or respiratory challenge exposure with live *Salmonella typhimurim* or *Salmonella choleraesuis*. *Am J Vet Res* **56**:1012-1018.

- Stipkovits L., Imre O., Marca J., Tarés J. 1998. Comparative effect of Inmodulen® face to conventional antibiotherapy against Enzootic Pneumonia. Proceeding 15th IPVS, Birmingham, Reino Unido., pp 291.
- Sugiyama M., Epstein L.B. 1978. Effect of *Corynebacterium parvum* on human T-lymphocyte interferon production and T-lymphocyte proliferation in vitro. *Cancer Res* **38**:4467-4473.
- Sunwoo H.H., Nakano T., Dixon W.T., Sim J.S. 1996. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Poult Sci* **75**: 342-345.
- Szmigielski S., Kobus M., Gil J., Jeljaszewicz J., Pulverer G. 1980. Protection and therapy of mice with acute and chronic experimental virus infections with *Propionibacterium granulosum* kp-45. *Zbl Bakt* **248**:286-295.
- Takamatsu H., Denyer M.S., Wileman T. 2001 A subpopulation of circulating porcine $\gamma\delta$ T-cells are professional antigen presenting cells. Proceeding 6th IVIS. Uppsala. Sweden. Pp 29.
- Taylor G.R. 1993. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. En: PCR: a practical approach. **Ed.** McPherson M.J., Quirk P., Taylor G.R.; IRL press (Londres, Reino Unido), pp 1-14.
- Thompson-Snipes L., Dhar V., Bond M.W., Mosmann T.R., Moore K.W., Rennick D.M. 1991. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* **173**:507-510.
- Thrusfield M. 1995. Veterinary Epidemiology. **Ed.** Blackwell Science Inc, (Malden, MA, Estados Unidos), pp 266-267.
- Tizard I.R. 2000. Veterinary Immunology: an introduction. **Ed.** B Saunders Company; (Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos).
- Toma, M.E., Shibley G.P. 1992. Aujeszky Disease. En: Manual of standards for diagnostic test and vaccine. **Ed.** Commission of the Office International Des Epizooties (Paris, Francia), pp 158-167.
- Trinchieri G. 1993. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* **14**:335-338.
- Trinchieri G., Scott P. 1994. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol Today* **15**:460-463.
- Trinchieri G. 1998. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* **70**:83-240.

- Tyler J.A., Benton H.P. 1988. Synthesis of type II collagen is decreased in cartilage cultured with interleukin 1 while the rate of intracellular degradation remains unchanged. *Coll Relat Res* **8**:393-405.
- Vaiman M. 1988. Histocompatibility systems in pigs. *Prog Vet Microbiol Immun* **4**:108-133.
- Vaiman M., Chardon P., Rothschild M.F. 1998. Porcine major histocompatibility complex. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **17**: 95-107.
- Van Der Verg, L.L., Hartman A.B., Bhattacharjee A.K., Tall B.D., Yuan L., Sasala K., Hadfield T.L., Zollinger W.D., Hoover D.L., Warren R.L. 1996. Outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* as a mucosal adjuvant for lipopolysaccharide of *Brucella melitensis* in mouse and guinea pig intranasal immunization models. *Infect Immun* **64**:5263-5268.
- Van Kampen K.R. 1997. Immunotherapy and cytokines. *Sem Vet Med Surg* **12**:186-192.
- Van Oirschot J.T. 1987. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: comparison with one or two doses of attenuated vaccines in pigs with high maternal antibody titres. *Res Vet Sci* **42**:12-16.
- Van Parijs L., Biuckians A., Ibragimov A., Alt F.W., Willerford D.M., Abbas A.K. 1997. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *J Immunol* **158**:3738-3745.
- Van Zaane D., Hulst M.M. 1987. Monoclonal antibodies against porcine immunoglobulin isotypes. *Vet Immunol Immunopathol* **16**:23-36.
- Verfaillie T., Cox E., To L.T., Vanrompay D., Bouchaut H., Buys N., Goddeeris B.M. 2001. Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. *Vet Immunol Immunopathol* **81**:97-112.
- Verhasselt V., Buelens C., Willems F., De Groote D., Haeffner-Cavaillon N., Goldman M. 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and expression of coestimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol* **158**:2919-2925.
- Verma J.N., Rao M., Amelem S., Krzych U., Alving C.R., Green S.J., Wassef N.M. 1992. Adjuvant effects of liposomes containing lipid A: enhancement of liposomal antigen presentation and recruitment of macrophages. *Infect Immun* **60**:2438-2444.
- Verweij W.R., Haan L., Holtrop M., Agsteribbe E., Brands R., Van Scharrenburg G.J.M., Wilschut J. 1998. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA response in mice by intranasal immunization with *influenza virus* surface antigen. *Vaccine* **16**:2069-2076.

