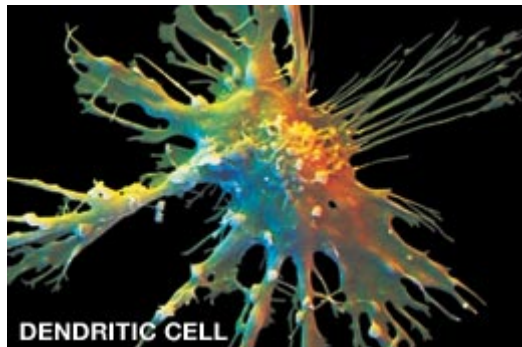


Inmunomodulación. Una opción terapéutica en patología porcina



Dr. Lorenzo Fraile
Investigador del CReSA

Presentación

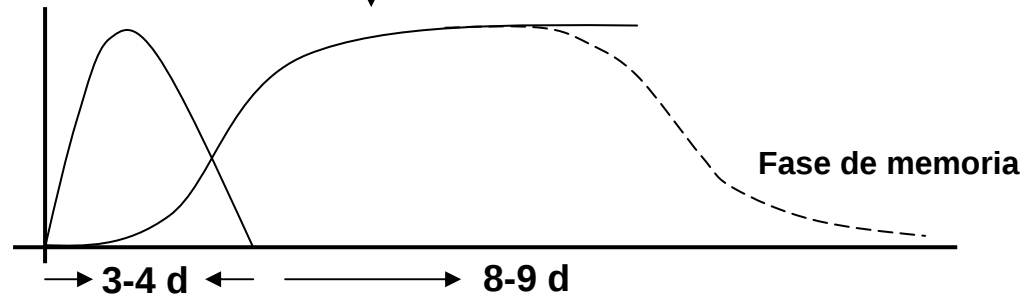
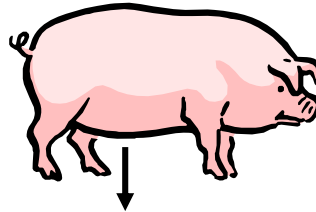
- Introducción. Conceptos básicos de inmunología.
- Inmunomodulación. Opciones en veterinaria.
- Complejo respiratorio porcino. Modelo para la utilización de inmunomoduladores.
- Investigaciones realizadas con Inmunicín MAYMO (IM).

Introducción

Conceptos básicos de inmunología

Introducción

Infección o exposición a material “extraño” (Ag)



Inmunidad innata (no específica)

Células

Macrófagos/DC (presentación de antígeno)
Granulocitos
Células NK

Immunoefector/
modulador

Defensinas
Colectinas
Complemento.

Inmunidad adquirida o adaptativa (específica)

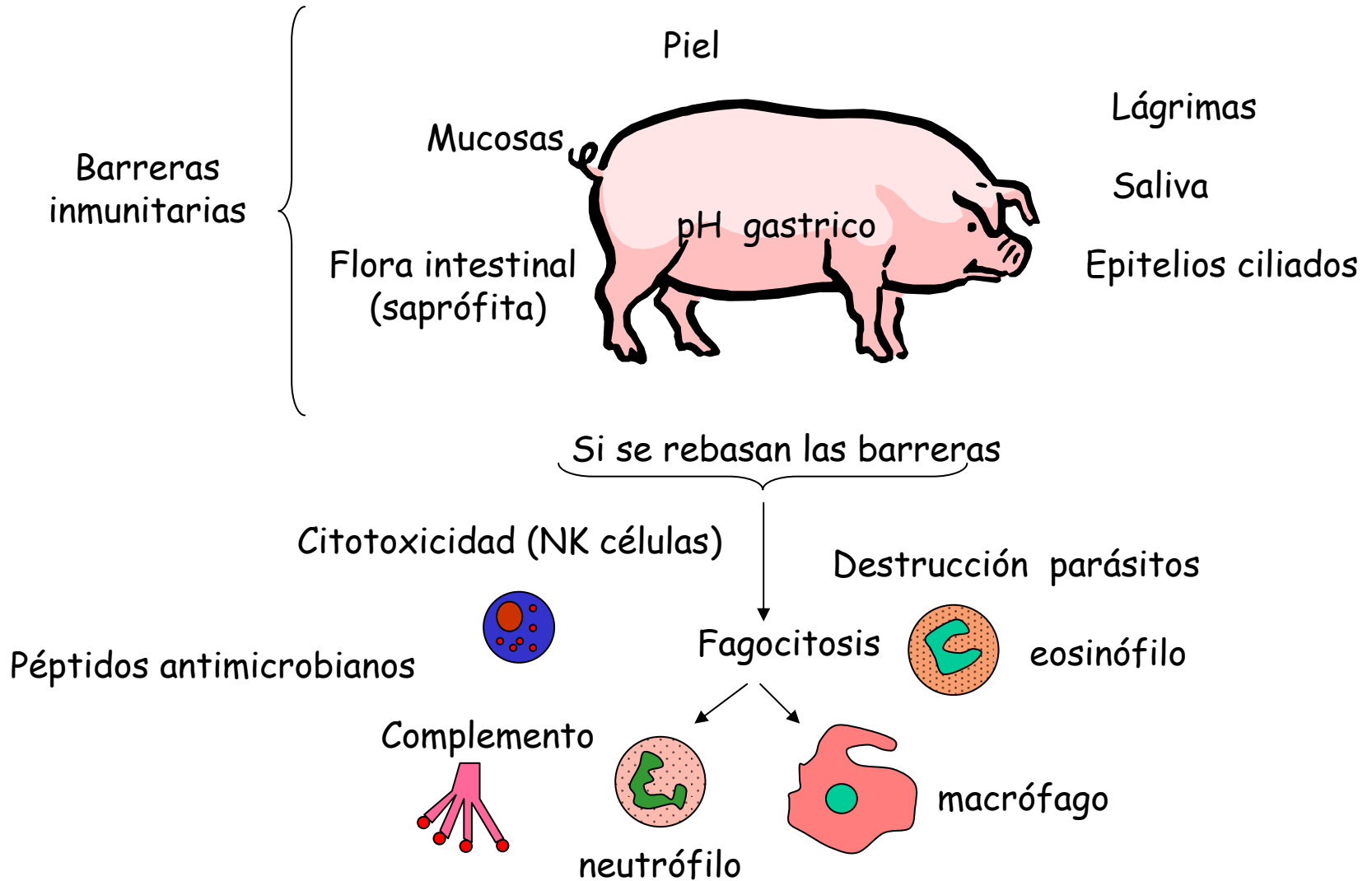
Humoral:
Linfocitos B

Anticuerpos

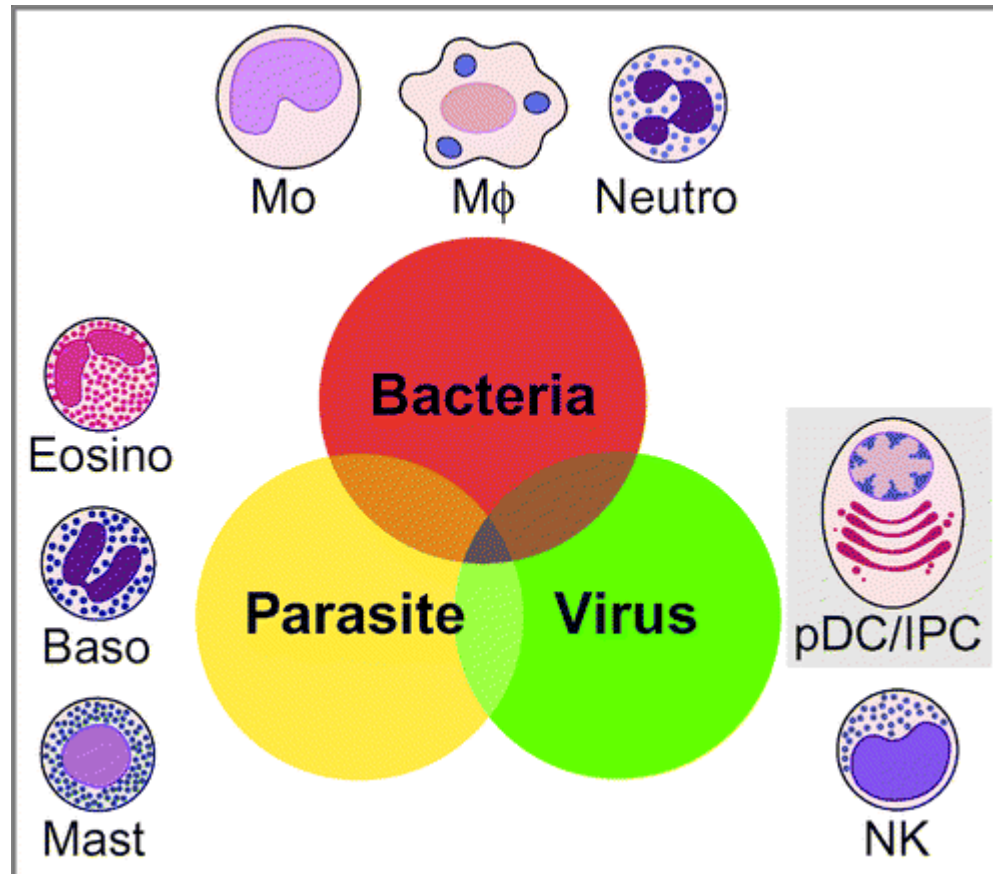
Respuesta
Celular:
Linfocitos T

Helper – CD4
Citotóxicos – CD8

Componentes de la inmunidad natural



Inmunidad innata y patógenos



Todas las células de la sangre, incluyendo los linfocitos, proceden de las células germinales del sistema hematopoyético que está localizado en la médula osea.

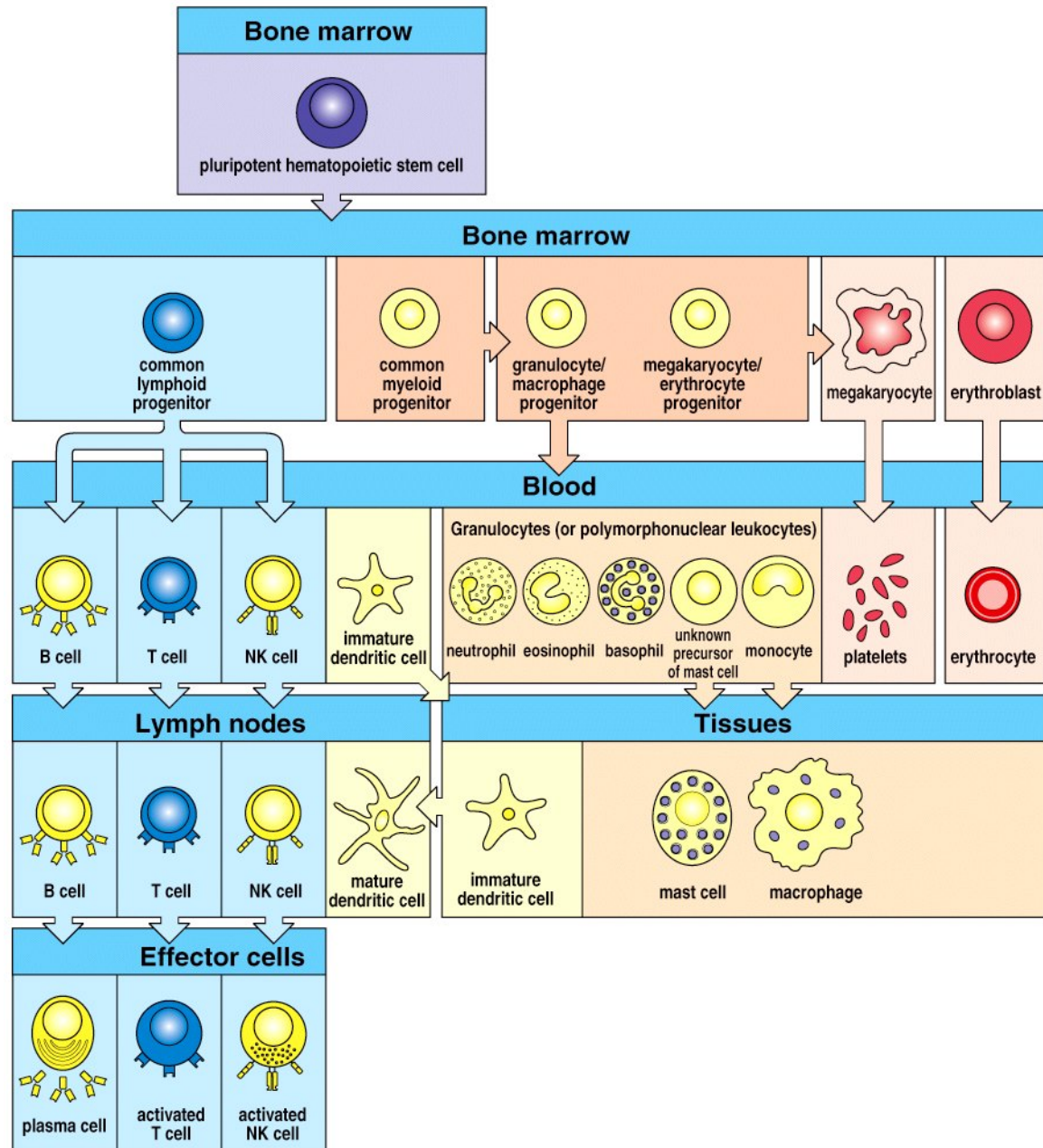


Figure 1-3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

La mayor parte de los agentes infecciosos inducen una respuesta inflamatoria mediante la activación del sistema inmune innato

