

T  
1005

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

60331

**DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE  
LINFOCITOS T Y EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL  
RECEPTOR DE IL-2 EN BOVINOS VACUNADOS CON BCG  
Y EL EXTRACTO PROTEÍCO DEL FILTRADO DE CULTIVO  
DE *Mycobacterium bovis***

**GONZÁLEZ GONZÁLEZ XOCHITL EVA**

**PRESENTA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. JORGE TORRES BARRANCA**

**ASESORES  
M. C. LAURA JARAMILLO MEZA  
DR. FERNANDO DÍAZ OTERO**

**SEPTIEMBRE 2010**

LA INVESTIGACIÓN SE EFECTUÓ EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA  
DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA  
ANIMAL (CENID-MICROBIOLOGÍA-ANIMAL) DEL INIFAP, COMO PARTE DE  
LAS INVESTIGACIONES DEL PROYECTO:

“DESARROLLO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN  
DE ANIMALES VACUNADOS DE INFECTADOS NATURALMENTE EN LA  
TUBERCULOSIS BOVINA.

**inifap**

Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

TRABAJO PARCIALMENTE FINANCIADO CON FONDOS FISCALES 2009.  
PROYECTO N° 3216943P

*"Es muy común recordar que alguien nos debe agradecimiento, pero es más común no pensar en quienes le debemos nuestra propia gratitud"*

## **GRACIAS**

### **A MIS PADRES**

Por su esfuerzo por darme una buena educación y enseñarme valores.

### **A MIS HERMANOS**

Erendira, Semiramis y Agustín por su paciencia y comprensión.

### **J. A. VILCHIS**

Por su apoyo y su amor.

### **A MIS ASESORES**

M. C. Laura Jaramillo Meza por ser mi mentor y formarme en el área de investigación.

Dr. Fernando Díaz Otero por su paciencia

# INDICE

	Pag.
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
1.2 Importancia de la tuberculosis bovina en salud pública	2
1.3 Impacto económico de la tuberculosis en la industria pecuaria	3
1.4 Morfología, estructura y composición del genero <i>Mycobacterium</i> .	4
1.5 Inmunidad de la tuberculosis bovina	6
1.6 Vacunas.	10
2 HIPÓTESIS	13
3 OBJETIVO GENERAL	13
4 OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
5 MATERIAL Y METODOS	14
5.1 Animales de estudio	14
5.2 Diseño experimental	14
5.3 Obtención del extracto proteico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i>	15
5.4 Obtención de la vacuna BCG Phipps	15
5.5 Estimulación in vitro de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	17
5.6 Prueba de interferón-gamma (INF- $\gamma$ )	17
5.7 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	18
5.8 Obtención de células mononucleares para citometría	18
5.9 Estimulación de linfocitos	19
5.10 Marcaje de receptores para citocinas en membrana celular de linfocitos de bovino	19
5.11 Anticuerpos monoclonales	20
5.12 Citometría de flujo	21
5.13 Análisis estadístico	21
6 RESULTADOS	22

6.1 Producción de IFN- $\gamma$ en becerras vacunas con BCG, CFPE y grupo control	22
6.2. Evaluación de la respuesta humoral en becerras vacunas con BCG, CFPE y grupo testigo	25
6.3 Niveles celulares de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en animales negativos y animales positivos a la tuberculina por medio de citometría de flujo	27
6.4 Niveles celulares de linfocitos T CD4+ en los diferentes grupos	30
6.5. Niveles celulares de linfocitos T CD8+ en los diferentes grupos	31
6.6. Niveles celulares de linfocitos T CD25 en los diferentes grupos	33
6.7. Niveles celulares de linfocitos T $\gamma/\delta$ en los diferentes grupos	35
6.8. Niveles celulares de linfocitos TCD45RO+ en los diferentes grupos	36
7 DISCUSIÓN	37
8 CONCLUSIÓN	46
9 BIBLIOGRAFÍA	48

## RESUMEN

La tuberculosis bovina (TB) es producida por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), esta micobacteria puede infectar a una gran variedad de especies, siendo una zoonosis. No existen muchos estudios en bovinos donde se evalué las vacunas contra TB y su determinación de los diferentes componentes de la respuesta inmune, es por eso la necesidad de entender como se comportan las diferentes subpoblaciones y así poder desarrollar vacunas efectivas contra la tuberculosis bovina. Los objetivos fue determinar la cinética de la respuesta inmune celular/humoral y analizar las diferentes subpoblaciones de linfocitos en los grupos de animales vacunados (BCG y CFPE) y testigo, determinando los marcadores de superficie para linfocitos T CD4+, CD8+, CD25 (receptor de IL-2),  $\gamma\delta$  y CD45RO (células de memoria), por medio de citometría de flujo. Se utilizaron 5 becerros por grupo menores a 30 días de edad, libres a tuberculosis bovina (TB), el grupo de BCG se vacuno con una dosis de  $10^4$  UFC, el grupo con CFPE se aplico 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y el grupo testigo se inoculo con PBS estéril, la ruta de aplicación fue subcutánea. Para el análisis de resultados se realizo la prueba de varianza multivariada (MANOVA). En donde obtuvimos que el grupo vacunado con BCG principalmente sus subpoblaciones que obtuvieron mayor porcentaje de expresión fue en la subpoblación de linfocitos CD4+, mientras que para el grupo vacunado con CFPE las subpoblaciones con mayor expresión fueron los linfocitos T  $\gamma\delta$ , CD25 y CD45RO. Con lo cual podemos concluir que la presencia de micobacterias ambientales y micobacterias patógenas fue un factor determinante en el establecimiento de la respuesta inmune, la producción del IFN-  $\gamma$  por la vacunación (BCG y CFPE), fue evidente únicamente entre los 30 y 60 días, el empleo de dosis bajas ( $10^4$  UFC), fue determinante en la proliferación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, se evidencio una proliferación de las células T CD4+ preferentemente en el grupo de BCG. La relación CD4/CD8 fue mayor a los 30 días con CFPE y BCG con respecto al grupo control. Para la evaluación de los linfocitos CD25 y  $\gamma\delta$  fue determinante la presencia de micobacterias ambientales y micobacterias patógenas, ya que no hubo un

aumentó significativo. El BCG y el CFPE fueron inmunogénicos y no dañinos. Por lo tanto la propuesta de este trabajo que la aplicación de estos inmunógenos son de interés para el control de la TB conjuntamente con medidas de bioseguridad.



## ABSTRACT

Bovine tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), the mycobacteria can infect a wide variety of species, being a zoonosis. There are many studies that evaluate cattle vaccines against TB and determination of the different components of the immune response, which is why the need to understand how they behave and the different subpopulations and to develop effective vaccines against bovine tuberculosis. The objectives was to determine the kinetics of the cellular immune response/humoral and analyze the different subpopulations of lymphocytes in groups of vaccinated animals (BCG and CFPE) and control, determining the surface markers for CD4+, CD8+, CD25 (receptor II-2),  $\gamma\delta$  and CD45RO+ (memory cells), using flow cytometry. We used five calves per group under 30 days old, free of bovine tuberculosis (TB), BCG group was vaccinated with a dose of  $10^4$  CFU, the group was applied CFPE 300 mg/ml and the control group was inoculated with sterile PBS, the route was subcutaneous application. For the analysis of results was performed multivariate variance test (MANOVA). Where we got the group vaccinated with BCG sub-population mainly obtained higher percentage of expression was in the subpopulation of CD4+, while for the vaccinated group CFPE subpopulations with higher expression were  $\gamma\delta$  T cells, CD25 and CD45RO+. This leads us to conclude that the presence of environmental mycobacteria and pathogenic mycobacteria was a factor in the establishment of the immune response, IFN-g production by vaccination (BCG and CFPE) was apparent only between 30 and 60 days The low-dose ( $10^4$  CFU), was instrumental in the proliferation of different subpopulations of T lymphocytes, was noticed a proliferation of CD4+ T cells preferentially in the BCG group. The CD4/CD8 ratio was higher at 30 days with CFPE and BCG with regard to the control group. For the evaluation of CD25

lymphocytes and  $\gamma\delta$  was determining the presence of environmental mycobacteria and pathogenic mycobacteria, since there was a significant increase. The BCG and CFPE were immunogenic and not harmful. Therefore the proposal for this work that the application of these immunogens are of interest for TB control in conjunction with biosecurity measures.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad muy antigua que toma importancia cuando el hombre empieza a tener una vida sedentaria <sup>1</sup>. El bacilo tuberculoso se ha reconocido en esqueletos de la Edad de Piedra en donde la tuberculosis posiblemente coexistía con otras enfermedades infecciosas. En momias Egipcias y en América precolombina también se han descubiertos restos con deformaciones óseas compatibles con el mal de Pott (tuberculosis ósea) <sup>2</sup>.

La tuberculosis era probablemente una enfermedad endémica en los animales mucho antes de afectar al hombre <sup>3</sup>. Se sospecha que las primeras infecciones de tuberculosis en humanos podrían haber sido producidas por *Mycobacterium bovis*, cuando el hombre pasó a vivir en aldeas y domesticó a los animales.

En 1882, el bacteriólogo alemán Robert Koch cultivó y aisló el bacilo tuberculoso al que denominó bacilo de Koch. En 1891 obtuvo una sustancia evaporando el filtrado de bacilos tuberculosos cultivados entre 6 y 8 semanas en medio glicerinado, a la que denominó tuberculina. En 1922 Albert Calmette y Camille Guérin lograron hacer la primera vacuna atenuada contra la tuberculosis a pesar de su controvertida protección se administró durante varias décadas a neonatos de un gran número de países alrededor del mundo.

La inmunidad mediada por células (CMI) es de gran importancia en el control de patógenos intracelulares, el desarrollo de una respuesta inmune por los linfocitos cooperadores (Th1) en la cual las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tienen un papel importante en la protección. La contribución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> está mediada principalmente a través de citocinas. Mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son considerados citotóxicos <sup>4</sup>. Estudios realizados demuestran que el número de células T  $\gamma/\delta$  en la circulación decrecen con los días de infección particularmente las que expresan el antígeno de diferenciación WC1 sugiriendo que el principal papel de este tipo de células está en una respuesta temprana a la infección <sup>5</sup>. Así como en la población de células TCD45RO<sup>+</sup> en humanos se han visto que responden rápidamente al reconocimiento del antígeno <sup>6</sup>.

La respuesta Th1 en el ganado después de la vacunación todavía no está muy clara como actúa, es por eso la necesidad de entender como se comportan las diferentes subpoblaciones y así poder desarrollar vacunas efectivas contra la tuberculosis bovina.

Por lo tanto el planteamiento de este trabajo radica en realizar un análisis comparativo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en los grupos de animales vacunados (BCG y CFPE) y testigo, determinando los marcadores de superficie para linfocitos T CD4+, CD8+,  $\gamma\delta$ , CD25 (receptor de IL-2) y CD45RO+ (células de memoria). Para cumplir con dicho objetivo se empleó la técnica de citometría de flujo, que es un método analítico, el cual determina la medición rápida de ciertas partículas o células suspendidas en líquidos, por sus características físicas o químicas que se producen de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de sus características más importantes de la citometría, es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como tamaño, formas, complejidad y cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo <sup>7</sup>.