- Vockerodt M., Tesh H., Kube D. 2001. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 activates CD25 expression in lymphoma cells involving the kappa pathway. *Genes Immun* **2**:433-441.
- Wang F.I., Pang V.F., Hahn E.C. 1988. Flow cytometric analysis of porcine peripheral blood leukocytes infected with *pseudorabies virus*. *J Leukoc Biol* **43**:256-264.
- Webel D.M., Finck B.M., Baker D.H., Johnson R.W. 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J Anim. Sci* **75**:1514-1520.
- Williams P.P. 1978. Collection and cultivation of and phagocytosis by pulmonary macrophages obtained from hysterectomy-derived pigs. *Am J Vet Res* **39**:485-489.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lasavre P., Halbwachs-Mecarelli L. 2000. Neutrophils: molecule, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**:617-653.
- Wood J.A., Ceddia M.A., Kozak C., Wolters B.W. 1997. Effects of exercise on the macrophage MHC-II response to inflammation. *Int J Sport Med* **18**:483-488.
- Yang H., Parkhouse R.M.E. 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* **89**:76-83.
- Zabala C., Lipsky P.E. 1982. Immunomodulatory effects of bacterial lipopolysaccharide on human B lymphocyte activation in vitro. *J Immunol* **129**(6):2496-2502
- Zhou Y., Lin G., Baarsch M.J., Scamurra, R.W., Murtaugh M.P. 1994. Interleukin-4 suppresses inflammatory cytokine gene transcription in porcine macrophages. *J Leukoc Biol* **56**:507-513.
- Zuckermann F.A., Husmann R.J. 1996. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T-cells. *Immunology* **85**:500-512.
- Zuckermann F.A. 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol* **72**:55-66.

IX. RESUMEN

La inmunomodulación se define como la modificación de la respuesta inmune por medio de la administración de sustancias que poseen la capacidad de regular el sistema inmunitario. INMD es un inmunomodulador compuesto por una combinación de LPS detoxificado de *E. coli* y células inactivadas de *Propionibacterium granulosum*, que ha demostrado tener un efecto modulador sobre el sistema inmune del cerdo. En el presente trabajo hemos realizado diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de evaluar los efectos que produce este compuesto sobre el sistema inmune del porcino.

Se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la acción de INMD o sus componentes por separado sobre la producción o expresión de citoquinas en macrófagos alveolares y células mononucleares de sangre periférica, la activación de la fagocitosis en neutrófilos polimorfonucleares, la activación de linfocitos a través del estudio del receptor para IL-2 (CD25) y la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo-II (MHC-II) en macrófagos alveolares. Con relación a la expresión de citoquinas, pudimos observar que los macrófagos alveolares expresaron IL-1, IL6, IL-12 y produjeron TNF- α , pero no se detectó IL-10, mientras las células mononucleares de sangre periférica expresaron IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 y produjeron INF- γ .