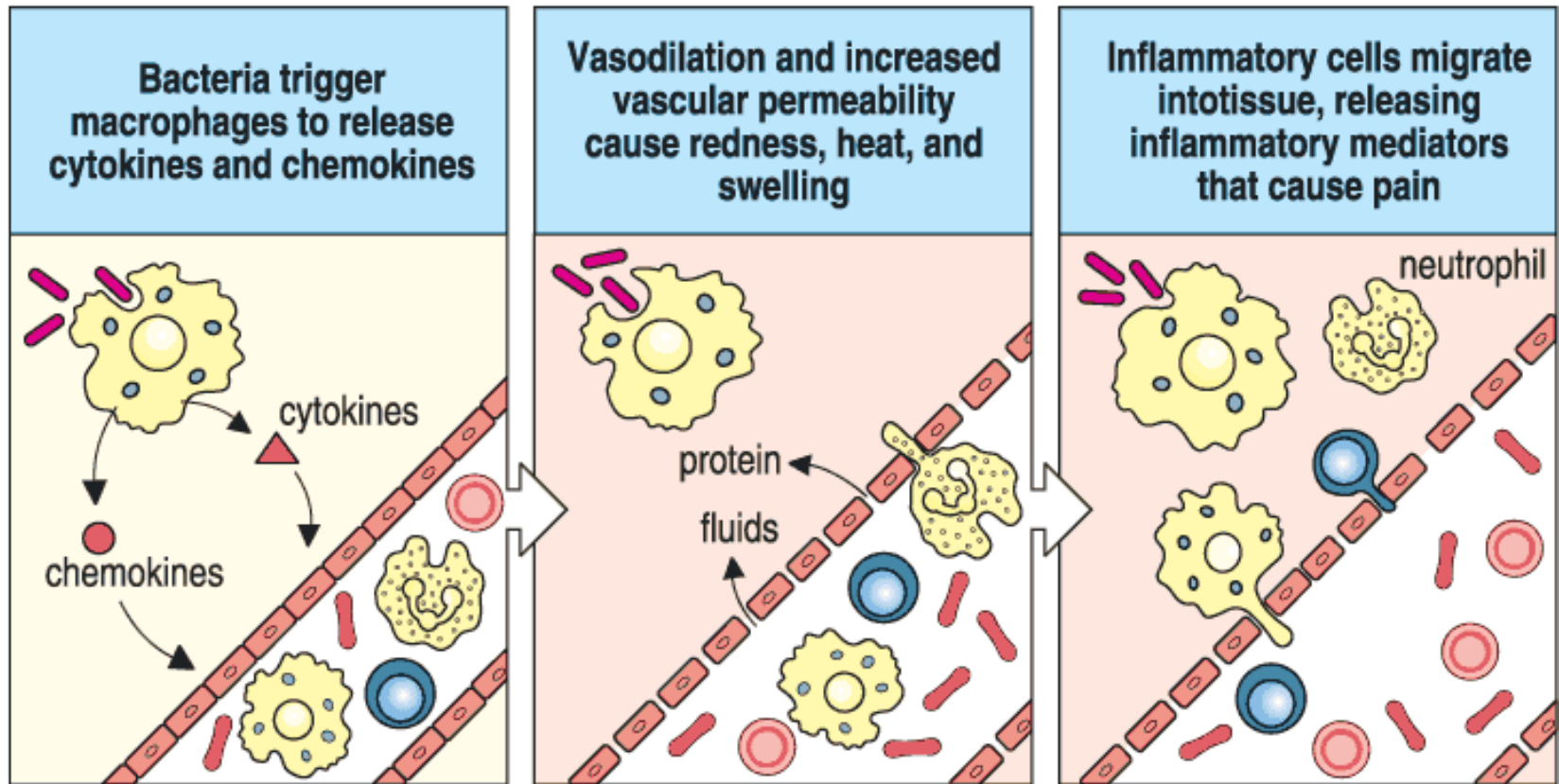
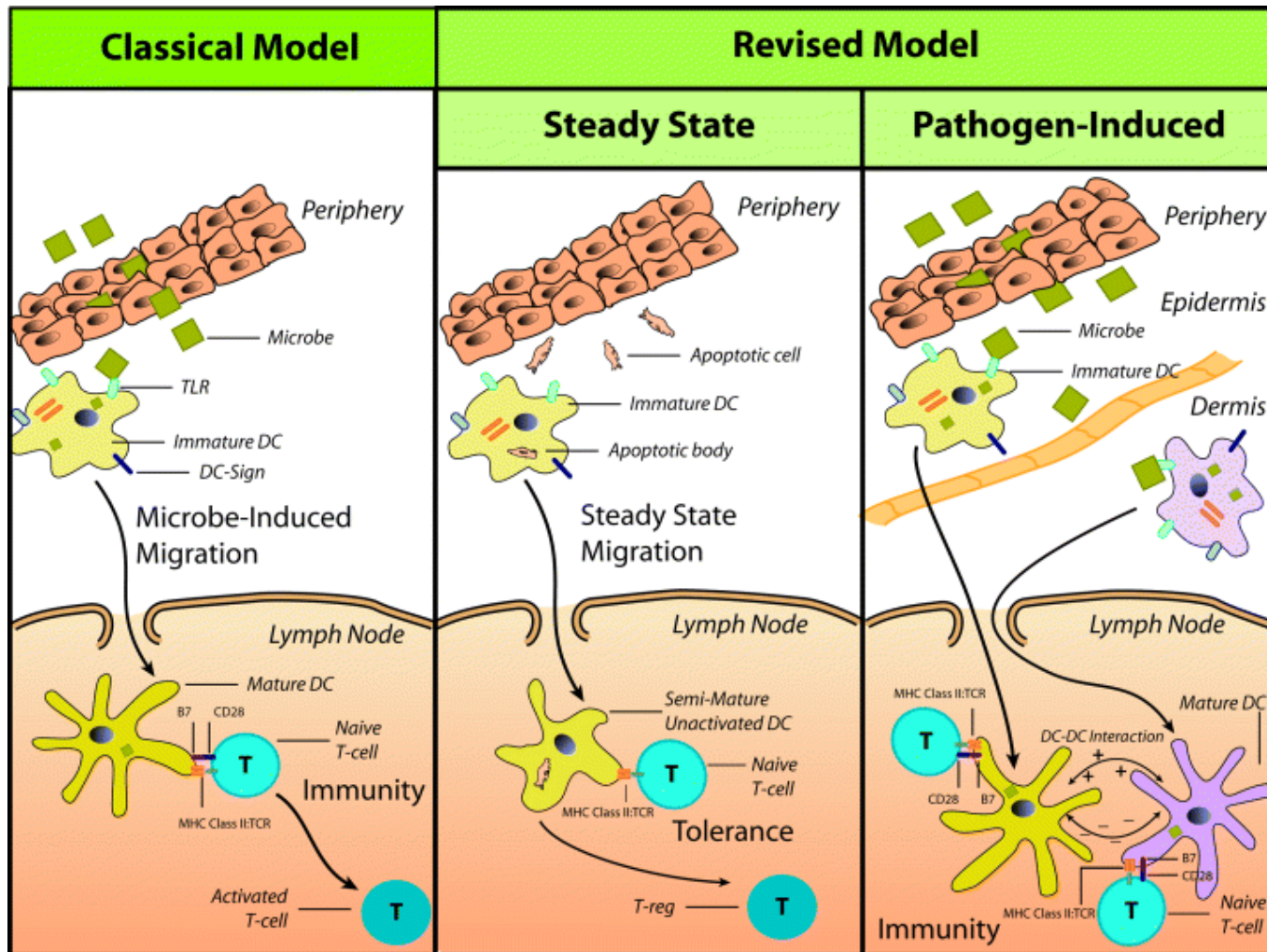


Fig 1.12 © 2001 Garland Science

Inmunidad innata/adquirida



Inmunidad adaptativa

- Los linfocitos se clasifican en linfocitos T y B.
- Linfocitos T. Asociados a la respuesta inmune celular y a la regulación de la respuesta inmune.
- Linfocitos B. Asociados a la respuesta inmune humoral (producción de anticuerpos).

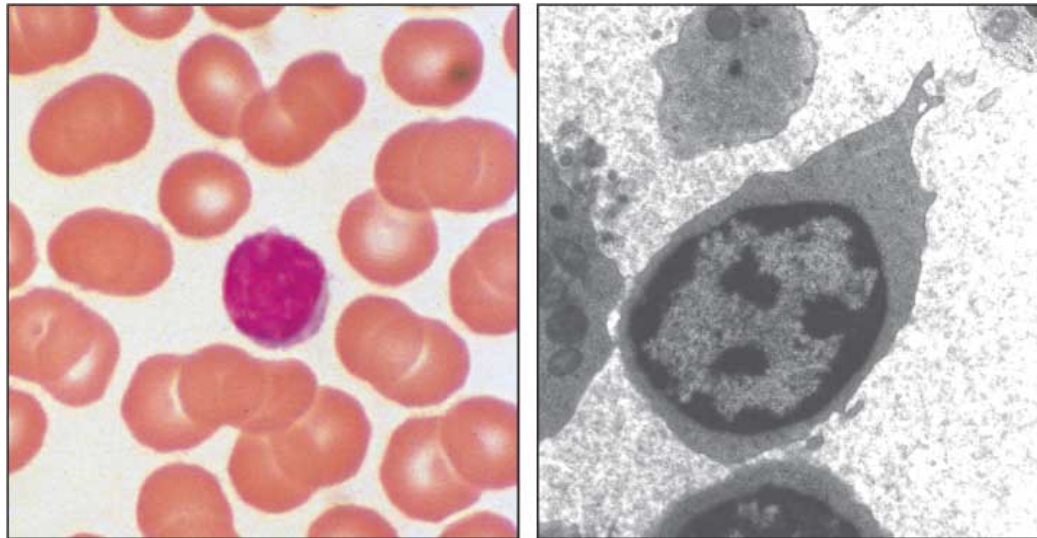


Fig 1.5 © 2001 Garland Science

Inmunidad adaptativa

- Las células T son los “asesinos armados” de la respuesta inmune adaptativa.
- Tipos de Linfocitos T:
 - CD8
 - Células T citotóxicas (CTL).
 - Su función es destruir las células diana (células infectadas y tumorales).
 - CD4
 - Células T helper.
 - Su función es producir ciertas citoquinas
 - Th1 – Las citoquinas más relevantes son $\text{IFN}\gamma$ y IL-2.
 - » - Respuesta inmune celular.
 - Th2 - Las citoquinas más relevantes son IL-4 y IL-10.
 - » - Ayuda a los linfocitos B/Producción de anticuerpos. Respuesta inmune humoral.