## 1.2 IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN SALUD PÚBLICA

La tuberculosis bovina (TB) es producida por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), esta micobacteria también puede infectar a una amplia variedad de especies por lo que se considera como una zoonosis clásica, al considerarla como una infección que es transmisible naturalmente entre los animales y el ser humano <sup>8, 9, 10</sup>. Al iniciar la producción industrial de leche con establecimiento de grandes rebaños durante el siglo XX, propició las condiciones para el incremento de la infección por *M. bovis* en el ganado, lo que favoreció la transmisión del agente a las personas, principalmente a través del consumo de leche, influyendo en la epidemia de tuberculosis humana. Posteriormente la pasteurización de la leche redujo drásticamente la incidencia de infección por *M. bovis*, pero en regiones en desarrollo o donde ha existido una producción de subsistencia con consumo de leche cruda, persiste el riesgo de zoonosis mientras no se controle la tuberculosis

en el ganado o en otras poblaciones de animales que compartan su hábitat y mantengan la infección <sup>11</sup>. En algunos países desarrollados donde aún existe cierto consumo de leche no pasteurizada, se teme que la infección en el bovino pueda reflejarse en casos humanos <sup>12</sup>. Esto se ha visto agravado por la aparición de cepas de *M. bovis* multirresistentes a los antibióticos de elección en el tratamiento de la infección y por la epidemia mundial del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que favorece el desarrollo de la tuberculosis en seres humanos, sea debida a *M. tuberculosis* o a *M. bovis*.

Se estima aproximadamente 8 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes anuales, se ha informado que *M. bovis*, es responsable cerca de un 16% de las muertes por tuberculosis y más del 50% de casos de linfadenitis cervical en niños <sup>13, 14</sup>.

En la República Mexicana en el 2005 la tasa de prevalencia de tuberculosis en todas sus formas en el humano era del 27% <sup>15</sup>. De los cuales se considera que más del 10%, fueron producidos por *M. bovis* <sup>16</sup>.

### 1.3 IMPACTO ECONÓMICO DE LA TUBERCULOSIS EN LA INDUSTRIA PECUARIA.

La presencia de la enfermedad ocasiona serias pérdidas al sector productivo, pudiéndose analizarse desde dos aspectos diferentes:

Primer aspecto:

- ◆ Se reduce la eficiencia productiva de los animales que alcanzan el 10 %, ya sea en ganancia de kilos de carne como así también en producción de leche.
- ◆ Disminuye la fertilidad hasta un 6%.
- ◆ La duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia. El promedio de 270 días en la 1ª lactancia se reduce a la mitad en la séptima lactancia (131 días).
- ◆ Se produce una disminución gradual del peso, perdiendo un promedio de 15% del peso normal.

- ◆ Causa predisposición a otras enfermedades, como efecto secundario, pues hay reducción de la inmunidad.
- ◆ La esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre 5 y 10%.

Segundo aspecto: en el comercio interior y exterior: el diferencial de precios percibido por el productor por la venta de sus productos provenientes de animales enfermos, y las regulaciones sanitarias que influyen en mercados internacionales <sup>17</sup>.

En nuestro país se calcula en más de 250 millones de pesos anuales, por la eliminación de ganado infectado, decomisos de canales, ruptura de líneas genéticas, retrasos y disminución de las lactancias <sup>18</sup>.

#### **1.4 MORFOLOGIA, ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL GENERO *Mycobacterium*.**

La morfología particular es bacilar, ligeramente curvada, miden alrededor de 2-4µm de largo por 0.2-0.5µm de ancho, son inmóviles, aerobio o microaerófilo, no esporulan y no se encapsulan, la alta concentración de lípidos en su pared celular (60% en peso) las hace fuertemente hidrofóbicas, muy resistentes a agentes químicos y con una reducida permeabilidad a los diferentes colorantes, puede teñirse como Gram positivos, pero toman la tinción débil e irregular pero una vez teñidas resisten a la decoloración por los alcoholes acidificados, por lo que se les considera ácido-alcohol resistentes <sup>19</sup>. Las micobacterias requieren de medios de cultivo especiales debido a su crecimiento lento, algunas requieren medios con amonio como fuente de nitrógeno, glicerol o glucosa como fuente de carbono y algunas sales minerales; el más usado es el medio de Löwestein-Jensen a base de huevo coagulado. El crecimiento del bacilo de la tuberculosis depende del tipo de micobacterias si son de crecimiento rápido que tienen un tiempo de replicación entre 2-5 horas y tardan alrededor de 7 días y las de crecimiento lento que su tiempo de replicación es de 13 horas tardan de 3-4 semanas <sup>20</sup>.

Como todas las células procariotas, las micobacterias poseen una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica, por encima de esta membrana se

encuentra el rígido peptidoglicano que contiene N-glucolilmurámico en lugar de N-acetilglucosamina. Por medio de una unión fosfodiéster, el peptidoglicano se halla unido covalentemente al arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa. En la porción más distal y externa de los arabinogalactanos se hallan fijados los ácidos micólicos que tienen cadenas carbonadas largas (C60 a C90). Los glucolípidos son un grupo de compuestos (micolatos de trealosa, sulfolípidos, micósidos, etc) que se encuentran asociados no covalentemente a los ácidos micólicos y se ubican periféricamente en la pared. Los micolatos de trealosa (llamados factores de cordón porque su presencia produce cultivos que tienen forma de cordones serpenteantes) y sulfolípidos se encuentran principalmente en las cepas de micobacterias más virulentas. El lipoarabinomanano (LAM), es un compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática. El LAM es considerado como el equivalente micobacteriano del lipopolisacárido de las Gram negativas debido a que provoca una importante respuesta antimicrobiana en macrófagos. En las cepas de micobacterias más virulentas la arabinosa terminal del LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM) a diferencia de las cepas no virulentas no están recubiertas (AraLAM). Además, el LAM también podría servir como poro para el paso de los nutrientes a través de la pared celular<sup>19</sup> (figura 1).

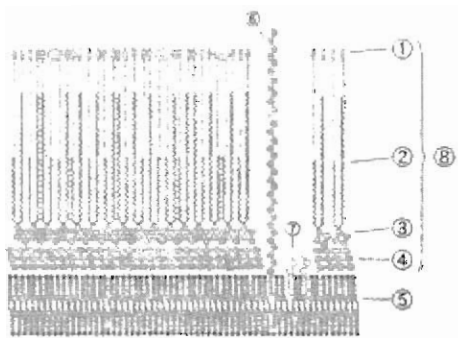


Figura 1. Pared celular de las Micobacterias: 1-Lípidos Externos, 2-Ácido Micólico, 3-Polisacárido (arabinogalactano). 4-Peptidoglicano, 5-Membrana Plasmática, 6-Lipoarabinomanano (LAM), 7-Fosfatidilinositol Manosido, 8-Esquema de la Pared Celular. Modificada de <http://en.wikipedia.org> (2009).

## 1.5 INMUNIDAD DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

El resurgimiento de la tuberculosis en todo el mundo; ha intensificado la investigación para examinar la defensa del huésped y los mecanismos patógenos que operan en la infección por *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Hasta ahora no existen métodos confiables para detectar una infección latente y aun en pacientes con tuberculosis activa puede no estar confirmada la infección <sup>21</sup>.

La principal respuesta inmune protectora contra las bacterias intracelulares esta mediada por células y consta de dos tipos de acciones: la muerte de los microorganismos fagocitados como resultado de la activación de los macrófagos por las citocinas en particular interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), derivada de los linfocitos T y la lisis de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> <sup>22</sup>. La respuesta inmunitaria innata frente a las bacterias intracelulares depende principalmente de los fagocitos y de las células asesinas naturales (células NK). Los fagocitos, inicialmente los neutrófilos y posteriormente las macrófagos ingieren e intentan destruir estos microorganismos. Las bacterias intracelulares activan a las células NK, directamente o estimulando en los macrófagos la producción de interleucina-12 (IL-12), una potente citocina activadora de las células NK <sup>22</sup>.

La IL-12 es producida por macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, estimula específicamente la actividad de los linfocitos Th1. Estas células producen principalmente dos citocinas IL -2 e IFN- $\gamma$  <sup>23</sup>. La IL-2 es producida únicamente por células Th1. actúa de forma autocrina y paracrina sobre linfocitos T, B, células NK y macrófagos. Los receptores de IL-2 tienen cadenas alfa (CD25), beta (CD122) y gamma. La IL-2, es producida normalmente por el cuerpo durante una respuesta inmune mediante la unión del antígeno al receptor de células T (TCR), estimula la secreción de IL-2, y la expresión de IL-2 receptores (IL-2R). La interacción IL-2/IL-2R estimula el crecimiento, diferenciación, supervivencia de las células T citotóxicas y desarrollo de células T de memoria inmunológica. Como se mencionó antes el IFN- $\gamma$  es producido por los linfocitos T, así como por algunos linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NK <sup>23</sup>. El IFN- $\gamma$  estimula la activación de los macrófagos para que produzcan diversas sustancias microbicidas, como productos reactivos de



oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosómicas. El IFN- $\gamma$  también favorece la producción de isotipos de anticuerpos que activan el complemento y opsonizan bacterias para su fagocitosis, ayudando así a las funciones efectoras de los macrófagos <sup>24</sup>. Otra citocina importante para el control de la enfermedad es el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), es secretado por los macrófagos, las células T, B y los fibroblastos. Asimismo, actúa en forma sinérgica con el IFN- $\gamma$  para inducir la expresión de la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS<sub>2</sub>), involucrada en la producción de óxido nítrico (NO) que participa en la destrucción de *M. bovis* junto con los intermediarios de oxígeno <sup>25</sup>, el TNF- $\alpha$  mata a las células tumorales y produce necrosis en el centro de algunos tumores *in vivo*. Esto se debe a que estas células interpretan la unión del TNF- $\alpha$  con su receptor como una señal de apoptosis <sup>23</sup>. Se ha observado que la terapia anti-TNF- $\alpha$ , utilizada en el tratamiento de artritis reumatoide y enfermedad de Crohn, causa el desarrollo de TB diseminada como consecuencia de la reactivación de una tuberculosis latente, debido a una alteración en la formación de los granulomas existentes. Esto, indirectamente, demuestra la importancia del TNF- $\alpha$  en la formación del granuloma, que es un mecanismo de defensa para evitar la propagación de la infección y su participación en el control de la TB <sup>26</sup>.

Semanas después de la infección, está alcanza los ganglios linfáticos regionales, con la consiguiente activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (cooperadoras). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son los dominantes en la protección, tienen un papel crítico en la defensa contra los agentes patógenos intracelulares y extracelulares que resisten a la muerte después de ser capturados por macrófagos. Estos linfocitos se activan por señales de membrana emitidas por las propias células Th1 y por el IFN- $\gamma$  secretado por ellas. Una vez activados los macrófagos pueden matar bacterias intracelulares o ingeridas. Las células Th1 producen una variedad de citocinas y moléculas de superficie que no sólo activan macrófagos infectados, sino que también matan macrófagos viejos crónicamente infectados, estimulan la producción de nuevos macrófagos en la médula ósea y reclutan macrófagos al sitio de infección <sup>26</sup>. Además reconocen e interactúan con células B que han unido e internalizado antígenos extraños gracias a sus inmunoglobulinas de superficie.

Las moléculas que presentan el antígeno peptídico a los linfocitos T son glucoproteínas de membrana codificadas por un grupo de genes llamado complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) <sup>27</sup> (figura. 2).

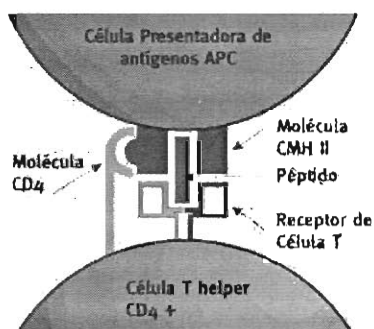


Fig. 2. Interacción célula presentadora de antígeno y linfocito. CD4+. Tomada de [www.smiba.org.ar](http://www.smiba.org.ar) (2009).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos son esenciales para la defensa contra agentes patógenos que viven dentro de las células. Estos linfocitos T citotóxicos pueden eliminar cualquier célula que albergue tales patógenos, reconociendo péptidos extraños que son transportados a la superficie celular unidos a moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos llevan a cabo su función lítica liberando dos tipos de proteínas citotóxicas preformadas. Las granzimas, que son capaces de inducir apoptosis en cualquier tipo de células blanco, y la perforina que forma poros y agujeros en la célula blanco a través de los cuales entran las granzimas. El ligando FAS, una molécula unida a membrana, expresada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y por algunos CD4<sup>+</sup>, también es capaz de inducir apoptosis por unión FAS expresado en la superficie de algunas células blanco. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos también producen IFN- $\gamma$ , importante en la expresión de MHC de clase I y de la activación de los macrófagos <sup>24</sup>. En bovinos se ha observado que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> están

no solo involucradas en la lisis de células específicas si no que son capaces de matar directamente a las micobacterias vía liberación de granzimas <sup>28</sup> (figura 3).