En el estudio de efecto de INMD sobre la fagocitosis, observamos que se incrementó la capacidad fagocitaria de los neutrófilos polimorfonucleares produciendo un aumento del número de células que se activaron y fagocitaron más que un incremento de la fagocitosis individual. Este efecto estuvo correlacionado con *P. granulosum*. Así mismo, observamos que INMD y sus componentes por separado indujeron la expresión de MHC-II por parte macrófagos alveolares, tanto en aquellos que fueron infectados con el virus de la enfermedad de Aujeszky como en las células que no lo estuvieron. Para CD25, observamos que INMD y sus componentes por separado fueron capaces de inducir la expresión de esta molécula, lo cual nos indica que se produjo la activación de las células mononucleares de sangre periférica. En este caso, la máxima expresión de CD25 se observó con INMD tanto en células infectadas con el virus de la enfermedad de Aujeszky como en aquellas no infectadas.

Se realizaron dos pruebas in vivo. En la primera de ellas se evaluó el efecto de la administración de INMD utilizado como coadyuvante a la vacunación contra el virus de la enfermedad de Aujeszky. Con este propósito se utilizaron 85 cerdos convencionales divididos en dos grupos (grupo A= 43 y grupo B= 42), que fueron vacunados dos veces contra el virus de la enfermedad de Aujeszky. El grupo B recibió simultáneamente con la primera dosis vacunal, una dosis intramuscular de INMD correspondiente a 20 µg/ml de LPS y 250 µg/ml de *P. granulosum*. Se realizaron tres sangrados a los animales, antes de la primera vacunación y la revacunación, y cinco semanas posteriores a esta. Los sueros fueron analizados para determinar la presencia de gE y gB del virus de la enfermedad de Aujeszky, inmunoglobulinas totales (IgG1, IgG2), inmunoglobulinas específicas (IgA, IgG1, IgG2) para el virus de la enfermedad de Aujeszky, linfoproliferación y títulos neutralizantes frente al virus de la enfermedad de Aujeszky.

Al inicio del estudio, el 97,6% de los animales del grupo A y 100% del grupo B, presentaban anticuerpos frente gB, mientras que el 11,6% y 19% de los animales de los grupo A y B, respectivamente, presentaban anticuerpos frente a gE, todos de origen maternal. Al final del ensayo, el 96,4% de los cerdos del grupo A y el 87,1% del grupo B eran gB+ y ninguno presentó anticuerpos frente a gE. Por su parte tras la primera vacunación y la aplicación de INMD, los animales del grupo B presentaron niveles totales de IgG1 e IgG2 superiores que los animales del grupo A ($p < 0,01$), diferencias que desaparecieron tras la vacunación. Si bien entre estos isotipos se observó la misma tendencia cuando se evaluaron los anticuerpos específicos frente al virus de la enfermedad de Aujeszky, esta diferencia no fue significativa. Con relación a las IgA, se observó que tras la revacunación el 38,48% de los animales del grupo B presentaban títulos $\leq 1:40$, mientras que en el grupo A se observaron estos títulos en el 14,81% de los cerdos ($p < 0,01$). En los ensayos de linfoproliferación no se observaron diferencias significativas entre grupos.

En cuanto a los títulos de anticuerpos neutralizantes, se observó una respuesta humoral primaria superior en el grupo B con respecto al grupo A ($p < 0,005$), diferencia que desapareció tras la revacunación. Así mismo, en la respuesta primaria el 56,7% de los cerdos del grupo A presentaban títulos $\leq 1:4$, mientras que entre el grupo B el 25,6% de los animales presentaban este comportamiento ($p < 0,05$).

En un segundo ensayo realizado *in vivo*, se evaluaron los efectos adversos que pudieran ocasionar la aplicación de INMD a una dosis superior a la recomendada. Para esto se utilizaron ocho cerdos de alta sanidad que se dividieron en tres grupos. Los animales del grupo A fueron inyectados intramuscularmente con una dosis de INMD correspondiente a 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de LPS y 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de *P. granulosum*, mientras los del grupo B recibieron 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de LPS y 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ P.V. de *P. granulosum*. Por su parte, a los animales del grupo C se les administró solución salina estéril. Todos los animales fueron sangrados para determinar los niveles de TNF- α a las 0, 1, 2, 4, 6 y 24 horas, realizándose en cada uno de estos tiempos la medición de la temperatura corporal. Ninguno de los animales presentó signos clínicos relacionados con la aplicación de LPS y la liberación de niveles altos de citoquinas.