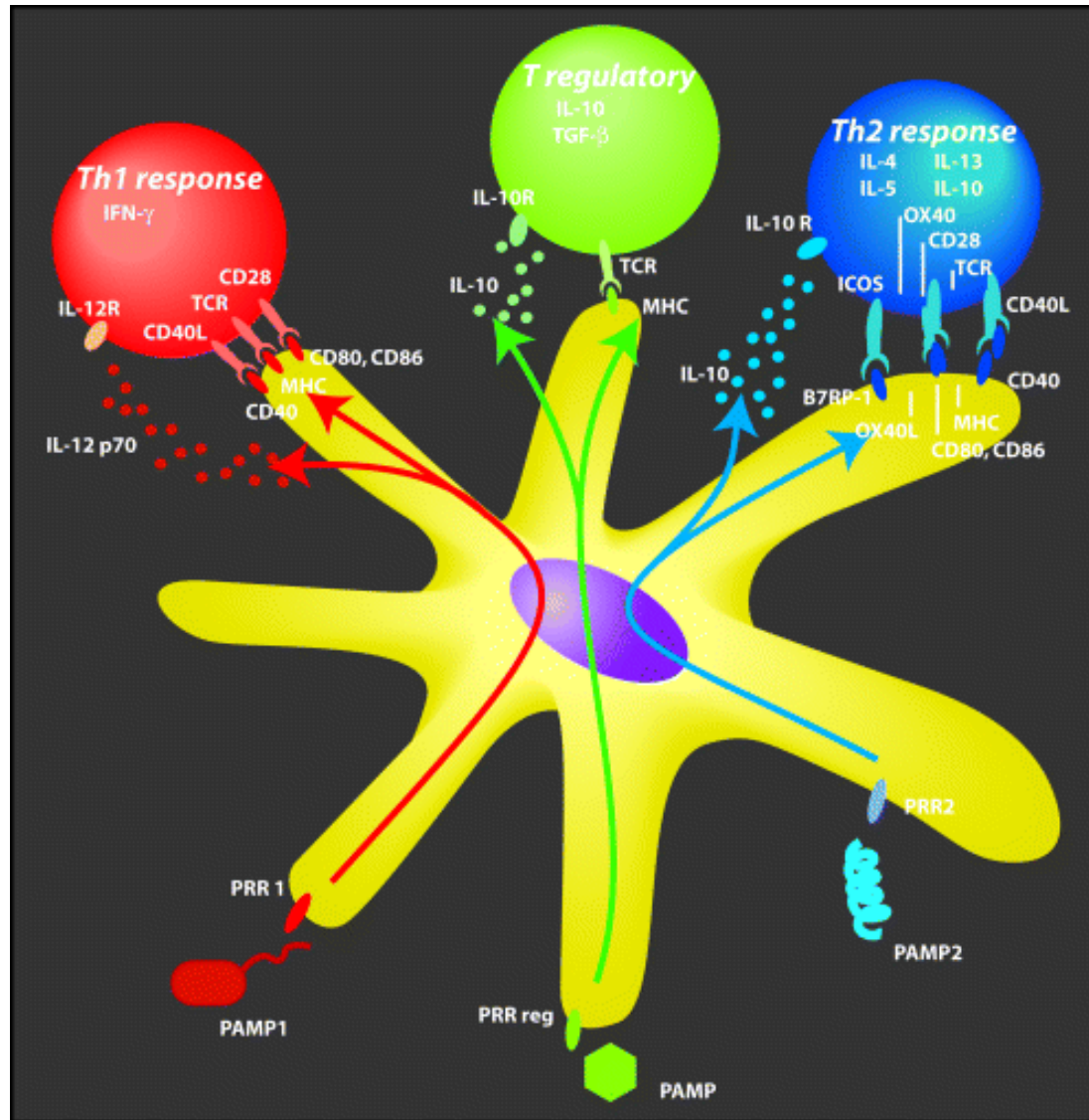
Células T helper

- **Th1**
 - Activa a macrófagos y células NK.
 - “Ayuda” a algunas células B en la producción de anticuerpos: IgG2 (activación del complemento y colaboración en fagocitosis).
 - “Ayuda” a células T Citotóxicas.
- **Th2**
 - “Ayudan” mayoritariamente a células B en la producción de anticuerpos: IgG1 e IgE
 - Activan a mastocitos y eosinófilos.
- **Th1 y Th2 se “inhiben” recíprocamente:**
 - Th2--- Gestación en mamíferos/fumadores humanos.

Inmunidad innata/Th1-Th2

Th1:

- IFN α/β
- IL12
- IL23
- IFN γ



Th2:

- IL4
- IL10
- IL5
- IL13
- IL6

Una respuesta dominante de Th1 versus Th2 modifica el resultado de la infección

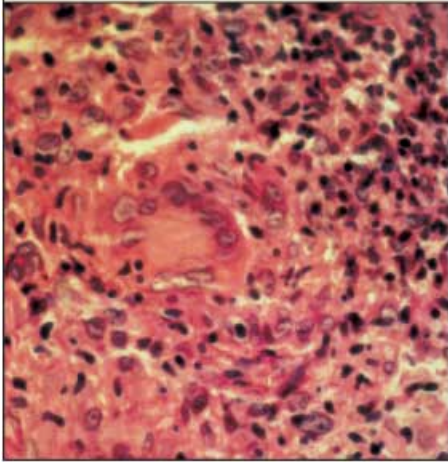
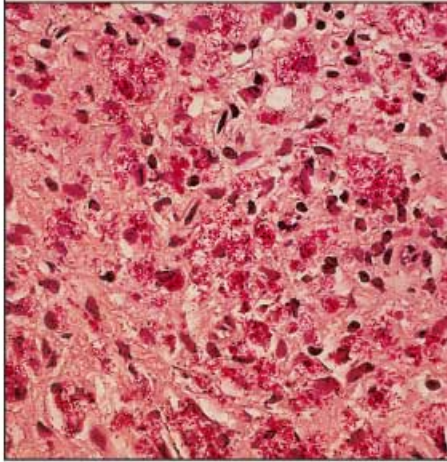
Infection with <i>Mycobacterium leprae</i> can result in different clinical forms of leprosy	
There are two polar forms, tuberculoid and lepromatous leprosy, but several intermediate forms also exist	
Tuberculoid leprosy	Lepromatous leprosy
	
Organisms present at low to undetectable levels	Organisms show florid growth in macrophages
Low infectivity	High infectivity
Granulomas and local inflammation. Peripheral nerve damage	Disseminated infection. Bone, cartilage, and diffuse nerve damage
Normal serum immunoglobulin levels	Hypergammaglobulinemia
Normal T-cell responsiveness. Specific response to <i>M. leprae</i> antigens	Low or absent T-cell responsiveness. No response to <i>M. leprae</i> antigens

Fig 11.6 part 1 of 2 © 2001 Garland Science

Una respuesta dominante de Th1 versus Th2 modifica el resultado de la infección

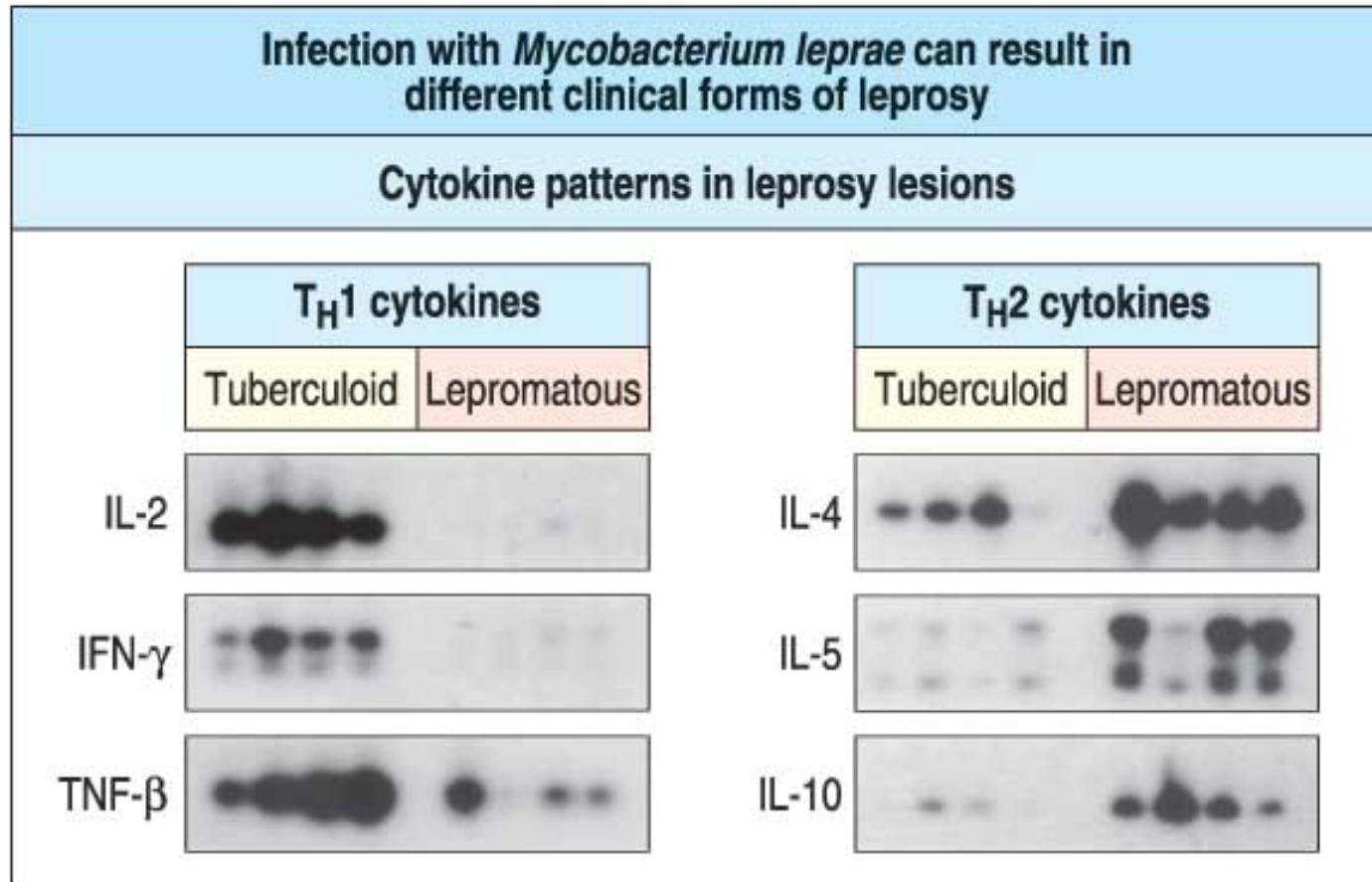


Fig 11.6 part 2 of 2 © 2001 Garland Science

Diferentes clases de patógenos activan diferentes poblaciones de linfocitos T

	Cell-mediated immunity		Humoral immunity
Typical pathogens	Vaccinia virus Influenza virus Rabies virus <i>Listeria</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium leprae</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Clostridium tetani</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Polio virus <i>Pneumocystis carinii</i>
Location	Cytosol	Macrophage vesicles	Extracellular fluid
Effector T cell	Cytotoxic CD8 T cell	T _H 1 cell	T _H 2/T _H 1 cell
Antigen recognition	Peptide:MHC class I on infected cell	Peptide:MHC class II on infected macrophage	Peptide:MHC class II on antigen-specific B cell
Effector action	Killing of infected cell	Activation of infected macrophages	Activation of specific B cell to make antibody

Fig 8.1 © 2001 Garland Science

¿Es posible “manipular” el sistema
inmune?

Inmunomodulación

Inmunomodulación

- Los inmunomoduladores son aquellas sustancias que pueden modular la respuesta inmune con el fin de mejorar el estado sanitario del animal y conseguir una producción animal más eficiente.
- Utilización de las sustancias inmunomoduladoras en animales de producción:
 - Manejo de situaciones de stress crónico:
 - Situación muy frecuente en condiciones de cría intensiva.
 - Esta situación de stress crónico conlleva una situación de inmunosupresión y una respuesta inmune menos eficiente frente a las enfermedades.
 - Mejorar la respuesta inmune durante la ontogenia:
 - La respuesta inmune es menos eficiente en animales jóvenes que en adultos.
 - Por cuestiones de manejo en animales de producción, muchas medidas profilácticas (sobre todo vacunas) se aplican durante la ontogenia.
 - Influir el coste metabólico de la respuesta inmune:
 - El sistema inmune tiene prioridad frente a otros tejidos (salvo la función neural) en cuanto al uso de nutrientes.
 - Si se puede modular la respuesta inmune para disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias catabólicas sin comprometer los mecanismos de defensa, se mejorará la eficiencia de la producción (teoría).