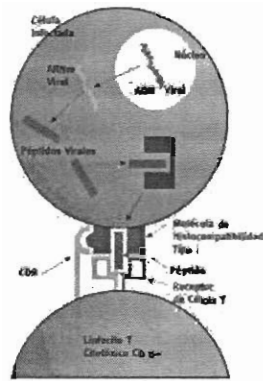


Fig. 3. Presentación asociada a la clase I del MHC entre linfocitos CD8 y una célula infectada. [www.smiba.org.ar](http://www.smiba.org.ar) (2009).

La función de las células T gamma / delta (linfocitos T  $\gamma/\delta$ ), no está claramente explicada, pero por su ubicación entre el medio externo y el medio interno es posible que representen la primera línea de defensa contra los agentes invasores, puede lisar células infectadas por micobacterias y algunas células leucémicas, reconoce proteínas de choque térmico bacterianas (HSP). Los linfocitos  $\gamma/\delta$  responden de manera predominante en la reacción de linfocitos mixtos, lo cual indica que pueden reconocer antígenos del MHC extraños y también pueden ser citotóxicos <sup>23</sup>, esta población de linfocitos tienen un rol de protección, antiinflamatorio y de regulación <sup>29, 30, 31, 32</sup>. Los linfocitos que expresan el receptor  $\gamma/\delta$  son un linaje distinto al de los linfocitos T que expresan  $\alpha/\beta$ , que son los más numerosos en humanos <sup>33</sup>. Una característica de los linfocitos T  $\gamma/\delta$  es su abundancia en los tejidos epiteliales de ciertas especies; en los rumiantes constituyen hasta un 60% de la población de linfocitos T. En rumiantes las células T  $\gamma/\delta$  se dividen en 2 subpoblaciones basada en la expresión de la molécula workshop cluster 1 (WC1): WC1<sup>-</sup> y WC1<sup>+</sup> <sup>34</sup>. Los estudios anatómicos han demostrado que las células WC1<sup>+</sup> representan del 10 al 22 % de las células en los ganglios linfáticos sanos, y constituyen entre el 10-50% de los linfocitos de sangre

periférica<sup>35, 36</sup>. El WC1<sup>+</sup> se encuentra predominantemente en la pulpa roja del bazo, con menor número de células en los órganos linfoides secundarios<sup>34, 35, 36</sup>.

La molécula de CD45 es un antígeno de diferenciación panleucocitario, del que se conocen diferentes isoformas que permiten caracterizar subtipos de linfocitos T funcionalmente diferentes: RA o RO. El antígeno CD45 juega un papel clave en la superficie celular en la regulación de las señales mediadas por el receptor de la célula T (TCR)<sup>37</sup>. La mayoría de las células T neonatales y las células T adultas con poca capacidad de respuesta a la estimulación antigénica, son llamadas células vírgenes, pertenecen a la subpoblación que expresa la isoforma de CD45RA de elevado peso molecular, mientras que la isoforma de bajo peso molecular, CD45RO, la expresan las células T denominadas células de memoria que han sido previamente activadas por un antígeno y que responden bien a un antígeno de recuerdo<sup>38</sup>.

## 1.6 VACUNAS

Las vacunas utilizadas para la tuberculosis bovina se pueden dividir dentro de cuatro categorías:

Vivas atenuadas: son microorganismos que han sido cultivado expresamente bajo condiciones en las cuales pierden sus propiedades nocivas. Estas vacunas tienen la desventaja de que no son estables, necesitan un manejo correcto de la cadena de frío. Suelen provocar una respuesta inmunológica más duradera produciendo linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ .

Vacunas muertas o inactivadas: están formadas por el o los microorganismos completos pero inactivado por algún método físico o químico. Estas vacunas, presentan como principales ventajas; su estabilidad y seguridad, así como su conservación. Sin embargo, suelen inducir una respuesta inmunitaria menor que las vacunas atenuadas, fundamentalmente ligada a linfocitos CD4<sup>+</sup> con producción de anticuerpos.

Conjugadas: ciertas bacterias tienen capas externas de polisacáridos son mínimamente inmunológicos. Poniendo en contacto estas capas externas con

proteínas, el sistema inmunitario puede ser capaz de reconocer el polisacárido como si fuera un antígeno. Producen linfocitos CD4<sup>+</sup> y anticuerpos.

Vacuna de ADN: es una vacuna de desarrollo reciente, es creada a partir del ADN de un agente infeccioso. Funciona al insertar ADN de bacterias o virus dentro de células humanas o animales. Algunas células del sistema inmunitario reconocen la proteína surgida del ADN extraño y atacan tanto a la propia proteína como a las células afectadas. Dado que estas células viven largo tiempo, si el agente patógeno que normalmente produce esas proteínas es encontrado tras un periodo largo, serán atacadas instantáneamente por el sistema inmunitario. Una ventaja de las vacunas ADN es que son muy fáciles de producir y almacenar.

Los requisitos ideales de una futura vacuna para la tuberculosis bovina son: que sea segura, estable y poco costosa, que brinde protección, a nivel mundial, contra la infección y contra la enfermedad, que proteja con una sola aplicación, que induzca memoria inmunológica prolongada, que no afecte en la prueba de la tuberculina <sup>39</sup>.

La vacuna BCG fue desarrollada por Calmette y Guérin a partir de una cepa de *M. bovis*, que fue subcultivada cada tres semanas durante 13 años con un total de 231 pases, hasta que perdió su virulencia. La primera vacuna viva atenuada fue utilizada por vía oral en París en 1921. A partir de 1974 a 1992 la vacunación con BCG fue incluida en el programa ampliado de vacunación de la OMS en la mayoría de los países. En la actualidad la vacuna BCG ha sido desarrollada de múltiples subcepas cultivadas en diferentes laboratorios, lo cual ha producido nuevas cepas con características diferentes en cuanto a virulencia e inmunogenicidad. Los ensayos clínicos de eficacia han demostrado grandes variaciones en la protección, que se reporta entre el 0 y un 80% <sup>40</sup>. Para explicar estas diferencias se han propuesto diferencias en la potencia de las diferentes cepas, en las dosis de BCG e interferencia en la respuesta inmune a la BCG por contacto previo con otras micobacterias. Estudios subsecuentes a partir de 1980 indican un mayor grado de protección de la vacuna de la BCG para las formas graves de tuberculosis, con una eficacia que varía entre el 85 y 100% para la meningitis tuberculosa. En la actualidad se acepta que la vacuna de la BCG puede

prevenir la reinfección endógena y evitar la diseminación de la infección tuberculosa, y por lo tanto disminuir las formas graves de la enfermedad como la tuberculosis miliar y meníngea. Así como en humanos la eficacia de la vacuna en el ganado es variable y puede interferir con la interpretación de la prueba intradérmica <sup>5</sup>. Los estudios realizados con BCG, aplicada durante el periodo neonatal sugieren una buena protección. La vacuna BCG es un inmunógeno muy complejo que induce una respuesta inmunocompleja y básicamente de tipo celular. Estudios para conocer más esta respuesta inmune mediada por células, particularmente en modelos de ratón, ha demostrado que hay poblaciones heterogéneas de células T que tienen diversos roles en la inmunidad anti-micobacteriana. Es aceptado que las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> tienen un rol protectorio <sup>28</sup>. Otras poblaciones de células son también consideradas por estar involucradas en la inmunidad anti-micobacteriana pero la importancia de cada tipo de célula no está bien entendido. En la tuberculosis bovina, las investigaciones del rol de las subpoblaciones de las células T han incluido monitoreos en el cambio de los niveles de linfocitos en sangre periférica seguida de una infección con *M. bovis* <sup>33</sup>. Estos estudios han demostrado que el número de las células T  $\gamma/\delta$  en la circulación decrece con los días de infección, particularmente las que expresan el antígeno de diferenciación WC1<sup>+</sup>, sugiriendo que tienen un papel en la respuesta temprana de la infección <sup>34</sup>. Así como las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> que se ha demostrado que son productoras de IFN- $\gamma$  teniendo esta, un papel muy importante en la inmunidad anti-micobacteriana, incluyendo la activación de los mecanismos microbicidas de los macrófagos <sup>35</sup>.

El extracto proteico del filtrado de cultivo (CFPE) *M. bovis* y de *M. tuberculosis* se ha reportado que son buenos estimulantes de células T y han demostrado una protección potencial de antígenos contenidos en el filtrado de cultivo <sup>41</sup>. Numerosas proteínas micobacterianas han sido aisladas y caracterizadas, algunas de las cuales se encuentran asociadas a la célula bacteriana y otras son secretadas. Los antígenos específicos inducen una inmunidad protectora de los linfocitos Th1 en la que participan en forma importante los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, los cuales son esenciales en la inmunidad protectora porque secretan citocinas,

como la IL 12 y como ya se menciono el IFN- $\gamma$ , con lo cual activan macrófagos que fagocitan y eliminan a la bacteria <sup>42, 43</sup>

Sin embargo, se ha observado que las micobacterias vivas, son más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, comparada con las preparaciones de micobacterias muertas; esta observación se ha utilizado como argumento para sostener que los antígenos secretados presentes en el CFPE micobacteriano, producido por el metabolismo activo bacteriano, son esenciales para la inducción de una inmunidad protectora <sup>44</sup>.

Este tipo de vacuna no induce reacción a la prueba de tuberculina y la efectividad de la vacuna puede no ser influenciada por previa sensibilización de micobacterias ambientales <sup>45, 46, 47</sup>.

## **1. HIPÓTESIS**

Tanto la BCG como las proteínas presentes en el CFPE de *Mycobacterium bovis* son inmunógenos relevantes, capaces de inducir una respuesta inmune protectora. Esto se verá reflejado en la expresión de diferentes receptores que puedan definir una respuesta Th1 y Th2.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un análisis comparativo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en los grupos de animales vacunados y testigo, determinando los marcadores de superficie para linfocitos T CD4+, CD8+,  $\gamma/\delta$ . CD25 (receptor de IL-2) y CD45RO (células de memoria).

## **3. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 4.1** Comparar la respuesta inmune de becerras vacunadas con CFPE, con BCG cepa Phipps y animales testigo, por medio de IFN- $\gamma$  y ELISA.

4.2 Determinar si existe una dinámica de cambio de las poblaciones celulares durante el período de evaluación mediante citofluorometría de flujo.

## 5. MATERIAL Y METODOS.

### 5.1. ANIMALES DE ESTUDIO.

Se utilizaron 5 animales adultos de la raza Holstein-Friesian, para la estandarización de la técnica de citometría de flujo, considerando 3 animales positivos a las pruebas de tuberculina. IFN- $\gamma$  y ELISA, las cuales durante un periodo de 3 años, se les había dado seguimiento y estaban estabulados dentro de un hato de segregación. Por otro lado se consideraron 2 animales negativos a estas mismas pruebas los cuales se encontraban en un hato de baja prevalencia ( $\leq$  de 4 %). Y 15 becerras de la raza Holstein-Friesian, de entre 15-30 días de edad, provenientes de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo.

### 5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales se evaluaron inicialmente por medio de IFN- $\gamma$  para la detección de la inmunidad mediada por células, y ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra proteínas de *M. bovis* y PCR de exudado nasal para identificar el DNA específico de genoma de *M. bovis*, todas estas pruebas se realizaron para determinar su estatus de animal libre de la enfermedad. Las becerras provinieron de madres negativas a la prueba de tuberculina y así mismo se alimentaron con calostro de madres negativas.