De estos resultados podemos concluir que INMD ejerce su acción sobre el sistema inmunitario induciendo la expresión de citoquinas, incrementando la capacidad fagocítica de los PMN y estimulando la expresión de MHC-II y CD25. Estos efectos pueden contribuir sustancialmente al mejoramiento del proceso de respuesta inmune del cerdo en enfermedades y vacunaciones.

X. SUMMARY

Immunomodulation is defined as the modification of the immune response by means of the administration of substances that possess the ability to regulate the immune system. INMD is an immunomodulator composed by a combination of a detoxified LPS of *E. coli* and inactivated cells of *Propionibacterium granulosum* that has demonstrated to have a modulatory effect on the immune system of the pig. In the present study we have done several *in vitro* and *in vivo* assays with the objective of evaluate the effects that this compound produces in some components of the immune system in pigs.

In vitro assays were made to determine the action of INMD and their components on the cytokine production or expression in alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells, the activation of phagocytosis in polymorphonuclear neutrophils, the activation of lymphocytes through the study of the IL-2 receptor (CD25) and the expression of the major histocompatibility complex class-II (MHC-II) in alveolar macrophages. Regarding the cytokine expression, it could be observed that alveolar macrophages expressed IL-1, IL-6, IL-12 and produced TNF- α , but not IL-10, while the peripheral blood mononuclear cells expressed IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 and produced INF- γ in response to INMD stimulation.

When the effect of INMD on the phagocytosis exerted by PMN was studied, we observed that the phagocytosis capability of these cells increased. This phenomenon was attributable more to an increase in the number of activated cells than to an increase of individual phagocytic ability. This effect was correlated with *P. granulosum*. Likewise, we observed that INMD and its separated components induced the expression of MHC-II in alveolar macrophages. Thus as well in cells infected with Aujeszky's disease virus as in those that were not. Regarding CD25, we observed that INMD and its components by themselves alone were able to induce the expression of this molecule, a fact indicates the activation of the peripheral blood mononuclear cells. In this case, the maximum expression of CD25 was observed with INMD both in Aujeszky's disease virus infected cells as well as in uninfected ones.

Two *in vivo* experiments were made. The first one of them the effect of the administration of INMD was evaluated using this product as a coadjuvant to the vaccination against the Aujeszky's disease virus. With this purpose, eighty-five 8-10-weeks-old crossbred conventional pigs were randomly distributed in two groups (group A = 43 and group B = 42), that were vaccinated two times against the Aujeszky's disease virus. Group B animals received simultaneously with the first vaccine dose, an intramuscular dose of INMD equal to 20 µg/ml of LPS and 250 µg/ml of *P. granulosum*. Blood was collected from all 85 animals before the first vaccination, before the booster and five weeks after the booster. Sera were analysed to determine the presence of Aujeszky's disease virus anti-gE and anti-gB antibodies, total immunoglobulin load (IgG1, IgG2) and Aujeszky's disease virus specific immunoglobulins (IgA, IgG1, IgG2). Lymphoproliferation assays and virus seroneutralization test for Aujeszky's disease virus were also done.

Before the first vaccination, 97.6% of pigs in group A and 100% in group B presented anti-gB antibodies, while 11.6% and 19% were seropositive against gE respectively. At the end of the trial, 96.4 % of group A pigs and 87.1% of the animal in group B were gB+ and none of them had anti-gE antibodies. Regarding levels of total immunoglobulins, after the first vaccination group B pigs had higher levels of IgG1 and IgG2 ($p < 0,01$) but these differences disappeared after the second vaccination. When evaluated Aujeszky's disease virus specific antibodies, were not different between groups, except for IgA. In this case, we observed that after the revaccination, 38.48% of animals in group B presented titres $\leq 1:40$, while in group A this was observed in the 14.81% of the pigs ($p < 0,01$). In lymphoproliferation assays, significant differences between groups were not observed.