Inmunomoduladores

- Citoquinas:
 - Interferon γ , α .
 - IL1, IL2...
 - Productos farmacológicos:
 - Levamisol.
 - Tiabendazol.
 - Substancias derivadas de microorganismos:
 - Bacterias inactivadas.
 - Componentes de la pared bacteriana.
 - Virus Inactivados (Parapoxvirus ovis)--- Baypamun®
 - Componentes de levaduras.
 - Nutraceúticos:
 - Vitaminas.
 - Aminoácidos.
 - Oligoelementos.
 - Inmunicin MAYMO.
 - Otros.
 - Plantas medicinales tradicionales:
 - Extractos de Aloe vera.
 - Extractos de Panax ginseng.
- 
- Productos registrados

Nutracéuticos

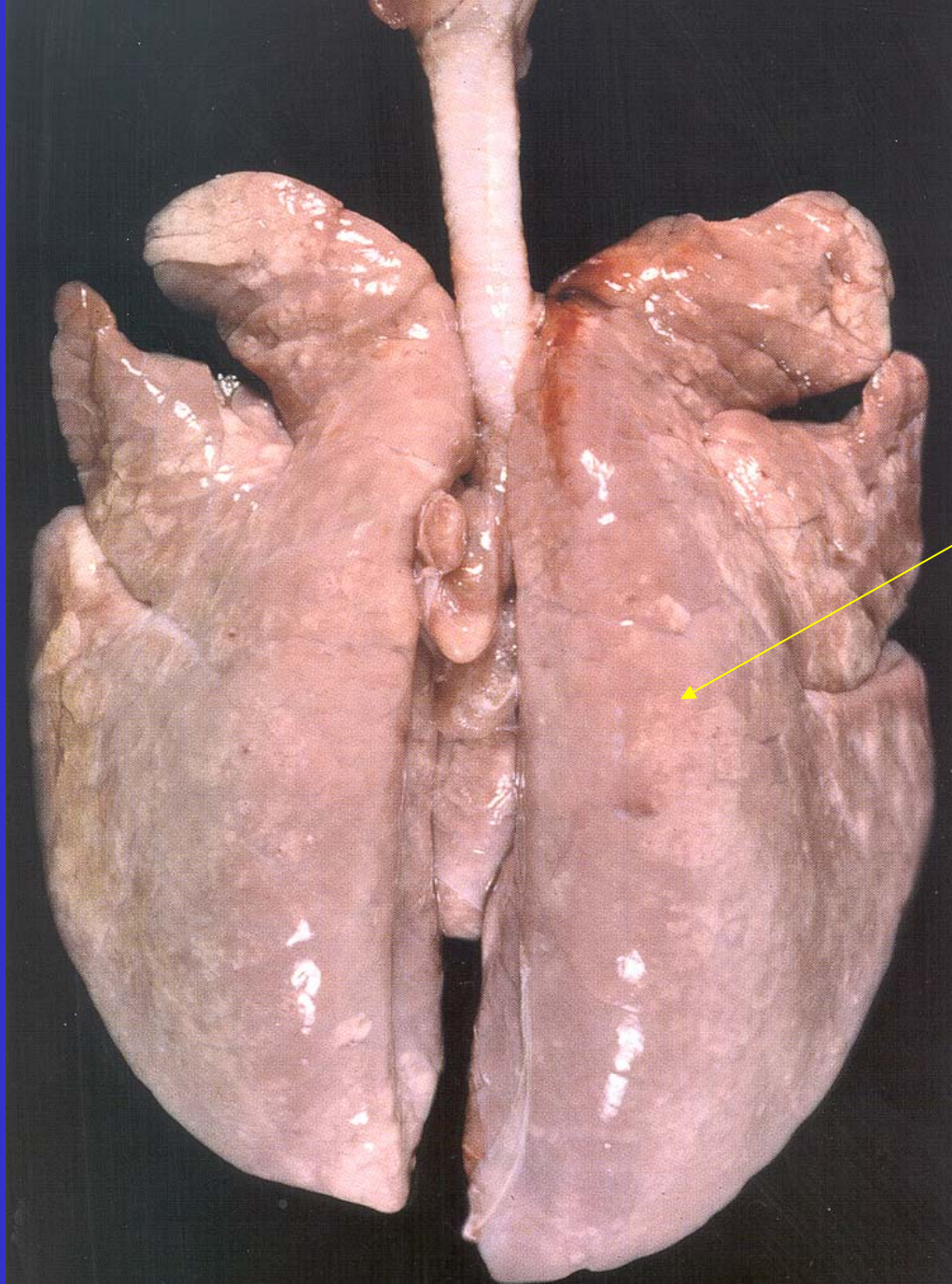
- Cualquier sustancia que forme parte de la dieta habitual de una especie y que aporte beneficios para su salud tales como la prevención y tratamiento de determinadas enfermedades.
- Es el grupo de inmunomoduladores que se está desarrollando más en la actualidad.
- Nutraceuticos:
 - Vitaminas.
 - Oligoelementos.
 - Aminoácidos.
 - Ácidos grasos.
 - Isoflavonas de soja.
 - Inmunicin MAYMO.

Sólo demostrado claramente
en estados carenciales

**Complejo respiratorio porcino.
Modelo para la utilización de
inmunomoduladores**

Complejo respiratorio porcino

- Todos los procesos patológicos que cursan con clínica respiratoria (tos, disnea y estornudos). Estos cuadros pueden cursar con una mortalidad y morbilidad variable, pero siempre conllevan un retraso en el crecimiento de los animales, un empeoramiento del índice de conversión y la aparición de animales requeadados.
- La patología respiratoria es un problema económico muy importante para los productores de porcino en todo el mundo .
- Es un ejemplo claro de enfermedad multifactorial:
 - Susceptibilidad del animal--- Resistencia genética
 - Ambiente.
 - Agentes infecciosos:
 - Virus
 - Bacterias



MAP

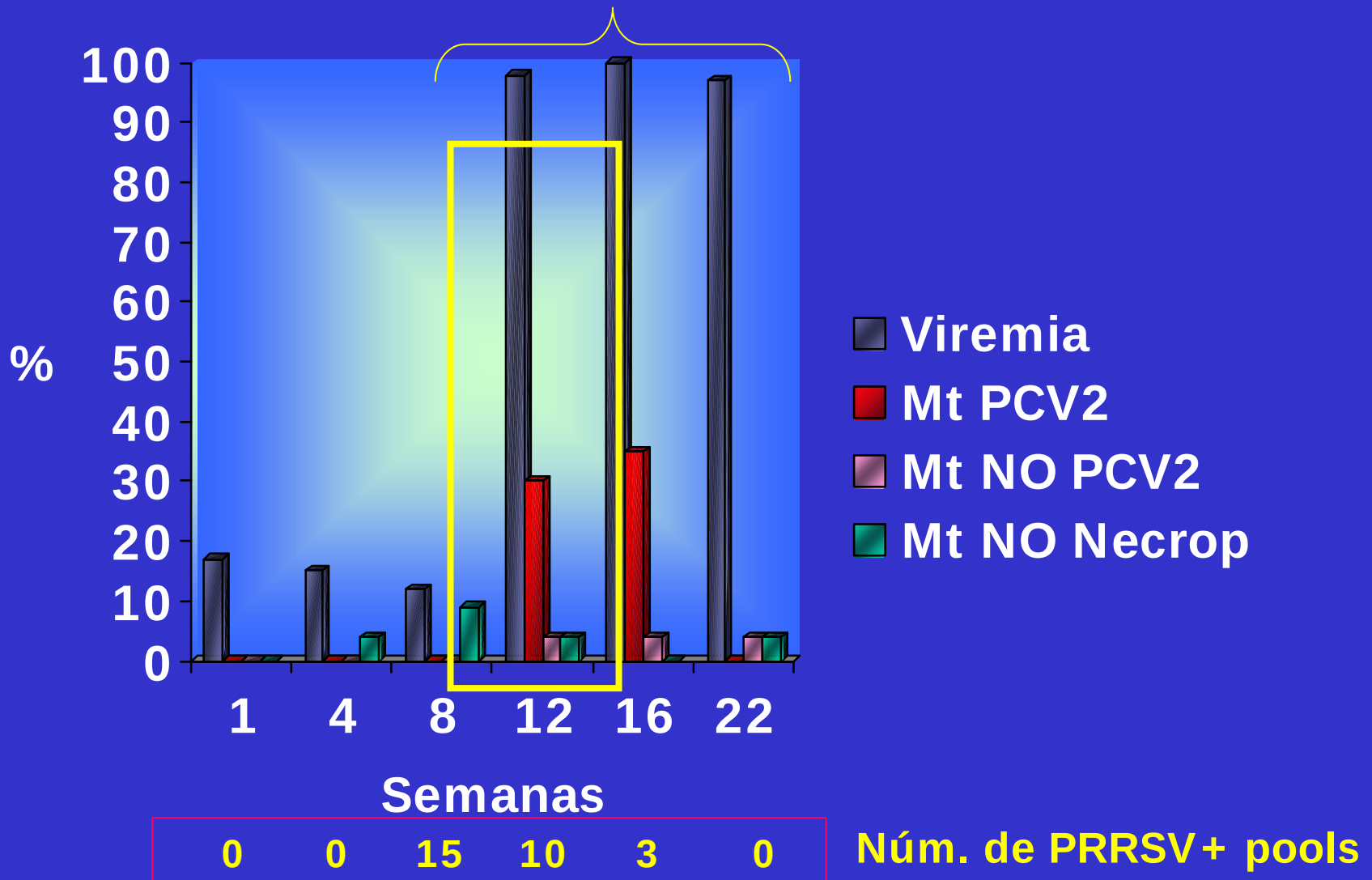
Agentes infecciosos. Complejo respiratorio porcino

- *Pasteurella spp* (*).
- *Bordetella bronchiseptica* (*).
- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*).
- Gripe porcina (*).
- Enfermedad de Aujeszky (**).
- PRRS (***)
- **Circovirus porcino tipo 2 (***)**.
- *Mycoplasma hyopneumoniae* (**).

Patogénesis de los principales agentes implicados

- PRRS:
 - Célula diana: Macrófago alveolar y célula germinal.
 - Inmunomodulación.
- Circovirus porcino tipo 2:
 - Célula diana: Célula dendrítica, célula endotelial. Linfocito, Macrófago??
 - Inmunomodulación e inmunosupresión.
- *Mycoplasma hyopneumoniae*:
 - Célula diana: Células epiteliales del pulmón.
 - Mantiene niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α). Inflamación crónica.

PRRS-PMWS G1





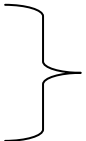
Planteamiento terapéutico (I)

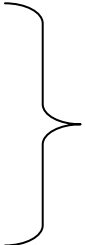
- Utilización de programas metafilácticos y/o terapéuticos basados en la administración de una o varias sustancias antimicrobianas administradas a través del pienso o del agua de bebida. Esta opción se podría restringir significativamente en el futuro mediante normas regulatorias nacionales (AEM) y/o europeas (EMA).
- Aplicación de programas vacunales frente a los microorganismos que podrían estar implicados. Esta opción se pretende potenciar para disminuir el uso de sustancias antimicrobianas. El principal inconveniente es que no se dispone de vacunas eficaces frente a todos los microorganismos que podrían estar implicados.

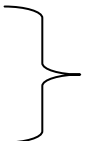
Planteamiento terapéutico (II)

- Utilización de razas, estirpes o líneas genéticas de animales que sean más resistentes frente a estas enfermedades. Es una línea de investigación con mucho futuro a largo plazo.
- Inmunomodulación. Modificación u orientación de la respuesta inmune para que sea más eficiente. Pensar en los agentes infecciosos que están implicados y que son cuadros clínicos de larga duración (enfermedades crónicas):
 - PRRS.
 - *Mycoplasma Hyopneumoniae*.
 - Circovirus porcino tipo 2.
- Combinación de varias de las opciones "terapéuticas" que hemos comentado anteriormente.

Uso de inmunomoduladores en el complejo respiratorio porcino

- Citoquinas:
 - Interferon γ , α .
 - IL1, IL2...

Nivel experimental
- Productos farmacológicos:
 - Levamisol.
 - Tiabendazol.
- Substancias derivadas de microorganismos:
 - Bacterias inactivadas.
 - Componentes de la pared bacteriana.
 - Virus Inactivados (Parapoxvirus ovis)--- Baypamun@.
 - Componentes de levaduras.

Resultados contradictorios
- Nutraceuticos:
 - Vitaminas.
 - Aminoácidos.
 - Oligoelementos.
 - Inmunicin MAYMO (IM).
- Plantas medicinales tradicionales:
 - Extractos de Aloe vera.
 - Extractos de Panax ginseng.

Nivel experimental

**Investigaciones realizadas con
Inmunicín MAYMO (IM).**

Efecto de Inmunicin MAYMO sobre el sistema inmune (I)

- Efectos del principio activo de Inmunicin MAYMO (datos de humana):
 - Aumenta la actividad de células NK.--- INMUNIDAD INNATA.
 - Disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6).--- DISMINUYE EL PROCESO CAQUECTIZANTE.
 - Aumenta la producción de unas citoquinas:
 - IL-2.
 - IFN- γ .
 - Disminuye la producción de otras citoquinas:
 - IL-4.
 - IL-6.
 - IL-10.
- Se modifica el balance Th1/Th2 hacia una mayor respuesta Th1. ES DECIR, UNA MEJOR RESPUESTA DE INMUNIDAD CELULAR.

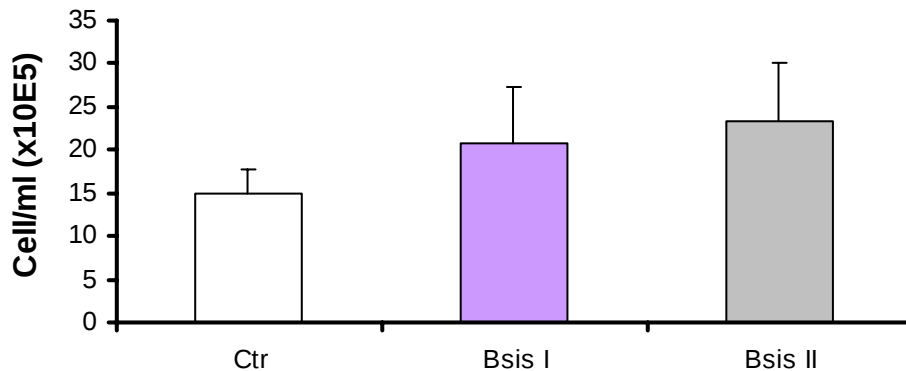
Efecto de Inmunicin MAYMO sobre el sistema inmune (II)

- Efectos del principio activo de Inmunicin MAYMO:
 - No se conoce el mecanismo preciso de acción.
 - Se hipotetiza sobre la acción del principio activo sobre los linfocitos. Esta información procede de medicina humana.
 - Se están llevando a cabo estudios para elucidar el mecanismo preciso de acción a través de estudios inmunológicos (estudios realizados por el CReSA).