Los animales fueron divididos en tres grupos con 5 animales cada uno. El grupo 1 se inoculó con la vacuna BCG cepa Phipps de *M. bovis* subcutáneamente en la tabla del cuello a una dosis de  $1 \times 10^4$  UFC en 1ml de buffer de fosfatos (PBS) estéril. El grupo 2 se inoculó con el CFPE a una dosis de 300  $\mu\text{g/ml}$ . El grupo 3 fue el testigo al cual únicamente se le inoculó 1 ml PBS como placebo.



### **5.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO DE FILTRADO DE CULTIVO DE *M. bovis*.**

La cepa de micobacterias que se empleo para la obtención del CFPE fue *M. bovis* AN5. Los sobrenadantes del cultivo fueron donados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE); el procedimiento para la obtención de los sobrenadantes fue el siguiente; los cultivos se incubaron a 37° C durante 6 semanas en medio líquido de Dorser-Henley <sup>48</sup>, las proteínas presentes en el filtrado de cultivo se precipitaron con cristales de sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>] con una saturación final del 80 %, con agitación constante a 4° C por 24 horas (hrs). Al termino de este tiempo, la solución se centrifugó a 4° C por 60 minutos (min) a 10,000 rpm (Beckman rotor JS-13.1), el precipitado, fue resuspendido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, estéril posteriormente se dializó contra PBS, en bolsas de diálisis (Spectra/Por No. 3787-D40), con punto de corte de 12 a 14 kDa a 4° C durante 36 hrs con 4 cambios de 2 litros (lts) cada uno. Después del dializado se comprobó la ausencia de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> con cloruro de bario. El material obtenido se designó como extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteína del CFPE se determino por el método de Bradford, para fines prácticos se ajusto a 35 µg/ml de proteína y se dividió en alícuotas de 1 ml, las cuales se almacenaron a -70° C hasta su empleo <sup>49</sup>.

### **5.4 OBTENCIÓN DE LA VACUNA BCG PHIPPS**

La cepa Phipps de BCG de *M. bovis*, se creció en medio Middlebrook 7H11 (Bacto Difco Laboratories, Detroit MD, USA), enriquecido con 10 % de OADC (Oleica acid-Albumin-Dextrose-Catalase) (BBL Middlebrook OACD Enriciment, Becton Dickinson, Sparks MD, USA), por tres semanas, posteriormente estas colonias se sembraron en 30 ml de medio Middlebrook 7H9 líquido (BBL Middlebrook 7H9 Broth Base, Bector Dickinson, Cockeysviile MD, USA), enriquecido con 10 % de ACD y 0.5 % de Tween 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para mantener dispersas las bacterias en tubos de polipropileno de 50 ml y se incubo por 8 días a

37° C con agitación constante a 100 revoluciones por minuto (rpm) en atmósfera húmeda.

La cinética se empezó cuando se transfirieron los 30 ml del cultivo anterior a 270 ml de medio fresco Middlebrook 7H9 en un recipiente de poliestireno de 600 ml de capacidad, bajo las condiciones antes descritas, tomando este momento como día cero de la cinética y se midió con un espectrofotómetro a 650 nanómetros (nm), tomando como índice basal la medición obtenida de un alícuota de agua bidestilada estéril y como control de crecimiento una alícuota de medio de cultivo estéril. Las mediciones se realizaron de la forma descrita cada 24 hrs durante tres semanas. Se gráfico el logaritmo de las lecturas de densidad óptica para esquematizar el crecimiento de la cepa e identificar la fase logarítmica media en la cual se detuvo su crecimiento por congelación a -80° C. Posteriormente se realizo diluciones seriadas de acuerdo con el siguiente formato:

No. de Dilución	Vol. y suspensión utilizada	Vol. PBS	Factor de dilución
1	Alícuota original (0.5 ml)	2,5 ml	5
2	Dilución 1 (100 µl)	4.9 ml	250
3	Dilución 2 (100 µl)	4.9 ml	12,500
4	Dilución 3 (100 µl)	4.9 ml	625,000
5	Dilución 4 (100 µl)	4.9 ml	31,250
6	Dilución 5 (100 µl)	4.9 ml	1,562,500,000

Se sembró 100 µl de las diluciones 4, 5 y 6 en cajas de Petri con medio 7H10 suplementado con OADC, se realizo el conteo de colonias, la concentración celular de las alícuotas congeladas se calculo y se ajusto, antes de utilizar la suspensión, a  $1 \times 10^6$  CFU/ml en PBS. A fin de verificar el número de bacterias inoculadas, el conteo de UFC es repetido utilizando la suspensión ajustada<sup>50</sup>.

## **5.5 ESTIMULACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC).**

Se obtuvo una muestra de 7 ml de sangre de la yugular de las becerras en tubos con heparina. La muestra se trasladó al laboratorio y la sangre se cultivó siguiendo el protocolo de Rothel *et al*<sup>51</sup>. En una placa de cultivo de 24 pozos se adicionó a tres pozos 1.5 ml de sangre heparinizada de cada animal. Cada uno se estimuló con 100 µl de PPD bovino (20 µg/ml), 100 µl de PPD aviar (20 µg/ml) y un pozo sin estimular como testigo. El cultivo se incubó por 24 hrs, en estufa de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37° C. Se obtuvo el plasma y se congeló a -70° C hasta la realización de la prueba de ELISA para detectar los niveles de IFN-γ.

## **5.6 PRUEBA DE INTERFERÓN-γ (IFN-γ)**

Por medio de esta prueba se determinó la inmunidad celular cuantificando los niveles de IFN-γ, por medio de un kit comercial (BOVIGAM™ Bovine Gamma Interferón Test). En una placa de 96 pozos se adicionó 50 µl de diluyente verde y seguido se depositó 50 µl de cada plasma, se trabajaron por duplicado. De la misma forma se depositaron 50 µl de control positivo y negativo por cada placa. Se incubó a 37° C durante 1 h. Posterior a la incubación se decantó el contenido y se realizó cinco lavados utilizando la solución buffer de lavado adicionando 200 µl. Se preparó el conjugado de acuerdo al instructivo de uso, colocando para cada placa de 96 pozos 12 ml de diluyente azul por 120 µl de conjugado (anticuerpo anti- IFN-γ bovino) se colocaron 100 µl en cada pozo y se incubó por 1 h a 37° C. Se decantó transcurrido el período de incubación y nuevamente se lavó cinco veces. Se preparó el cromógeno tetrametilbencidina (TMB) más la solución buffer de enzima sustrato, se preparó colocando 12 ml de enzima por 120 µl de cromógeno para una placa de 96 pozos; se adicionaron 100 µl a cada pozo, se incubó a temperatura ambiente por 30 min protegidos de la luz, posteriormente se agregó la solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 450 nm.

## 5.7 ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Se sensibilizaron placas (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp) de 96 pozos con 10 µg/ml de CFPE de *M. bovis* y *M. avium* por separado respectivamente con solución buffer de carbonatos pH 9.6, 0.06M, adicionando 100 µl por pozo; se incubaron toda la noche a 37° C. Posteriormente se lavo cinco veces con solución de lavado, buffer de fosfatos 0.01M, pH 7.4 (PBS) con NaCl y 0.1 % de Tween 20 (PBST); adicionando 200 µl por pozo después se bloqueo con 100 µl de solución bloqueadora (leche descremada al 1.5 % en PBST), incubando en estufa 37° C por 1 h. Transcurrido el tiempo se decanto y se lavo cinco veces con PBST, y se adiciono 100 µl de los sueros problema diluidos 1:50 en PBS por duplicado así como un suero positivo y un suero negativo incubando nuevamente por 1 h a 37° C. Posteriormente se realizo cinco lavados con PBST, se agrego a cada pozo 100 µl de proteina G conjugada con peroxidasa (Protein G recombinant- peroxidase, SIGMA) diluida 1:10,000 en PBS y se incubo por 1 h a 37° C, transcurrido el tiempo se decanto y se lavo cinco veces, al término se adicionaron 100 µl de la solución de revelado de ortofenilendiamina en buffer de citratos pH 4.5, más 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %. La reacción se paro a los 10 min mediante la adición de 50 µl de la solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M) por pozo. Posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 492 nm <sup>52</sup>.

## 5.8 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA CITOMETRÍA

Se obtuvo una muestra de 7 ml de sangre de la vena yugular de las becerras en tubos con anticoagulante (heparina), se diluyo en una relación 1:2 con PBS estéril y se coloco cuidadosamente en un gradiente de Ficoll- Hypaque (d= 1.077 g/ml) en una relación 1:3. Se centrifugo a 2800 rpm por 40 min en centrifuga de cabezal de columpio (marca Eppendorf) y se recupero la interface de la capa rica en células mononucleares en tubos falcón de 15 ml, la suspensión celular se lavo dos veces con PBS estéril centrifugando 1500 rpm 5 min en cada lavado.

Se resuspendió el botón celular al final de los lavados en un mililitro de buffer de fosfatos conteniendo azida de sodio al 0.2 % y suero de albúmina bovina al 0.2 % (PBS-BSA) y se contó el número de células por mililitro utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó el volumen necesario de medio RPMI 1640 (1X) para obtener una suspensión celular de  $2.5 \times 10^6$  cel/ml.

## **5.9 ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS**

Las células se distribuyeron en placas de 24 pozos, colocando un volumen de 1.5 ml por pozo, se estimuló un pozo con el antígeno PPD bovis  $100 \mu\text{l}$  ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) y un pozo sin estimular como testigo. Se incubó en una estufa de  $\text{CO}_2$  al 5 % a  $37^\circ \text{C}$  por 72 hrs, al término de la incubación se colectaron las células de cada pozo colocándolas en tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min para empaquetarlas y posteriormente hacer el marcaje.

## **5.10 MARCAJE DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T Y RECEPTOR DE IL-2**

Las células ya empaquetadas se resuspendieron con PBS-BSA en un volumen de 1 ml, posteriormente se dividió este volumen en 4 partes ( $0.250 \mu\text{l}$ ) en tubos eppendorf 1.5 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, dejando el botón de células las cuales se resuspendieron con el primer anticuerpo con un volumen de  $5 \mu\text{l}$ . Incubando 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS-BSA en un volumen de 1 ml y se centrifugó a 1500 rpm 5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó el segundo monoclonal  $5 \mu\text{l}$  se resuspendió, incubando por 30 min a temperatura ambiente protegiendo las células de la luz. Terminando el período de incubación se lavó con PBS-BSA 1 ml, se centrifugó a 1500 rpm 5 min se decantó y se le agregó  $500 \mu\text{l}$  de Facs/flow y se leyó al citómetro.

## 5.11 ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales que se utilizaron para citometría de flujo son anticuerpos primarios dirigidos contra receptores de membrana, CD4+ línea celular IL-A11, isotipo IgG<sub>2a</sub>, CD8+β, línea celular BAT82A, isotipo IgG<sub>1</sub>, CD25, línea celular IL-2RA5, isotipo IgG<sub>2a</sub> receptor de IL-2, CD45RO, línea celular GC42A1, isotipo IgG<sub>1</sub> marcador de activación (células de memoria) y WC1-N3, línea celular CACTB32A, isotipo IgG<sub>1</sub> receptor de linfocitos γ/δ, todos ellos de la marca VMRD, Pullman, USA.

Los anticuerpos secundarios unidos a un fluorocromo son anti IgG<sub>1</sub> con isocianato de fluoresceína (FITC), 115-095-205 Jackson Immuno Research y anti IgG<sub>2</sub> marcado con R-ficoeritrina (R-PE), 115-115-206, Jackson Immuno Research (tabla 1).

Tabla 1.- Anticuerpos monoclonales primarios y secundarios empleados en la técnica de citometría de flujo.