Regarding the virus-neutralizing antibodies, we observed higher titres in the group B animals after de first vaccination ($p < 0,005$), differences that disappeared after the booster. Thus after the first vaccination, 56.7% of pigs in group A had titres $\leq 1:4$, while thus was observed only in 25.6% of the animals in group B ($p < 0,05$).

In a second *in vivo* assay, the adverse effects that could cause the application of INMD were evaluated. With this aim, eight pigs were distributed in three groups. Animals of group A were injected intramuscularly with a dose of INMD corresponding to 1.2 µg/kg of body

weight of LPS and 16 µg/ml of body weight of *P. granulosum*, while those in group B received 2.6 µg/kg of body weight of LPS and 33 µg/kg of body weight of *P. granulosum*. Animals in group C received similar volume of sterile saline solution. All the animals were bled to determine the levels of TNF-α to the 0, 1, 2, 4, 6 and 24 hours, taking in each one of these times the body temperature. None of the animals had evident adverse effects for LPS or produced by high levels of cytokine.

From those results it could conclude that INMD exerts its action on the immune system at least indicating cytokine expression, enhancing phagocytosis capabilities of PMNS and enhancing also the expression on MHC-II and CD25. These effects can contribute substantially improvement of the immune response of pigs in disease state or in vaccination.

XI. ANEXO

Tabla 10. Principales citoquinas

Citoquina	Origen	Diana	Función
IL-3	Linfocitos T. Células NK. Monocitos. Queratinocitos. Mastocitos. Cels. Endoteliales.	Macrófagos. Eosinófilos. Megacariocitos. Basófilos. Cels. Precursoras. Mastocitos.	Factor de crecimiento celular. Proliferación y desarrollo de células precursoras. Incremento de la expresión de receptores para CSF. Estimulación y quimiotaxis de eosinófilos. Proliferación de mastocitos. Incremento de fagocitosis en macrófagos. Inhibe expresión de MHC-II en mastocitos. Induce la expresión de receptores de C3a de complemento en basófilos. Estimula la proliferación de Queratinocitos.
IL-5	Linfocitos T.	Células B. Eosinófilos. Células hematopoyéticas.	Factor de crecimiento de precursores hematopoyéticos. Crecimiento y proliferación de eosinófilos. Promueve la generación de linfocitos Tc Induce la expresión de receptores para IL-2. Activación y diferenciación de células B. Estimula producción y secreción de IgM e IgA.
IL-7	Cels. Estromales, timo y médula ósea. Queratinocitos.	Células B inmaduras. Linfocitos T. Macrófagos. Timocitos.	Proliferación de linfocitos B. Maduración de magacariocitos. Proliferación de células T. Proliferación de timocitos. Producción de IL-1, IL-6 y MIP por parte de monocitos. Producción de IL-3 y GM-CSF por células T. Inhibición de la expresión de TGF- β por macrófagos.
IL-8	Monocitos. Linfocitos. Macrófagos. Fibroblastos. Cels. Endoteliales. Queratinocitos. Melanocitos. Hepatocitos. Condrocitos.	Linfocitos T. Neutrófilos.	Activación de neutrófilos. Quimiotaxis. Inflamación.