Resultados del estudio de Inmunición *in vitro*: viabilidad celular

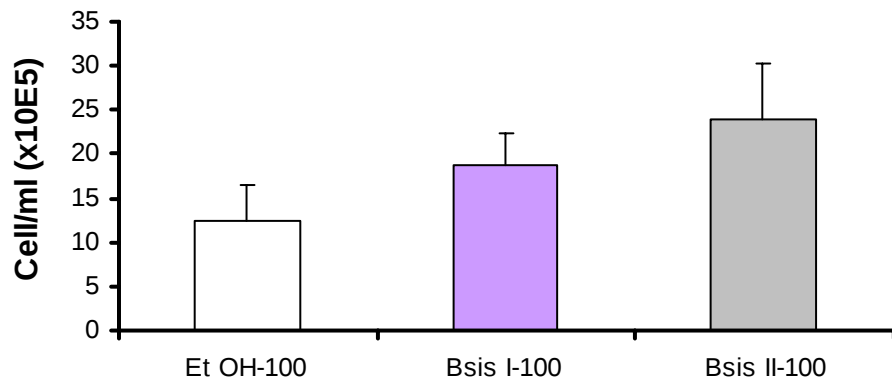
Estudios en PBMC (células mononucleares de sangre) de cerdo:

Bsis in powder in PBMC, 20Jul07



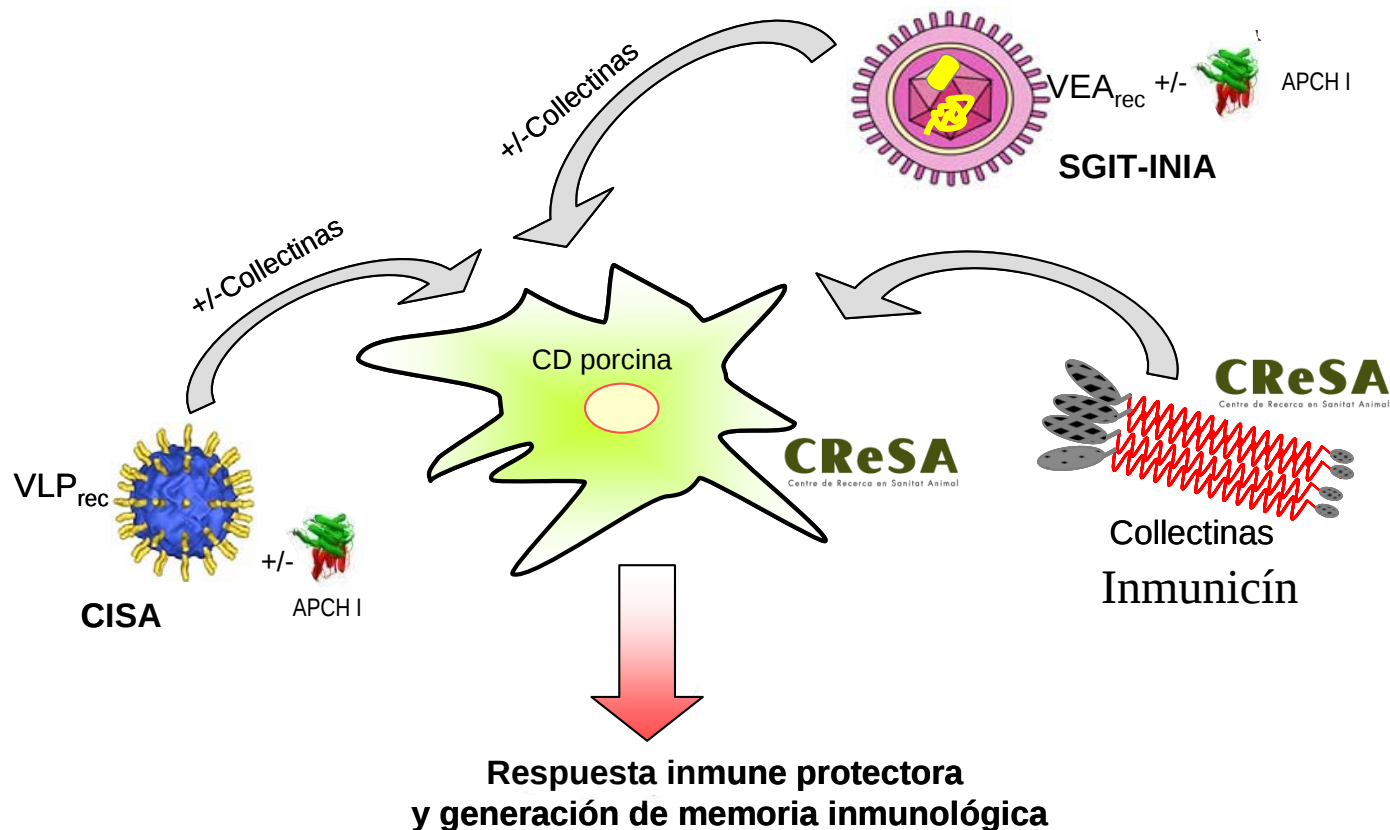
Ctr: control
Bsis I: lote I
Bsis II: lote II
EtOH: vehículo (etanol)

Bsis in EtOH in PBMC, 20Jul07



- Inmunición aumenta la supervivencia de células mononucleadas de sangre en cultivo, tanto disuelto en etanol como en polvo.

ESTUDIO INMUNOLOGICO



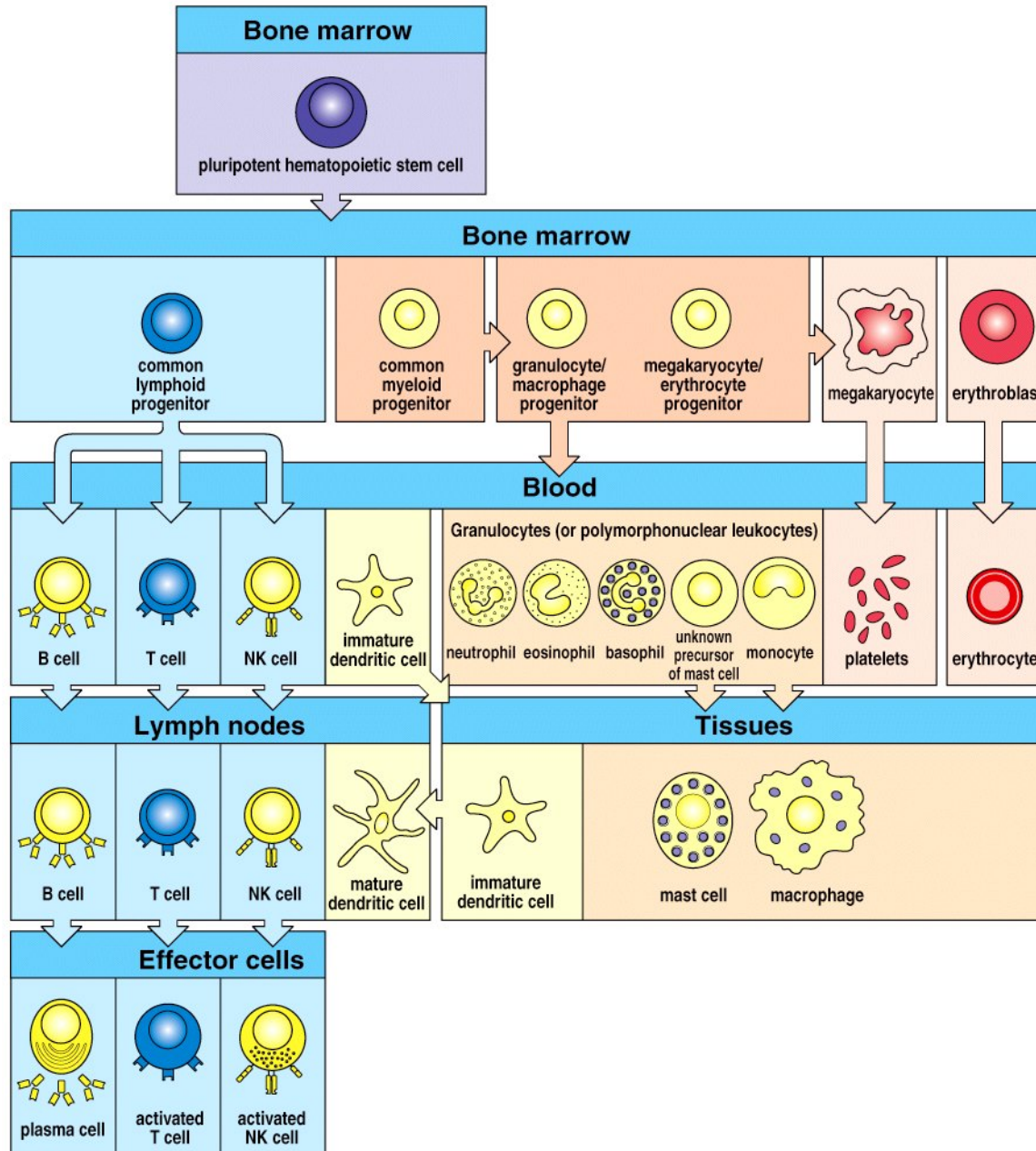
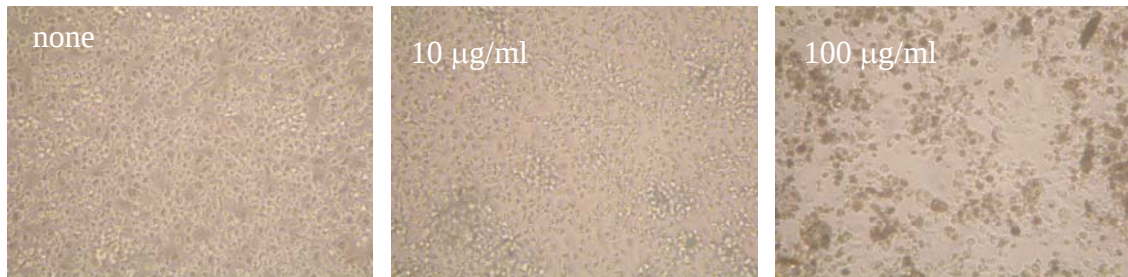


Figure 1-3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

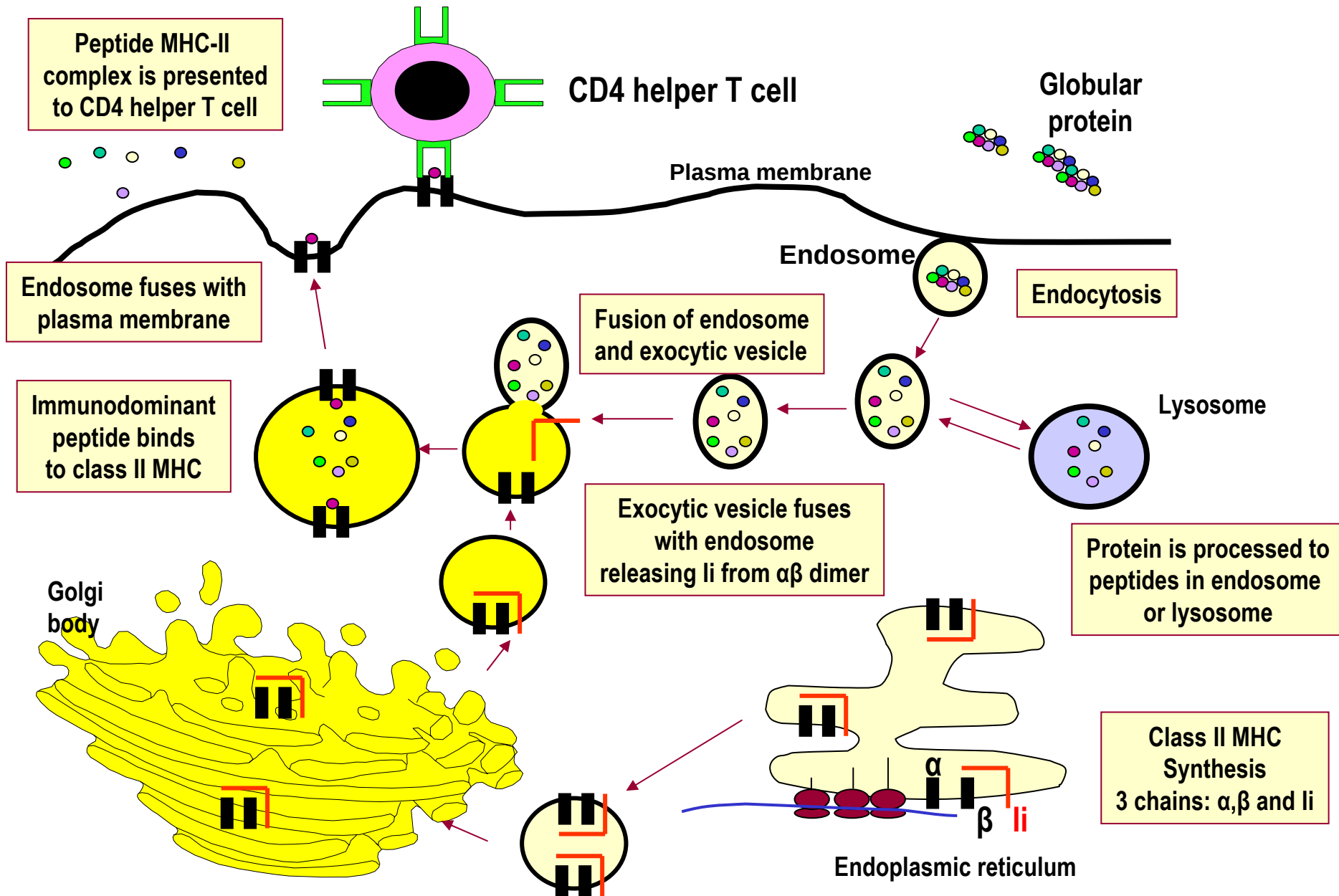
Resultados del estudio de Inmunicin MAYMO *in vitro*:

Estudios en BMDC (células dendríticas derivadas de médula ósea) de cerdo:



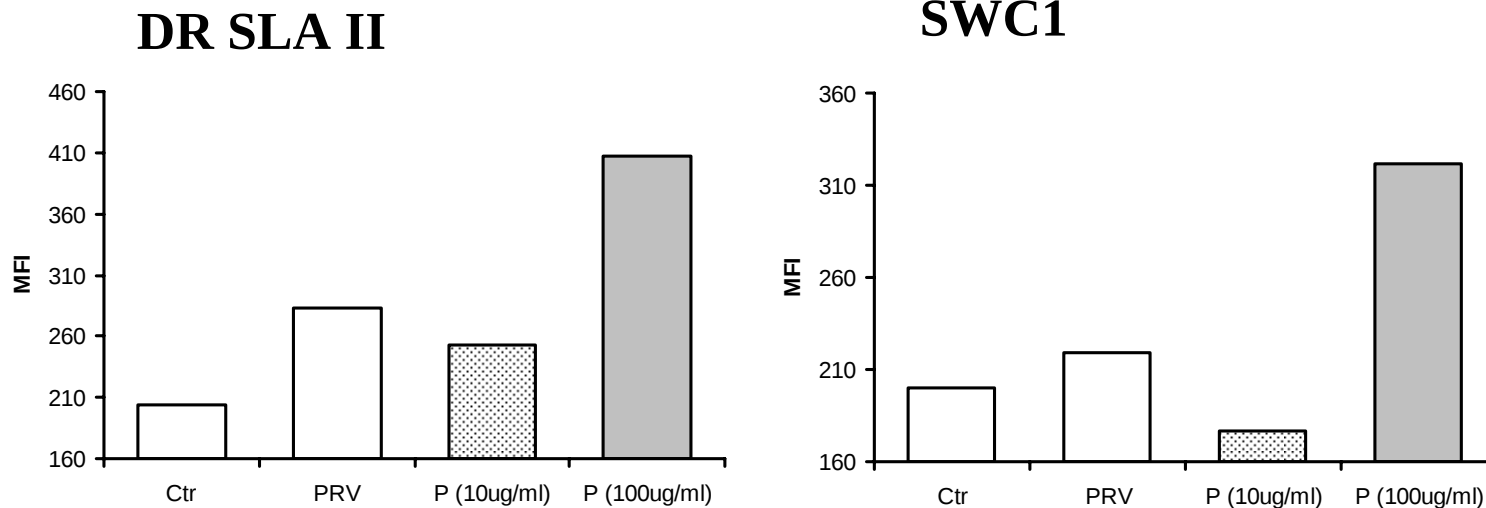
Inmunicin MAYMO induce agregados de BMDC en cultivo, lo que indicaría una activación celular.

Class II MHC Pathway



Resultados del estudio de inmucín MAYMO *in vitro*:

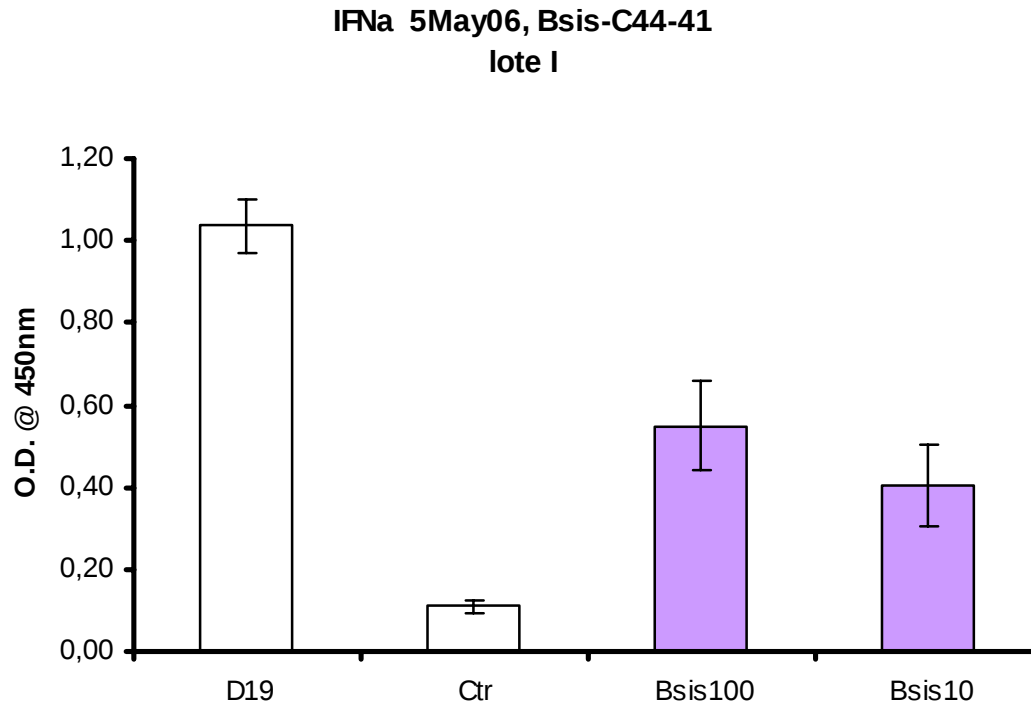
Estudios en BMDC (células dendríticas derivadas de médula ósea) de cerdo:



- Inmunicín MAYMO altera la expresión de moléculas de superficie en la membrana celular tan importantes en la respuesta inmune como MHC II.
- La agregación celular puede ser debida al aumento de expresión de MHC II

Resultados del estudio de Inmunición *in vitro*:

Estudios en BMDC (células dendríticas derivadas de médula ósea) de cerdo:



- Inmunización induce IFN α (Th1) en células dendríticas con un efecto dosis respuesta.
- No se induce IL-10 (Th2)

Conclusiones

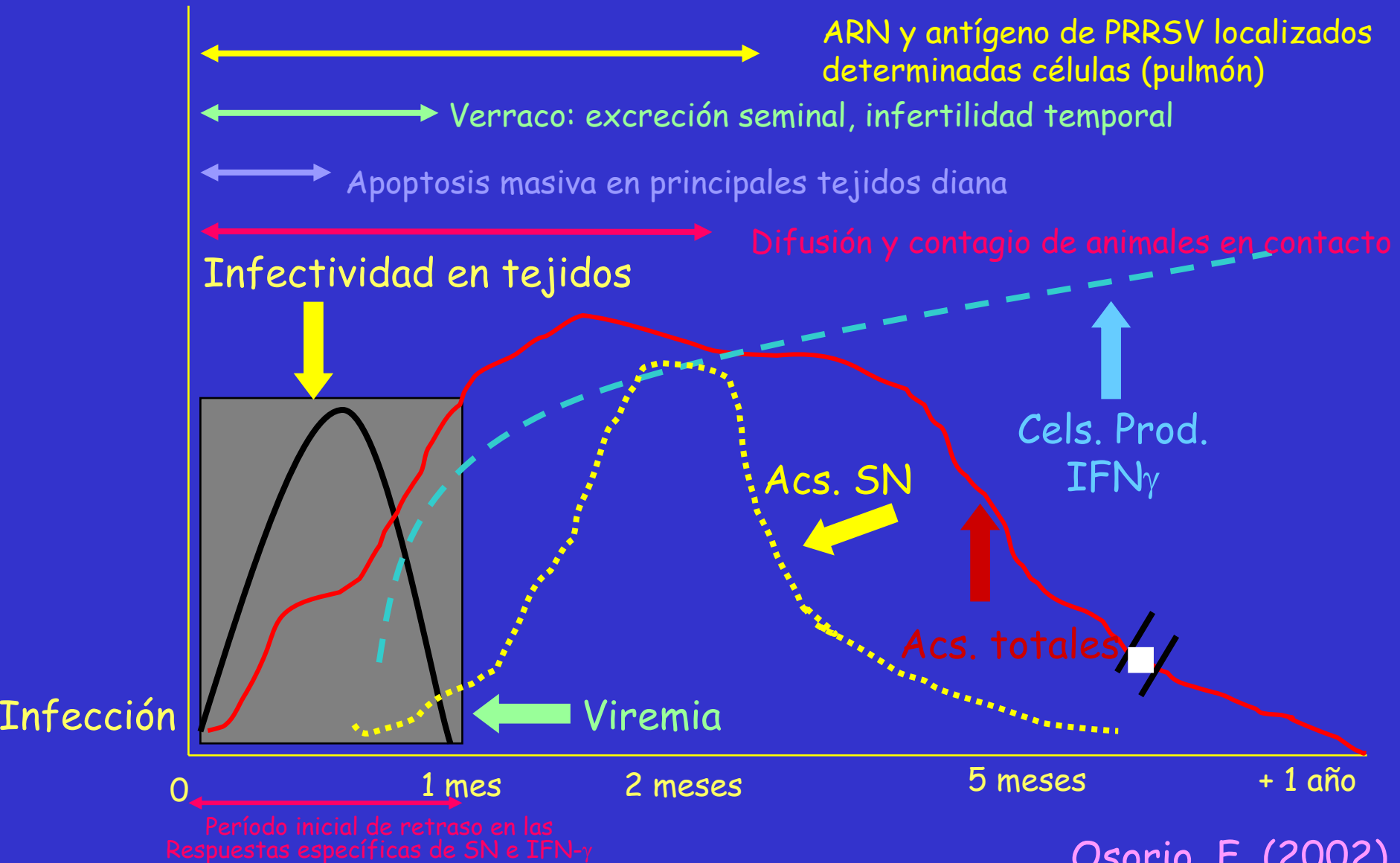
- Inmunicin aumenta la viabilidad celular en células mononucleadas en cultivo.
- Inmunicin activa las células dendríticas:
 - produciendo su agregación
 - aumentando los niveles de MHC II en superficie
 - secretando IFNalpha.
- Inmunicin probablemente activa el sistema inmune mediante la activación, al menos, de las células dendríticas.

Estudios “in vivo” con el virus PRRS

Patogénesis PRRS

- Retraso en la aparición de la inmunidad celular (primera fase de infección):
 - Disminución en la producción de IL-2.
 - Disminución de la producción de interferón α .
 - Incremento en la producción de IL-10.
- Lenta aparición de anticuerpos neutralizantes.