1ER ANTICUERPO	CLONA	DILUCIONES	SUBPOBLACION	2DO ANTICUERPO	ISOTIPO
CD4*	IL-A11	1:500	Linfocito cooperador	PE*	Anti-IgG <sub>2</sub>
CD8*	BAT82A	1:5	Linfocito citotóxico	FITC	Anti IgG <sub>1</sub>
CD25*	IL-2RA5	1:300	Receptor de Interleucina-2	PE*	Anti-IgG <sub>2</sub>
CD45RO*	GC42A1	1:20	Linfocito de memoria	FITC*	Anti IgG <sub>1</sub>
WC1-N3*	CACTB32A	1:50	Linfocito γδ	FITC*	Anti IgG <sub>1</sub>

\* VMRD Jackson Immuno Research

## 5.12 CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el citofluorometro FACSCalibur (Becton Dickinson San José EU), para el análisis de los resultados se empleo el software WinMDI 2.8. Se analizo primero empleando un histograma de las poblaciones presentes regionalizando únicamente los linfocitos, excluyendo las demás células: monocitos, eritrocitos y dendritus celulares. Se leyó un total de 5000 eventos en cada análisis.

## 5.13 ANALISIS ESTADÍSTICO

Se realizo un análisis de varianza multivariada (MANOVA) siendo las variables dependientes: niveles de anticuerpos; niveles de IFN- $\gamma$ , niveles de CD25, niveles de CD4, niveles de CD8, niveles de CD45RO, niveles de WC1-N3, para evitar el problema de subestimación del error tipo II por múltiples veces de comparación. Si el resultado de MANOVA en su modelo completo resulta significativo, como esperamos de acuerdo con la lógica biológica y apoyando la hipótesis correspondiente, se llevará a cabo el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con el cual determinamos el efecto de tratamiento (BCG/CFPE/TESTIGO) en las variables de respuesta, las mismas variables que mencionamos anteriormente con MANOVA. Posterior a cada una de las pruebas estadísticas procedidas por ANOVA, en caso de que detectemos la diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tres tratamientos, llevaremos a cabo la comparación múltiple del método de Dunnett fijando el grupo con el tratamiento por placebo como control. Establecemos el nivel de significancia estadística como  $\alpha < 0.05$  y el poder  $(1-\beta) > 0.8$ . Se utilizo el paquete estadístico JMP Starte.

## 6 RESULTADOS

### 6.1. PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$ EN BECERRAS VACUNAS CON BCG, CFPE Y GRUPO TESTIGO

La evaluación de IFN- $\gamma$  en los diferentes grupos de animales vacunados bajo el estímulo del PPD bovis, al tiempo cero se observa que los niveles del IFN- $\gamma$  son mínimos con un valor promedio de densidad óptica (D.O) de  $0.181 \pm 0.1470$ , hubo un incremento a través de los días evaluados, siendo que a los 30 días postvacunación el grupo vacunado con BCG mostró un aumento mayor de 1.68 veces ( $0.7879 \pm 0.7457$ ), respecto al grupo vacunado con CFPE. El grupo vacunado con el CFPE ( $0.4871 \pm 0.2326$ ) comparado con el grupo testigo ( $0.6846 \pm 0.9168$ ) fue mayor 1.14 veces. Se observó posteriormente que el grupo vacunado con BCG, sus niveles fueron bajando. Para el grupo vacunado con CFPE su mayor expresión fue al día 60 con un valor mayor de 1.73 veces ( $0.8531 \pm 1.2997$ ) respecto al grupo vacunado con BCG ( $0.4940 \pm 0.3024$ ). En el grupo testigo se puede observar que a partir del día 7 sus niveles fueron en aumento siendo el día 60 el de mayor producción siendo 2.44 veces ( $1.2883 \pm 1.3832$ ) mayor que el grupo vacunado con BCG y 1.41 veces ( $0.8531 \pm 1.2997$ ) mayor que el grupo vacunado con CFPE (ver figura 4).

Cuando se realizó el análisis estadístico con la prueba de MANOVA y Kruskal-Wallis, no mostró ninguna diferencia estadística entre grupos, ya sea BCG con CFPE, BCG con grupo testigo.



## IFN- $\gamma$ PPD bovis

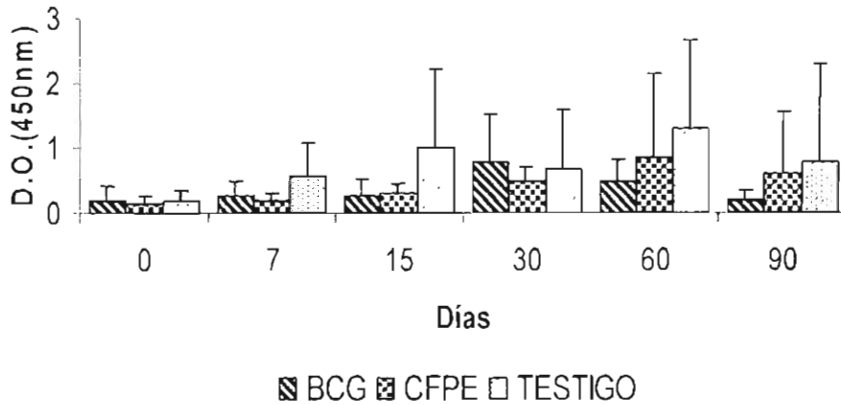


Figura. 4. Niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en células PBMCs estimulados con PPD bovis, la evaluación del IFN- $\gamma$  fue en plasma de los cultivos celulares de becerras vacunados bajo diferentes esquemas. Cada punto representa el promedio de los animales por grupo con su desviación estándar.

En los diferentes grupos (BCG, CFPE y testigo), estimulados con PPD avium, se observó que en el día 0 los niveles de IFN- $\gamma$  se mantuvieron bajos en promedio con una D.O. de 0.1563 +/- 0.1482. Para el día 7 el grupo vacunado con BCG tuvo un ligero aumento en sus niveles de IFN- $\gamma$  de 1.91 veces (0.239 +/- 0.1926) mayor que el grupo vacunado con CFPE (0.1277 +/- 0.0879). En el día 30 el grupo vacunado con BCG se observó un incremento mayor de 2.04 veces (0.8874 +/- 0.5310) respecto al grupo vacunado con CFPE (0.4333 +/- 0.3736), posteriormente disminuyeron sus niveles hasta los 90 días. En el grupo testigo se observó un aumento creciente, al día 60 su expresión fue 2.32 veces (1.3535 +/- 1.5075) mayor que el grupo vacunado con BCG (0.5871 +/- 0.5191). Con el grupo vacunado con CFPE fue mayor 2.28 veces (0.5971 +/- 0.6720). A los 90 días los valores de D.O. disminuyeron a valores semejantes al tiempo cero (ver figura 5).

En el análisis estadístico usando la prueba de MANOVA y Kruskal-Wallis, no mostró ninguna diferencia estadística entre grupos, ya sea BCG con CFPE, BCG con grupo testigo.

## IFN- $\gamma$ PPD avium

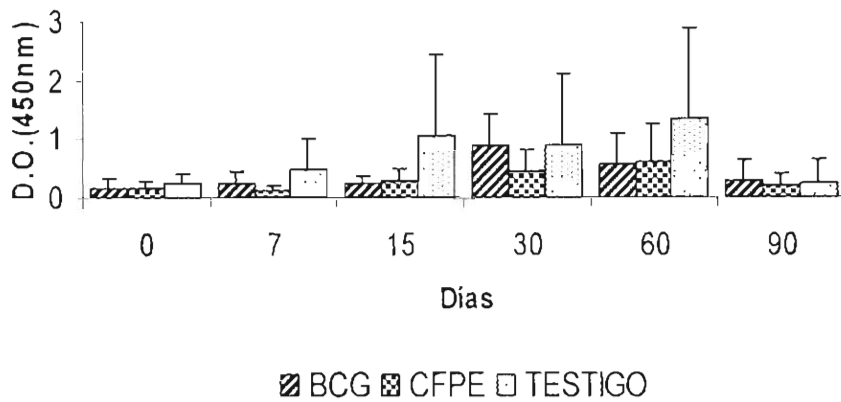


Figura. 5. Niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en células PBMCs estimulados con PPD avium, la evaluación del IFN- $\gamma$  fue en plasma de los cultivos celulares de becerros vacunados bajo diferentes esquemas. Cada punto representa el promedio de 5 animales por grupo  $\pm$  desviación estándar.

La evaluación de la expresión de IFN- $\gamma$  en el grupo sin estímulo se puede observar en el día 0 los niveles obtenidos para el grupo vacunado con BCG y CFPE en promedio tienen un valor de D.O. de 0.1080  $\pm$  0.0739 mientras que el grupo testigo tuvo un valor de 0.0699  $\pm$  0.0132. Al día 7 el grupo testigo (0.1379  $\pm$  0.1350) tiene un ligero aumento respecto al grupo vacunado con BCG (0.1377  $\pm$  0.1620) siendo 1.0 veces mayor y de 2.16 veces mayor para el grupo vacunado con CFPE (0.0634  $\pm$  0.0084). Su mayor aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  fue en el día 15 con un valor superior de 7.54 veces (0.8336  $\pm$  1.3856) respecto al grupo vacunado con BCG (0.1104  $\pm$  0.0652) y un valor de 6.38 veces más alto hacia el grupo vacunado con CFPE (0.1398  $\pm$  0.0915) (figura 6).

En el análisis estadístico usando la prueba de MANOVA y Kruskal-Wallis con un valor de  $p < 0.05$ , no mostró ninguna diferencia estadística entre grupos, ya sea BCG con CFPE, BCG con grupo testigo.

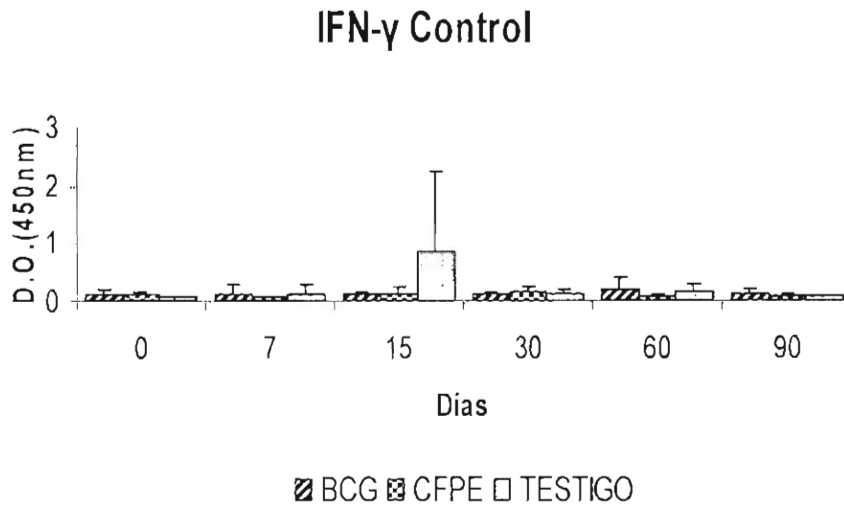


Figura. 6. Niveles de IFN- $\gamma$  sin estímulo en plasma de becerras seguido de la vacunación subcutánea de BCG, CFPE y grupo testigo. Cada punto representa el promedio los animales con su desviación estándar.

## 6.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL EN BECERRAS VACUNAS CON BCG, CFPE Y GRUPO TESTIGO

Los niveles de la respuesta inmune humoral en las becerras se obtuvieron evaluando una cinética por 90 días postvacunación en la cual se observa una variación entre los promedios de las densidades ópticas en los diferentes grupos de estudio.