IL-9	Linfocitos T.	Linfocitos T. Cels. precursoras. Células B	Proliferación de linfocitos Th. Potencia producción de IgG, IgM e IgE. Diferenciación de células precursoras.
IL-11	Linfocitos T. Fibroblastos. Cels. Mesenquimales.	Células B. Megacariocitos.	Modula reacción antígeno-anticuerpo. Promueve producción de IL-6. Estimula las células B. Estimula los megacariocitos. Induce síntesis de proteínas de fase aguda.
IL-13	Linfocitos Th, Th1 y Th2.	Células B. Monocitos. Macrófagos.	Modula la actividad de macrófagos. Reduce producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8) en respuesta a INF- γ ó LPS. Proliferación y diferenciación de células B. Proliferación de monocitos. Induce producción de IgM, IgG, IgE. Reduce el efecto pirógeno de IL-1 ó TNF.
IL-14	Linfocitos T. Linfocitos B.	Células B.	Proliferación y diferenciación células B.
IL-15	Linfocitos T.	Linfocitos T. Linfocitos Th. Mastocitos.	Proliferación de linfocitos T. Generación de células citolíticas. Maduración células NK. Proliferación mastocitos. Inhibición de apoptosis.
IL-16	Linfocitos Tc.	Linfocitos T. Linfocitos Th. Monocitos. Eosinófilos.	Expresión de receptores para IL-2 en linfocitos T. Estimula migración de linfocitos Th, monocitos y eosinófilos.
IL-17	Linfocitos Th.	Fibroblastos. Cels. epiteliales. Células endoteliales. Fibroblastos.	Incremento de la expresión de la molécula de adhesión-1 (ICAM-1) en fibroblastos. Estímulo secreción de IL-6, IL-8, G-CSF y PgE2.
IL-18	Macrófagos. Cels. de Kupffer.	Linfocitos T. Cels. NK.	Inducción de producción de INF- γ . Proliferación de linfocitos T. Activación de NK. Producción de GM-CSF. Inhibición de producción de IL-10. Incremento de producción de IL-2.
INF-α	Macrófagos. Monocitos. Fibroblastos. Cels. linfoblastoides.	Linfocitos T. Células B. Células NK.	Acción antivírica. Inhibe proliferación de células T y B. Estimula células NK.
INF-β	Leucocitos. Cels. epiteliales. Fibroblastos.	Linfocitos T. Células B. Monocitos.	Acción antivírica. Incremento de expresión de MHC-I. Bloqueo de la expresión de MHC-II. Estimula células NK.
INF-δ	Trofectodermo.		Actividad antivírica
INF-ω	Leucocitos.		Desconocida.

INF-tau (Trofoblasto proteína-1, Interferon corto porcino tipo-1, Trofoblasto-interferon)	Trofoblasto.		Reconocimiento maternal. Establecimiento de la preñez. Supresión de receptores de oxitocina en útero. Antiluteolítico. Previene la acción inmunológica maternal sobre el embrión. Efecto antiviral. Activación de células NK. Efecto antiproliferativo e inmunosupresor.
TNF-β	Linfocitos T. Leucocitos. Fibroblastos. Astrocitos. Cels. del melioma. Cels. endoteliales. Cels. epiteliales.	Monocitos. Linfocitos B. Neutrófilos. Fibroblastos.	Induce síntesis de GM-CSF, G-CSF e IL-1. Citólítico ó citostático de células tumorales. Proliferación células B. Quimiotaxis. Aumenta la fagocitosis. Proliferación de fibroblastos.
GM-CSF	Linfocitos T. Macrófagos. Cels. endoteliales. Fibroblastos. Mastocitos. Células B	Macrófagos. Granulocitos. Neutrófilos. Eosinófilos. Monocitos. Cels. endoteliales. Cels. mieloides. Cels. Precursoras.	Inducción de células precursoras de macrófagos y granulocitos. Quimiotaxis. Incremento de fagocitosis, metabolismo oxidativo y actividad antimicrobiana de neutrófilos y macrófagos. Proliferación de neutrófilos, macrófagos y monocitos.
TGF-α	Macrófagos. Hepatocitos. Queratinocitos. Plaquetas.	Cels. precursoras. Cels. endoteliales. Tejido hepático.	Control del desarrollo epidermal durante la gestación. Regeneración de tejido hepático. Proliferación de precursores hematopoyéticos. Proliferación de cels. endoteliales
TGF-β	Hepatocitos. Macrófagos. Linfocitos. Cels. endoteliales. Queratinocitos. Cels. de la granulosa. Condrocitos. Células B.	Cels. endoteliales. Cels. precursoras. Cels. epiteliales. Fibroblastos.	Inhibidor de crecimiento de cels. epiteliales, endoteliales, fibroblastos, neuronales, linfoides, hematopoyéticas, hepatocitos, queratinocitos. Inhibe proliferación y crecimiento de linfocitos T, NK y macrófagos. Inhibe síntesis de GM-CSF e IL-3. Inhibe maduración de células B.