Secuencia temporal de fenómenos tras la infección por PRRSV



Estudios “*In vivo*”

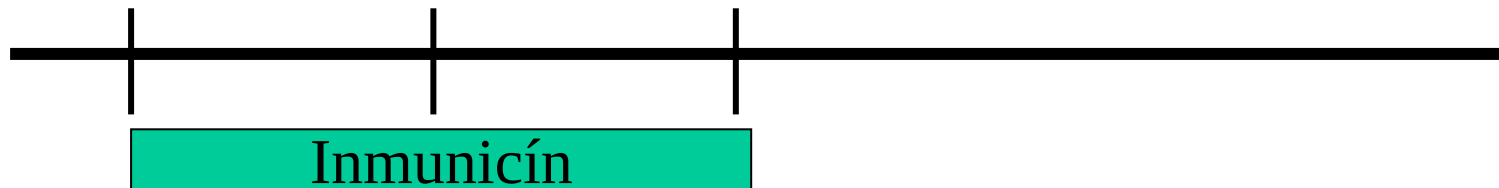
Vacuna viva PRRS



Grupos experimentales:

- A – NP/NV
- B – NP/V
- C – P/NV
- D – P/V

10 S (20/12/06) 13 S (10/01/07) 18 S (12/02/07)



Muestreos
(días)



0

1

2



Inmunidad innata

Muestreos
(semanas)



15

18

20

22

24



Inmunidad adquirida



Análisis de efecto del Inmunicin sobre la respuesta vacunal de PRRSV

Grupos experimentales (6 animales/grupo):

- A – NP/NV
- B – NP/V
- C – P/NV
- D – P/V

Se cuantificó:

Respuesta inmune innata:

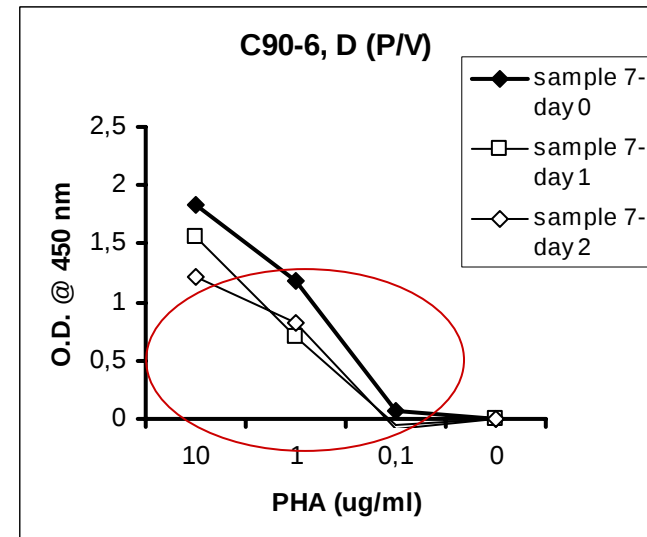
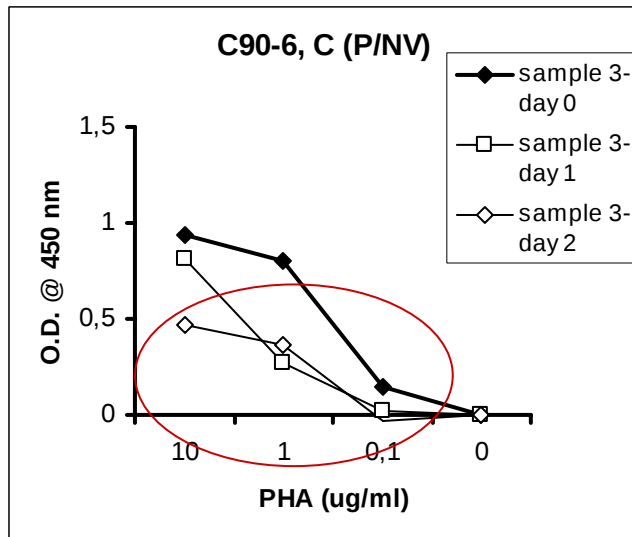
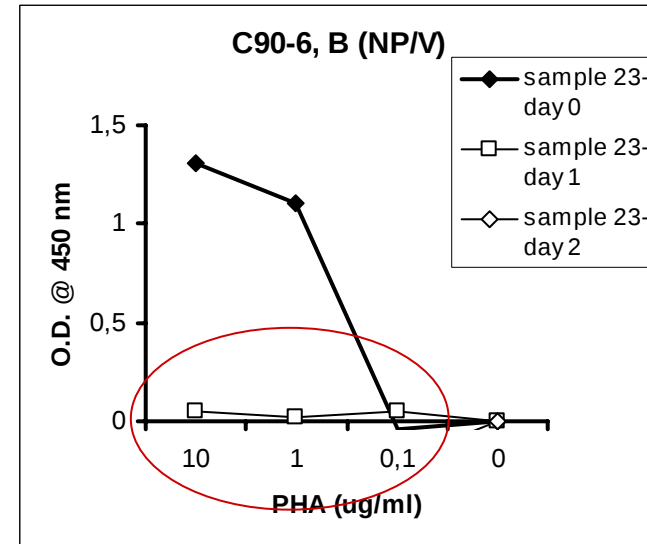
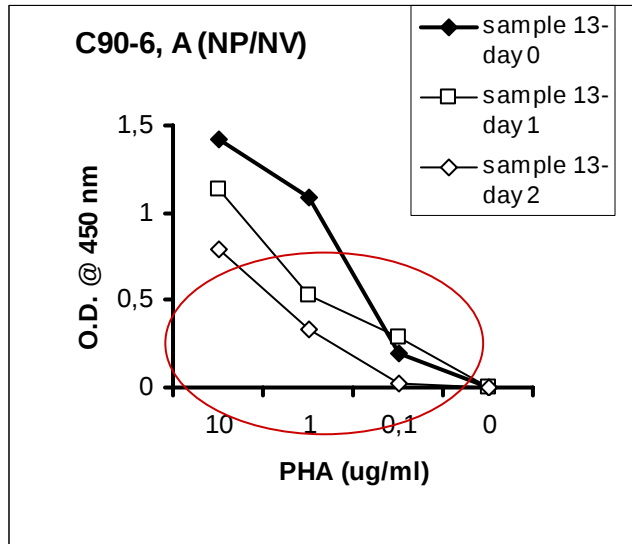
(días 0,1 y 2)

- Proliferación inespecífica (citoquinas)
- Subpoblaciones linfocitarias en suero (FACS)
- Nivel de citoquinas (IFN α /IL10/IL12) en suero

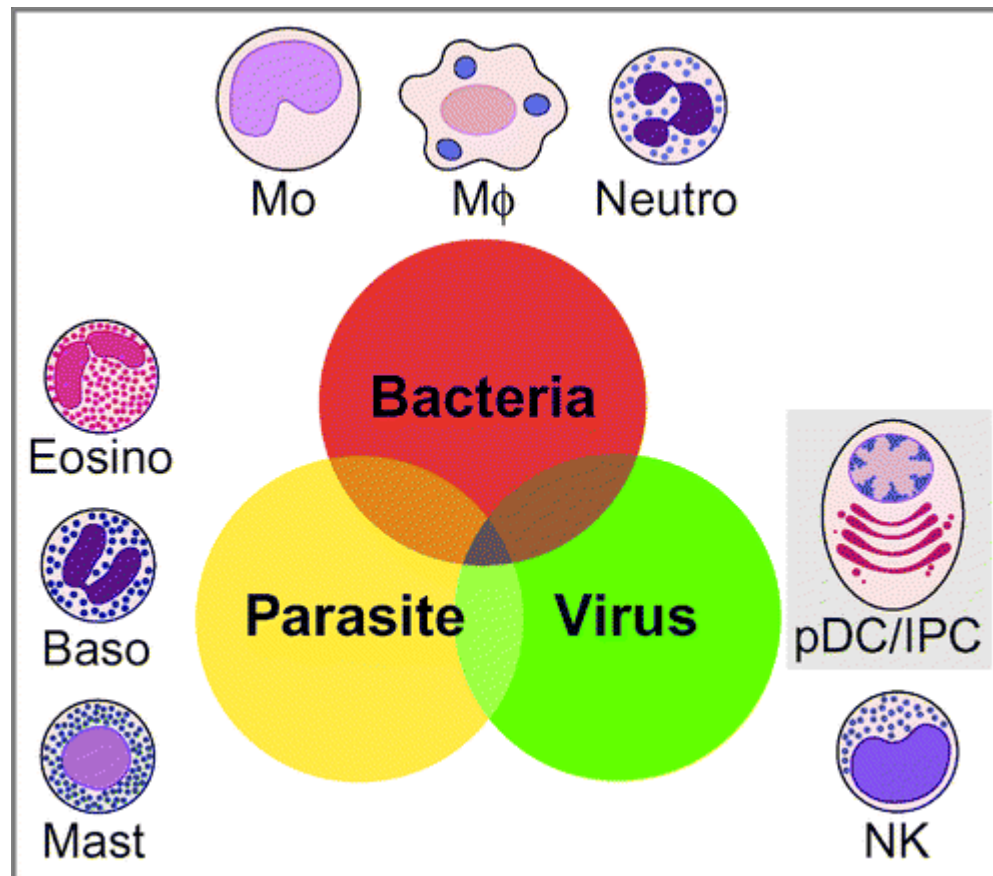
Respuesta inmune adaptativa:

- Título viral
- IFN γ por ELISA
- Anticuerpos anti-PRRSV por ELISA
- Anticuerpos seroneutralizantes de PRRSV por ELISA

Respuesta Innata: Proliferación inespecífica (citoquinas)



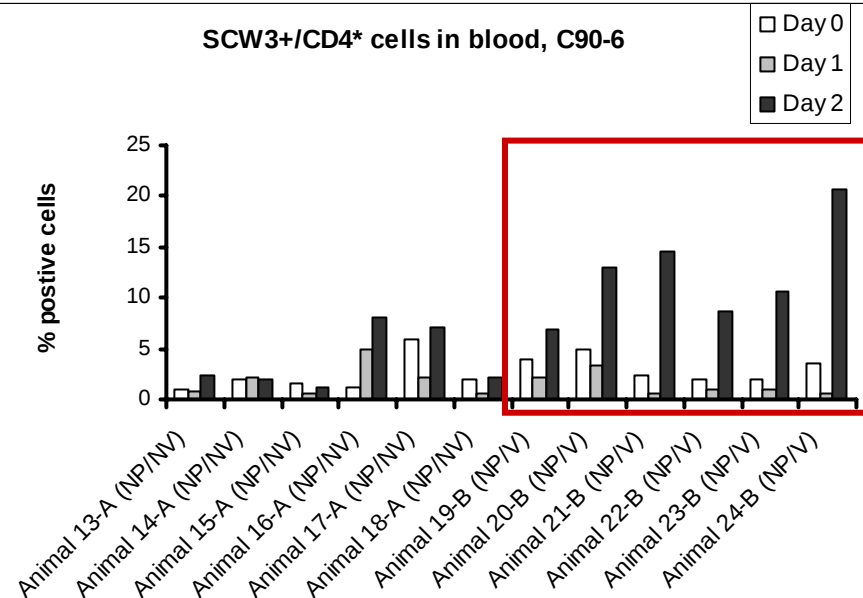
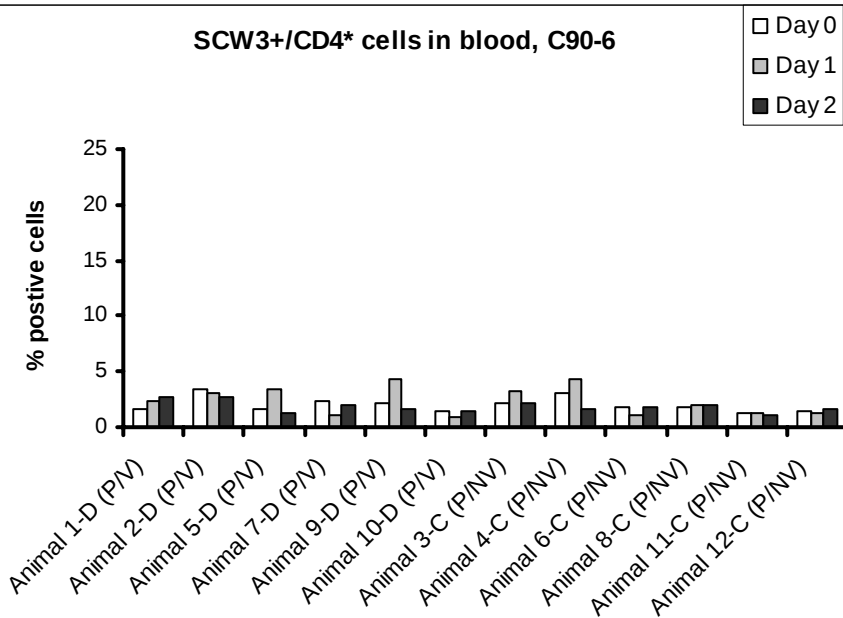
Inmunidad innata y patógenos



← SCW3+/CD4+

Análisis de efecto del Inmunicín sobre la respuesta vacunal de PRRSV

Respuesta Innata: Subpoblaciones linfocitarias en suero (FACS)