En la figura 7 se observa los valores promedio de la cinética de la respuesta inmune humoral de las becerras en los diferentes grupos. Cuando se evaluó con el CFPE *M. bovis*, hubo una diferencia estadísticamente significativa en tiempo

empleando la prueba de MANOVA ( $p < 0.05$ ). En el día 0 el valor obtenido para el grupo vacunado con CFPE tuvo un valor de D.O. de  $0.217 \pm 0.074$  siendo 1.5 veces mayor que el grupo vacunado con BCG ( $0.144 \pm 0.068$ ) y 1.14 veces mayor que el grupo testigo ( $0.189 \pm 0.066$ ), teniendo un aumento paulatino siendo el día 30 donde alcanza su mayor nivel con un valor de D.O. de  $1.004 \pm 0.452$  siendo 1.51 veces mayor que el grupo vacunado con BCG ( $0.662 \pm 0.369$ ) y 1.12 veces mayor para el grupo testigo ( $0.894 \pm 0.455$ ).

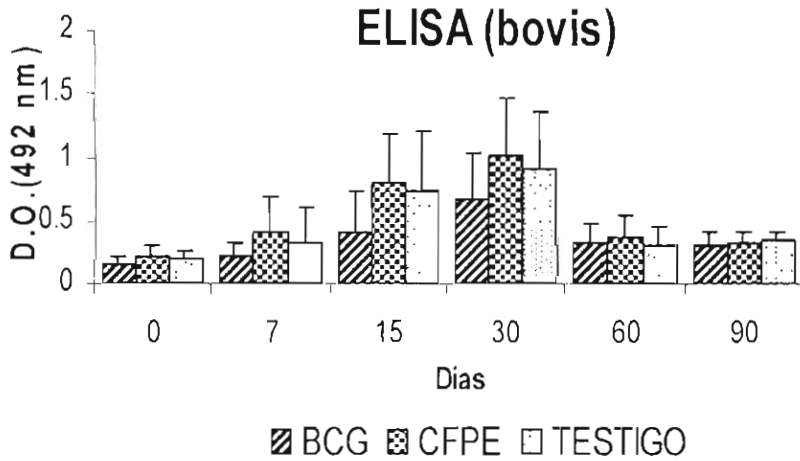


Figura. 7. Niveles de la respuesta inmune humoral hacia CFPE *M. bovis* en sueros de becerras seguida de los diferentes esquemas de vacunación. Cada punto representa el promedio los animales y su desviación estándar.  
 NOTA.- \* Diferencias estadísticas a través del tiempo ( $p < 0.05$ ).

Con CFPE *M. avium* también hubo una diferencia estadísticamente significativa en tiempo ( $p < 0.05$ ) entre los grupos, en la figura 8 se puede observar los valores promedio obtenidos a lo largo de la cinética, en el día 0 los valores en los tres grupos se mantuvieron bajos con una D.O. de  $0.18 \pm 0.071$ , manteniéndose así en los días consecutivos a excepción del grupo vacunado con CFPE, que en el día 30 tuvo un ligero incremento con un valor de D.O. de  $0.371 \pm 0.501$  siendo 2.9 veces mayor que el grupo vacunado con BCG ( $0.126 \pm 0.019$ ) y 2.18 veces mayor

que el grupo testigo (0.169+/-0.132), posteriormente teniendo un descenso en sus niveles sin ser por debajo de su nivel inicial.

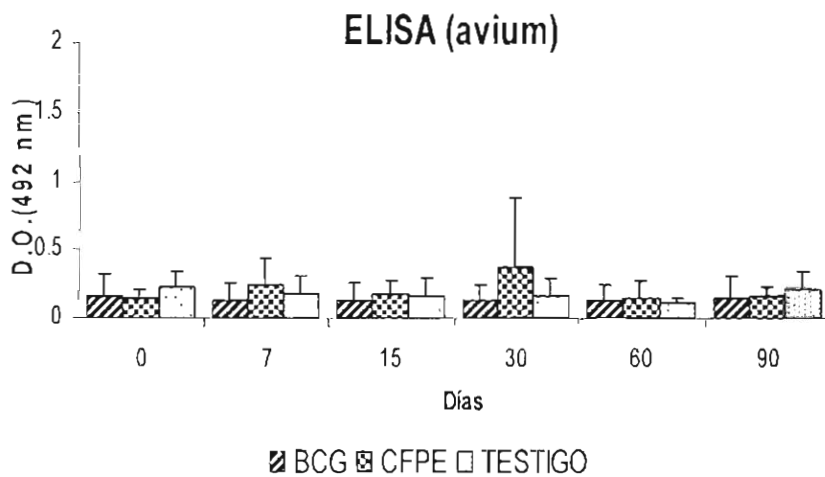


Figura. 8. Niveles de la respuesta inmune humoral hacia CFPE *M. avium* en sueros de becerras seguida de los diferentes esquemas la vacunación. Cada punto representa el promedio los animales y su desviación estándar.

NOTA.- \* Diferencias estadísticas a través del tiempo (p <0.05).

### 6.3. NIVELES CELULARES DE LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN ANIMALES NEGATIVOS Y ANIMALES POSITIVOS A LA TUBERCULINA POR MEDIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para poder obtener las diferentes subpoblaciones de linfocitos primeramente se seleccionaron dentro de la grafica, las regiones donde se encontraban las diferentes poblaciones celulares. En el siguiente citograma podemos observar los linfocitos en color rojo, los monocitos en color verde, los neutrófilos en color azul, los eosinófilos en color amarillo, las plaquetas y los restos celulares de los hematíes en negro y por último en azul claro la suciedad, como células no hematológicas , células muerta y restos celulares (figura 9).

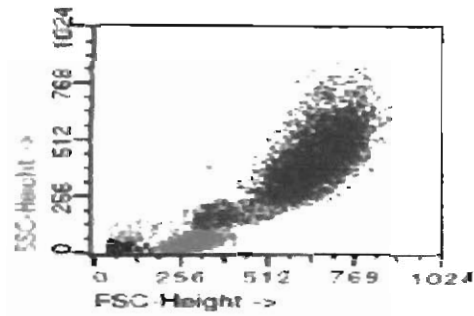


Figura 9. Ejemplificación de las diferentes poblaciones celulares empleando la técnica de citometría de flujo.

Posteriormente cuando se ha identificado nuestra población de estudio, se regionalizo y se hizo una segunda grafica, donde se obtiene nuestras subpoblaciones de interés marcadas con el fluorocromo correspondiente obteniendo un porcentaje de ellas (figura 10 a y 10 b).



Figura 10. (a) Se muestra la interpretación del programa del citometro, donde se ejemplifica la ventana en donde se observa la población de interés. (b) la división de las poblaciones marcadas con el fluorocromo correspondiente.

Para la estandarización de la técnica de citometría de flujo, se consideró evaluar a un grupo de animales adultos, considerando 3 animales positivos a las pruebas de tuberculina, IFN- $\gamma$  y ELISA. Y 2 animales negativos a estas mismas pruebas (ver cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de las pruebas complementarias diagnosticas para tuberculosis bovina.

N ° animal	Tuberculina	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$	ELISA	ELISA
		PPD bovis	PPD avium	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>
2	-	0.2295	0.217	0.372	0.303
15	-	0.082	0.114	0.319	0.303
406	+	1.187	0.218	0.514	0.303
415	+	1.153	0.258	0.514	0.303
424	+	2.865	1.32	1.056	0.303

Los porcentajes celulares de las diferentes subpoblaciones, se muestran en la figura 11. En los animales adultos positivos a tuberculosis bovina se puede observar que la subpoblación de CD4+ se mantuvo en promedio en un 40 % en su expresión, mientras que en los animales adultos negativos estuvo alrededor del 60 %. Con la subpoblación de CD8+ los animales positivos obtuvieron mayor porcentaje un 17 %, mientras que los animales negativos obtuvieron un 8 %. En la subpoblación de CD25 los animales positivos obtuvieron alrededor del 60 % de su expresión, al mismo tiempo que los animales negativos obtuvieron un 61 %. En el marcaje de linfocitos  $\gamma\delta$  los valores en los animales positivos fueron de un 8 % y en los animales negativos fueron de un 4%. Finalmente con la subpoblación de los CD45RO+ los animales positivos tuvieron un valor de un 21 % y los animales negativos un 12 %.

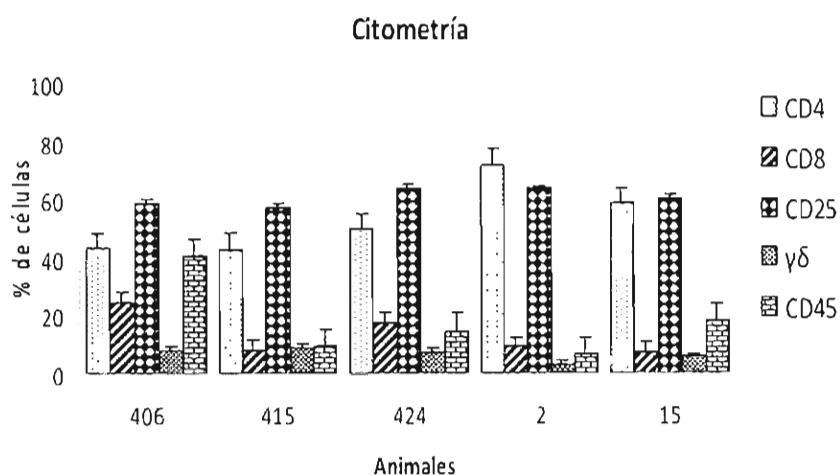


Figura 11. Niveles celulares de las diferentes subpoblaciones de linfocitos por medio de citometría en animales positivos a la tuberculina (406, 415, 424), y animales negativos (2, 15).

#### 6.4. NIVELES CELULARES DE LINFOCITOS T CD4+ EN LOS DIFERENTES GRUPOS

Los niveles celulares del marcador de linfocitos T CD4+, tuvieron una diferencia estadísticamente significativa en tiempo, al día cero en el grupo vacunado con BCG y testigo, teniendo un 25 % como valor promedio; el grupo vacunado con CFPE en promedio tuvo un valor del 17 %; para el día 15 después de la vacunación hay un ligero incremento significativo en el grupo testigo vacunado con BCG con un valor promedio del 32.7 % ( $p < 0.05$ ), así como para el grupo CFPE para el día 60 postvacunación tiene un valor promedio de 32.8 % ( $p < 0.05$ ) (figura 12).



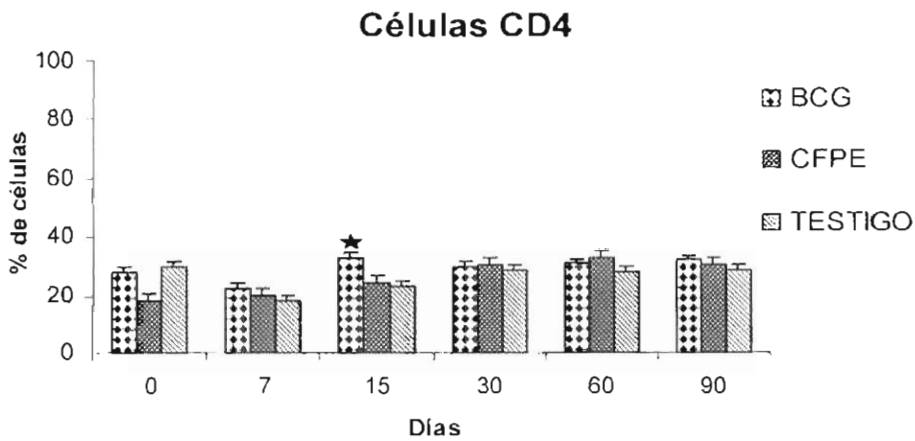


Figura. 12. Cambios en el porcentaje de las células T CD4+ en sangre periférica de las beceras seguido de la vacunación subcutánea de BCG, CFPE y grupo testigo. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 6.5. NIVELES CELULARES DE LINFOCITOS T CD8+ EN LOS DIFERENTES GRUPOS

Los niveles celulares del marcador de linfocitos T CD8+ tuvieron una diferencia significativa en tiempo como se puede observar en la grafica, en el grupo vacunado con BCG su nivel más alto fue en el día 15 postvacunación obtuvo el valor promedio de 19 % ( $p < 0.05$ ), mientras que el grupo vacunado con CFPE su nivel más alto fue en el día 90 postvacunación con un valor promedio del 29 % ( $p < 0.05$ ). Entre tanto el grupo testigo sus valores se mantuvieron por debajo de los valores en los grupos vacunados, siendo únicamente en el día 30 en donde sus valores estuvieron más altos que los otros dos grupos (BCG 16 %, CFPE 15 %) teniendo un valor promedio del 22 % (figura 13).

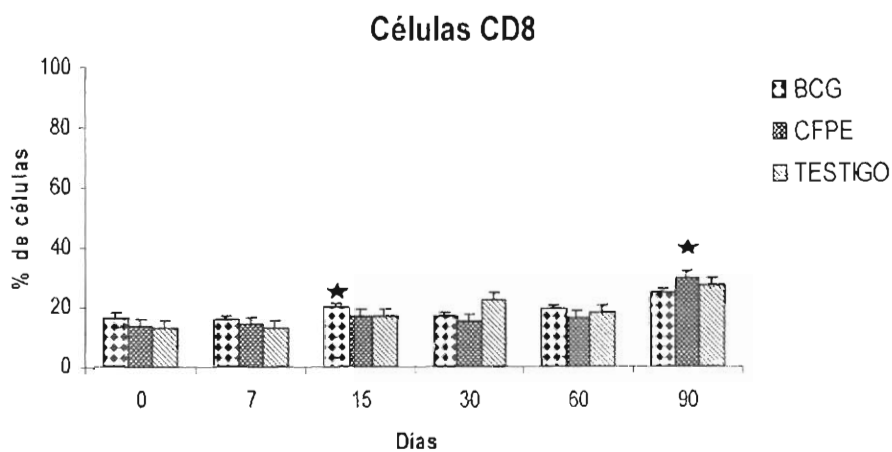


Figura. 13. Cambios en el porcentaje de las células T CD8+ en sangre periférica de las beceras seguido de la vacunación subcutánea de BCG, CFPE y grupo testigo. Cada punto representa el promedio y error estándar de 5 animales. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

A su vez se observó la proporción de CD4+/CD8+ en los grupos de estudio donde se nota en un inicio el grupo testigo tiene una proporción de 2.29 de CD4+/CD8+, mientras que en el grupo con BCG fue 1.67 y con CFPE 1.33, en el transcurso del estudio la proporción en el grupo vacunado con CFPE aumentó en el día 30 y 60 (2.02 y 2.0 respectivamente). Posteriormente en todos los grupos sus valores bajaron en promedio a 1 (figura 14).

### Proporción CD4/CD8

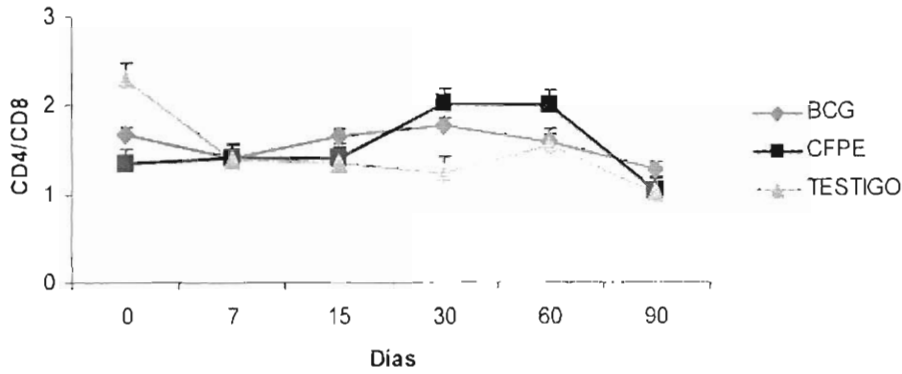


Figura. 14. Cambios en la proporción de linfocitos T CD4+/CD8+ en PBMC de becerras vacunadas con BCG, CFPE y grupo testigo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  Error estándar de 5 becerras por grupo. Los datos son expresados como la proporción CD4+/CD8+ (% CD4+/ %CD8+).

### 6.6. NIVELES CELULARES DE LINFOCITOS T CD25 EN LOS DIFERENTES GRUPOS

Los niveles celulares del marcador de linfocitos T CD25, tuvieron una diferencia significativa en tiempo, para el día cero en el grupo vacunado con CFPE, presento un valor promedio del 48 %; para el día 30 postvacunación exhibo ligero incremento significativo con un valor promedio del 65 % ( $p < 0.05$ ), mientras que para el grupo testigo su valor inicial fue del 38 % teniendo un incremento máximo para el día 15 postvacunación con un valor promedio del 63 % y a partir del día 30 postvacuna disminuyo a sus niveles iniciales. En el grupo vacunado con BCG se puede observar que sus niveles tuvieron un valor promedio de 46 % durante el tiempo de estudio ( $p < 0.05$ ) (figura 15).

## Células CD25

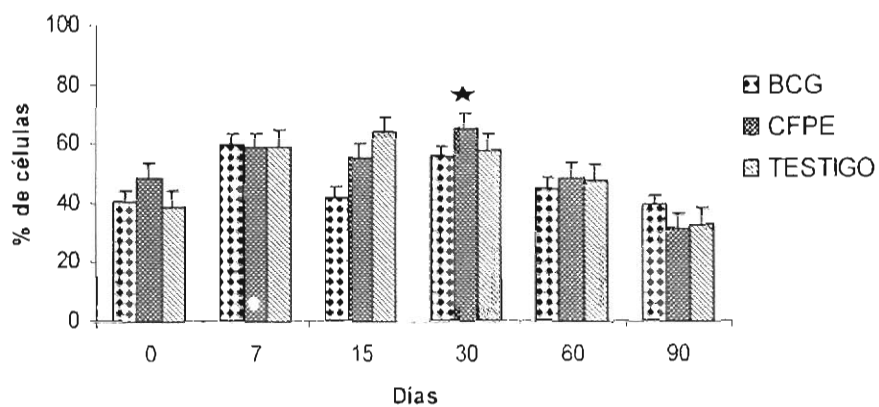


Figura. 15. Cambios en el porcentaje de las células T CD25 en sangre periférica de las becerras seguido de la vacunación subcutánea de BCG, CFPE y grupo testigo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  Error estándar de 5 animales. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Al hacer un análisis comparativo de la relación CD25/ $\gamma\delta$  se observó que la respuesta de activación celular hacia la población  $\gamma\delta$  en un inicio tenían un valor promedio de 2.6 conforme transcurrió el tiempo fue aumentando sus valores, así el grupo vacunado con CFPE su mayor relación fue en el día 30 con un valor de 5.6, mientras que para el grupo vacunado con BCG fue al día 60 con un valor de 5.9. El grupo testigo siempre se mantuvo por debajo de los grupos vacunados (figura 16).

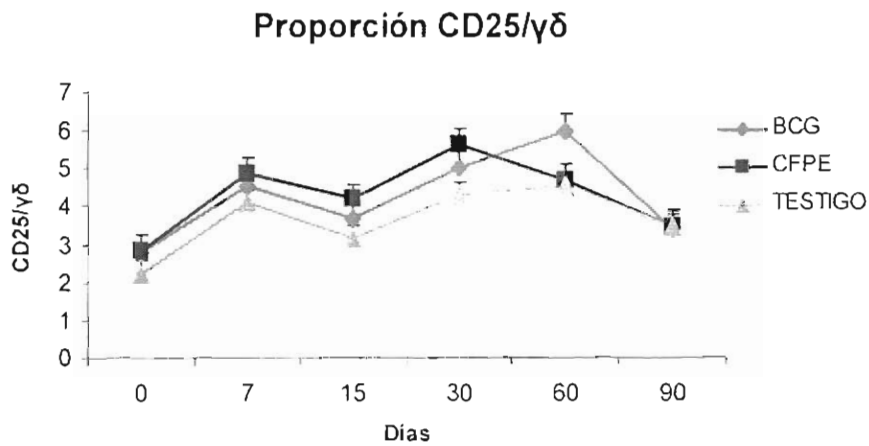


Figura. 16. Cambios en la proporción de linfocitos T CD25/γδ en PBMC de becerras vacunadas con BCG, CFPE y grupo testigo. Cada punto representa el promedio ± Error estándar de 5 becerras por grupo. Los datos son expresados como la proporción CD25/γδ (%CD25/ % γδ).

### 6.7. NIVELES CELULARES DE LINFOCITOS T γ/δ EN LOS DIFERENTES GRUPOS

Los niveles celulares del marcador de linfocitos T γ/δ, como se puede observar en los diferentes grupos de estudio tuvieron un valor promedio del 15 %, para el día 15 después de la vacunación hay un ligero incremento en el grupo testigo con un valor promedio de 20 %, teniendo una diferencia significativa en tiempo ( $p < 0.05$ ); mientras que para los grupos vacunados BCG y CFPE su valor fue de 12 %, no observándose diferencias significativas entre grupos (figura 17).

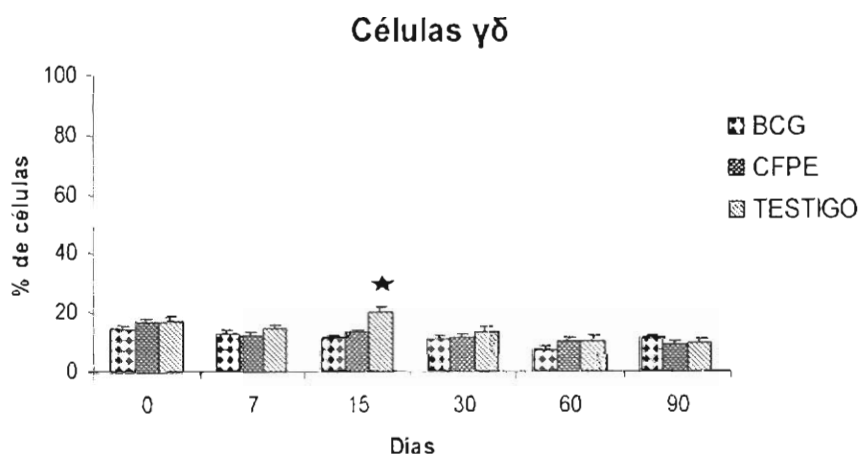


Figura. 17. Evaluación de las subpoblación de linfocitos T  $\gamma/\delta$ , obtenido de sangre periférica de becerros, en los diferentes grupos (BCG, CFPE y testigo). Cada punto representa el promedio  $\pm$  Error estándar de 5 animales por grupo.  
\*Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 6.8. NIVELES CELULARES DE LINFOCITOS TCD45RO+ EN LOS DIFERENTES GRUPOS

Los niveles celulares del marcador de linfocitos T CD45RO+, tuvieron una diferencia significativa entre grupos así como en tiempo; observándose que en los primeros dos muestreos (día cero y siete), los valores de los grupos eran muy bajos, ya para el día 15 postvacunación el grupo vacunado con CFPE alcanza su valor mas alto obteniendo un 53 % y el grupo testigo con un valor promedio de 49% ( $p < 0.05$ ). Para el grupo vacunado con BCG su nivel mas alto lo obtuvo al día 30 postvacunación con un valor promedio de 45 % ( $p < 0.05$ ). Hacia el día 60 y 90 postvacunación los valores en todos los grupos bajaron (figura 18).