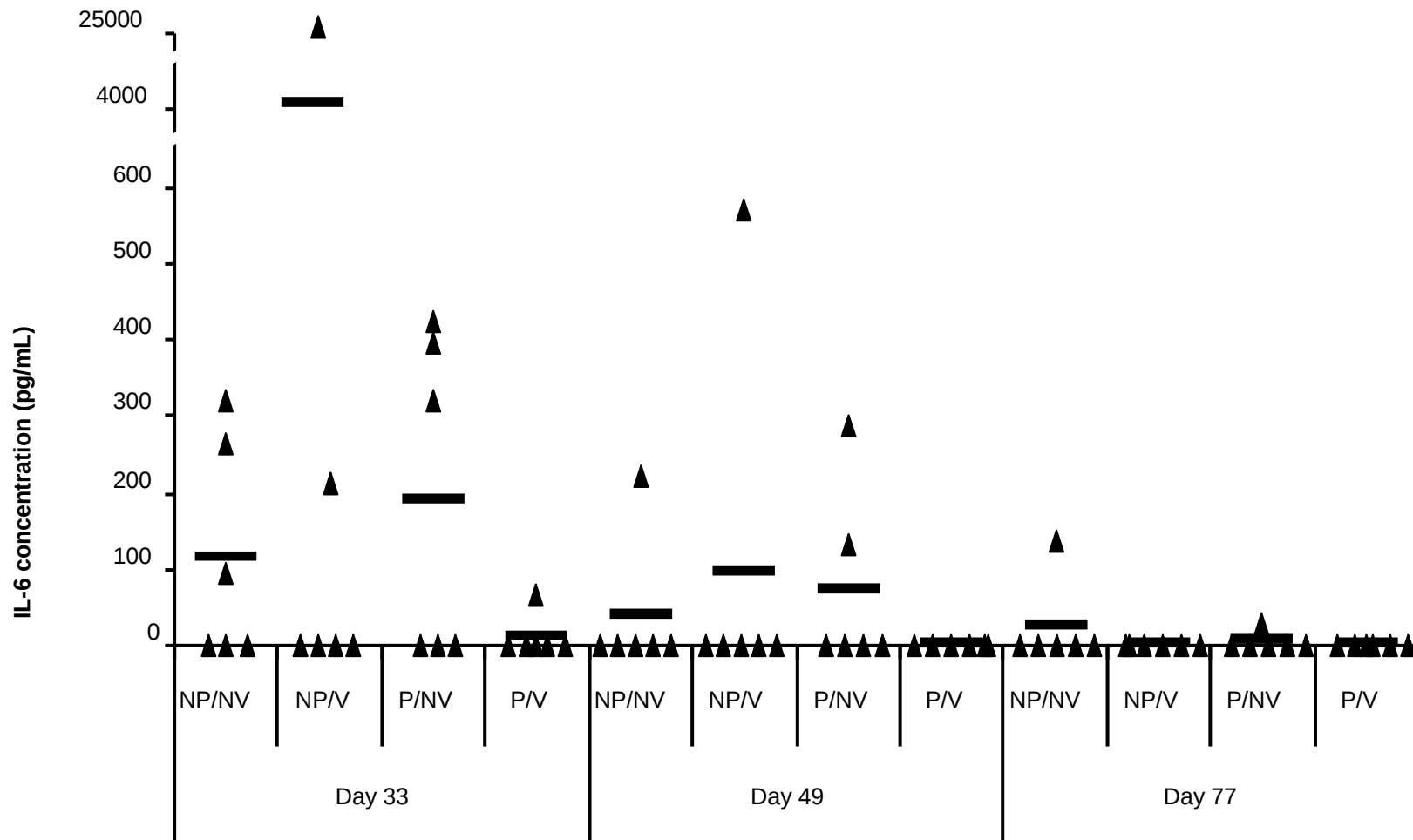


Inmunidad adquirida

- Título viral
- IFN γ por ELISA
- Anticuerpos anti-PRRSV por ELISA
- Anticuerpos seroneutralizantes de PRRSV por ELISA

NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS
ENTRE LOS GRUPOS

Niveles de IL-6



Fruto científico

- 1 comunicación científica en el V congreso de “Emerging and reemerging swine diseases, 2007, Cracovia, Polonia.
- Dos comunicaciones científicas en el IPVS 2008 de Durban, South Africa.
- 1 artículo científico en la revista Vet. Immunology and Immunopathology. Fraile et al 2009. Enviado para su publicación.

Experiencia práctica

(Fraile et al, 2009. Journal of Swine health and production (January).
Aceptado para publicación)

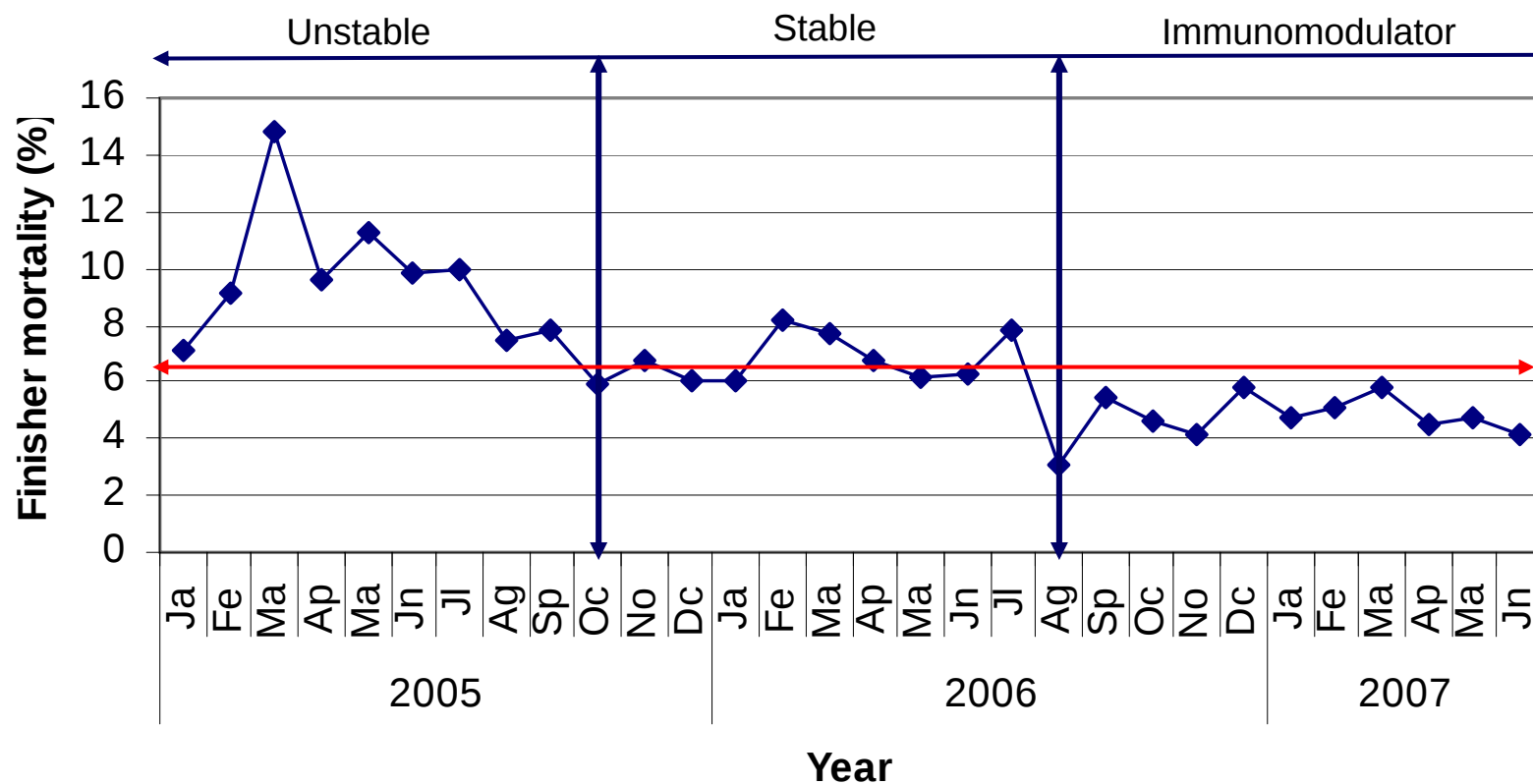
Información práctica disponible

- Se ha utilizado ampliamente en dos grandes empresas de producción porcina. En estas dos empresas se han monitorizado los resultados obtenidos en tres sistemas productivos diferentes:
 - Empresa 1: **Se ha puesto IM desde la semana 5 a la 13 de vida de los animales.** En esta se comparan los resultados por SPC con la situación anterior.
 - Empresa 2 (sistema 1): **Se ha puesto IM desde la semana 9 a la 17 de vida de los animales.** En ésta se comparan los resultados por SPC con la situación anterior.
 - Empresa 2 (sistema 2): **Se ha puesto IM desde la semana 9 a la 17 de vida de los animales.** En esta se comparan grupos tratados y no tratados.

Empresa 1

- Empresa de producción porcina de 7000 madres.
- Diagnóstico confirmado de PRDC por PRRS y PCV2.
- Cada mes produce 12.000 cerdos.

Mortalidad cebadero (empresa 1)



Media nacional

Empresa 2 (sistema 2)

- Empresa de producción porcina de 2135 madres.
- Diagnóstico confirmado de PRDC por PRRS.
- Cada mes produce 3600 cerdos.
- Se comparan datos de 28.200 cerdos sin tratar versus 13.000 tratados.

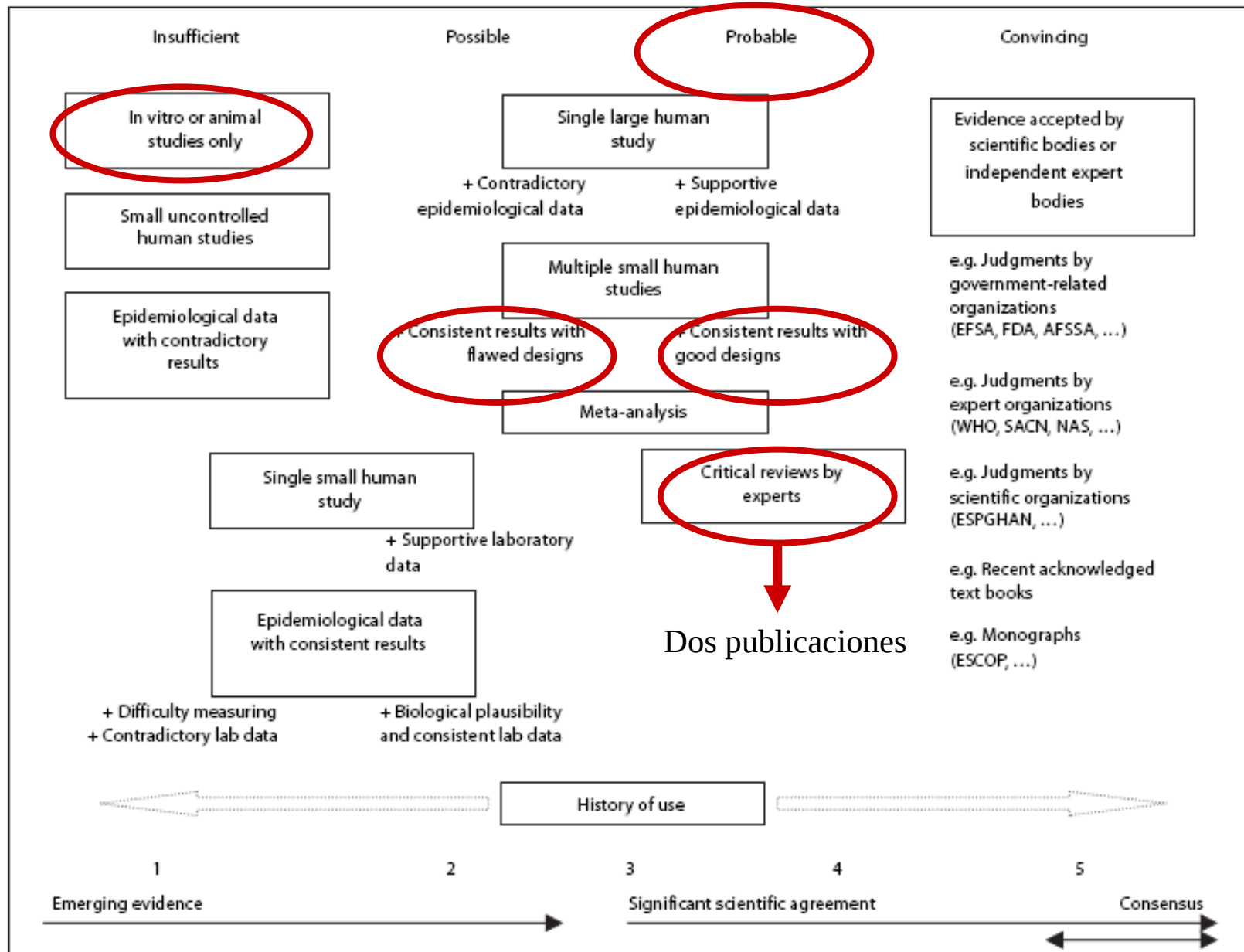
Resultados para la Empresa 2 (sistema 2)

Mortality and zootechnical parameters observed in Company 2 (system 2) for control and treated batches

Parameter	Control	Treated (with immunomodulator)	P value (ANOVA)
Average daily gain (gr/day)	601,6 (43,60)	664,7 (29,8)	0,02
FCR	2,549 (0,11)	2,488 (0,067)	0,325
Mortality (%)	7,52 (1,78)	4,58 (0,50)	0,0089

FCR means feed conversion ratio

Resumen de la información disponible



CReSA

Centre de Recerca en Sanitat Animal



Universitat
Autònoma
de Barcelona



Generalitat
de Catalunya

CReSA
Centre de Recerca en Sanitat Animal