## Células CD45

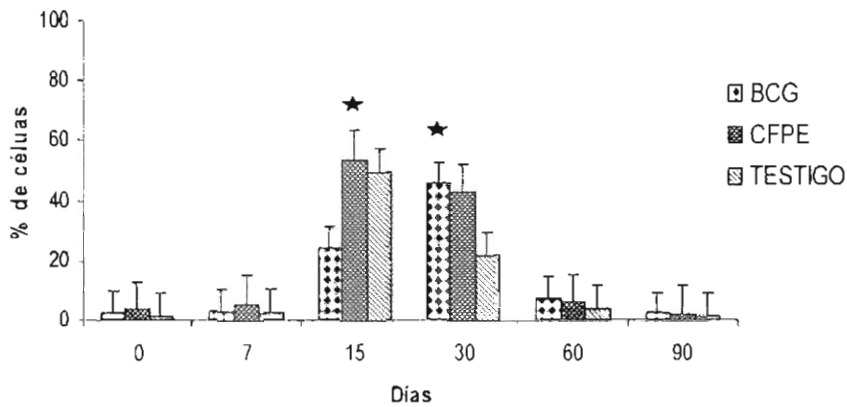


Figura. 18. Cambios en el porcentaje de las células T CD45RO+ en sangre periférica de las beceras seguido de la vacunación subcutánea de BCG, CFPE y grupo testigo. Cada punto representa el promedio  $\pm$  Error estándar de 5 animales.

\* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

El establecimiento de la respuesta inmune de tipo celular es esencial en la inmunidad protectora contra la TB, por lo que es deseable que las vacunas sean capaces de estimular y mantener este tipo de inmunidad, la cual, participan de manera relevante los linfocitos Th1 específicos, productores de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2. El IFN- $\gamma$  liberado por estas células actúa de manera paracrina sobre los macrófagos, aumentando sus propiedades fagocíticas y bactericidas contra las micobacterias intracelulares, logrando su eliminación y con ello, el control del progreso de la enfermedad <sup>24</sup>.

En la evaluación de vacunas contra la TB, la cuantificación y seguimiento de la producción de esta citocina (IFN- $\gamma$ ), por las células T específicas, ha sido un parámetro relevante que nos permite determinar de forma parcial, el establecimiento de la inmunidad protectora <sup>5</sup>. De acuerdo a ello, los resultados

obtenidos en la cinética de evaluación del IFN- $\gamma$  en el presente estudio, señalan en promedio una mayor producción de ésta en los animales del grupo testigo a través del tiempo, al día 7 sus niveles fueron en aumento, el día 60 fue el de mayor producción (1.2883 $\pm$  1.3832,  $p \geq 0.05$ ), siendo mayor que los grupos experimentales (BCG y CFPE), infiriendo que el estudio se realizó bajo condiciones de campo, condiciones naturales (no controladas) y en una explotación donde se encontraba circulando la micobacteria (prevalencias del 5 % en nacencias y del 35 % en vacas en producción). No obstante, se observaron variaciones importantes, aunque no significativas en la producción de la citocina (IFN- $\gamma$ ) en ambos grupos experimentales (BCG y CFPE), señalando igualmente la influencia que ejerce la exposición continua a micobacterias atípicas ambientales en la respuesta inmune de los animales o las propias cepas de campo de *M. bovis* circulantes. A pesar de esta situación, la respuesta de producción de IFN- $\gamma$  en el grupo vacunado muestra ser específica hacia los antígenos de *M. bovis* tal como lo señala la producción en los cultivos de células estimulados con los antígenos del PPD bovino más que con los del PPD aviar.

La producción de IFN- $\gamma$  ha sido utilizada como marcador de la respuesta inducida por la vacuna frente a la TB, de forma tal que el aumento de la eficacia de la vacuna está ligado al incremento de la producción específica de IFN- $\gamma$ ; sin embargo estos criterios han sido establecidos bajo condiciones muy controladas y en países donde sus prevalencias son muy inferiores a las nuestras (menores al 1%), y con un historial de no infección de *M. bovis*, de al menos 5 años atrás, observando con mayor claridad el efecto de la vacunación sin la presencia de las micobacterias ambientales y de la exposición continua a las micobacterias patógenas <sup>44</sup>. Otros autores ven el aumento de IFN- $\gamma$  como un reflejo de la respuesta inflamatoria más que la protección inducida por la vacuna BCG en sí mismo <sup>45</sup>.

No ha sido clara la participación de la respuesta inmune humoral ó inmunidad mediada por anticuerpos (RIH ó IMA) en la protección contra la TB, ya que por un lado la micobacteria encuentra un nicho dentro del macrófago, donde los



anticuerpos circulantes se encuentran inaccesibles a la micobacteria, sin embargo, no se puede descartar la participación de los anticuerpos en la defensa contra la TB. La reevaluación de los aspectos relacionados con la protección IMA, frente a la infección por *M. bovis* y la búsqueda de nuevas alternativas parece interesante, teniendo en cuenta las nuevas evidencias del papel protector de los anticuerpos frente a otros microorganismos intracelulares y la reemergencia de la tuberculosis como un problema de salud, que constituye la primera causa de muerte asociada a enfermedades infecciosas en el mundo y para la que aún no existe un método de control efectivo. Un ejemplo relacionado con patógenos intracelulares reciente, es la vacuna de subunidades de polisacáridos de *Salmonella typhi* donde la protección hacia este patógeno intracelular facultativo es mediada por anticuerpos<sup>53</sup>.

Los experimentos relacionados con la evaluación del papel protector de los Acs en la infección por *M. tuberculosis* son aislados y muestran resultados contradictorios. Por un lado algunos fueron alentadores como el de Vordermeier, que reportó en ratones deficitarios de Acs e infectados con *M. tuberculosis*, un número mayor de unidades formadoras de colonias (UFC) en sus bazo con respecto a los testigos no deficitarios de Acs<sup>54</sup>, mientras que otros experimentos no revelaban protección mediada por los Acs<sup>55, 56, 57</sup>.

En nuestro estudio se mostró el incremento del nivel de anticuerpos preferentemente hacia el CFPE de *M. bovis*, siendo mayor entre los 15-30 días postvacunación, y teniendo la tendencia de disminuir a los 60-90 días. Este mayor nivel de anticuerpos ha sido reportado por otros investigadores en el cual el CFPE ha sido descrito como principal inductor de la inmunidad humoral<sup>43, 58</sup>.

Consideramos la gran importancia de los anticuerpos protectores dentro de los mecanismos de defensa frente a *M. tuberculosis*, estos varían dependiendo de la etapa en que se encuentre el proceso infeccioso. Inicialmente cuando la micobacteria llega a la superficie de mucosa, los Acs actuarían como elementos efectores, cobrando importancia los clásicos mecanismo de neutralización y opsonización, lo que conllevaría a la activación eficiente de la célula fagocítica y probablemente a la eliminación de la bacteria. Suponiendo que la infección lograra

establecerse, los Acs podrían tener importancia si tenemos en cuenta los nuevos conceptos de sus funciones: con un efecto regulador sobre la IMC, su interacción con este sistema y la habilidad de ellos para regular la respuesta de Acs y generar Acs antiidiotipos. La internalización del Ac a través del receptor Fc es esencial para el desarrollo de la inmunidad celular. La opsonización, además de aumentar la capacidad de presentación celular, la actividad lisosomal y la degradación intracelular del patógeno, también induce una rápida y elevada producción de IL-12, que estimula una respuesta inmune rápida y preferencial hacia Th1. En la consolidación de esta respuesta también está implicada la inducción de los factores de transcripción STAT 2 y STAT 4, asociados con el desarrollo y la activación de los linfocitos Th1. La eficacia de los Acs depende en algunos casos de una IMC intacta, pero la interdependencia y la redundancia entre estos sistemas es un hecho, por lo que los Acs podrían potenciar la respuesta inmune celular que induce el mantenimiento de niveles serológicos de células T de memoria en individuos infectados por *M. tuberculosis* o en su caso con *M. bovis*. En resumen, para establecer el valor del papel que juega la IMA en la defensa frente a *M. tuberculosis* o *M. bovis*, se consideran aspectos experimentales generales *in vivo* e *in vitro*, pero el hecho de que algunos Acs hayan modificado el curso de la infección por *M. bovis* en favor del hospedero, sugiere otra opción interesante para el control de la tuberculosis <sup>24</sup>.

El efecto de la vacunación en etapas tempranas sobre el sistema inmune en becerros recién nacidas no ha sido bien descrito. La protección conferida por la vacunación temprana es muy crítica por la gran diversidad y el número de patógenos potenciales dentro del entorno del becerro. El sistema inmune del recién nacido, se considera inmaduro y es incapaz de dar respuesta, comparado con vacas adultas con la estimulación antigénica. La inmadurez del sistema inmune de la ternera, puede comprometer la eficacia de los protocolos de vacunación en las nacencias y exacerbar la vulnerabilidad de la ternera a las enfermedades infecciosas <sup>58, 59, 60</sup>. En el nacimiento, los órganos linfoides primarios y secundarios están poblados por células que se han desarrollado de manera independiente a la estimulación antigénica y el número de linfocitos B

circulantes se aproxima al 30 % de los hallados en los adultos. El recuento de linfocitos B llega a los niveles adultos hacia el día 20 de vida <sup>61</sup>.

Con respecto a la inmunidad mediada por células, se argumenta que es deficiente en el nacimiento, tal como lo indica la menor cantidad de reacciones frente a las fitolectinas <sup>62</sup>. Hacia la 2 semana de edad, los becerros alcanzan niveles de respuesta inmunitaria celular similares a los adultos. Observando que a temprana edad las becerras inmunológicamente se encuentran aptas para establecer programas de inmunización <sup>60</sup>. Las células T son las primeras células involucradas en las infecciones de *M. bovis* en el ganado vacuno <sup>33, 63</sup>, por lo que la respuesta inmune celular domina como principal respuesta en esta enfermedad <sup>64</sup>. Todas las subpoblaciones de linfocitos T (T $\gamma\delta$ , TCD4 y TCD8) se ven involucradas en la respuesta anti-micobacteriana en el ganado vacuno.

La producción de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12 por células dendríticas (DC) o los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* o *M. bovis*, contribuye al desarrollo de las células Th1 <sup>4, 65, 66</sup>. Por otra parte, la respuesta Th2 inducida por infección por *M. bovis* contrarresta Th1, suprimiendo CMI y aumentando la respuesta humoral primordialmente en la enfermedad en estados avanzados. La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10. Estudios sobre la IMC en la TB han sugerido que el balance de la respuesta inmune Th1/Th2 determina la evolución y resultados de la enfermedad <sup>4, 67</sup>.

Por lo tanto el planteamiento de este trabajo radica en realizar un análisis comparativo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en los grupos de animales vacunados (BCG y CFPE) y el grupo testigo, determinando los marcadores de superficie para linfocitos T CD4+, CD8+,  $\gamma\delta$ , CD25+ (receptor de IL-2) y CD45RO+ (células de memoria).

Las células T CD4+ son importantes para el establecimiento de una respuesta inmunitaria tipo Th1, caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$ , es considerada esencial como vía de activación de los macrófagos. En ganado vacuno infectado con *M. bovis*, la subpoblación TCD4+ parece dominar este tipo de células productoras de IFN- $\gamma$  responsable de activar la capacidad anti-micobacteriana <sup>68</sup>.

<sup>69, 70</sup>. En nuestro estudio se pudo observar que el nivel de CD4+ se incremento en el grupo vacunado con BCG a los 15 días postvacunación, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), mostrando que hubo una respuesta proliferativa de esta población. Aunque la producción de IFN- $\gamma$  al mismo tiempo no distinguió incremento, si aumento a 30 días postvacunación. Sin embargo este incremento, no fue comparable cuando los animales cursan por un proceso infeccioso a *M. bovis*, o en casos donde se vacuna con dosis mayores tanto medias o altas de BCG ( $10^7$  ó  $10^8$  UFC respectivamente) <sup>71</sup>. Bajo condiciones normales el porcentaje de linfocitos CD4+ en becerras, oscila entre 20-25 % a través del tiempo (1-29 semanas de edad). Estos valores fueron determinados durante 6 meses postnacimiento, donde se determino por medio de citometria de flujo el porcentaje y valores absolutos de CD4+, CD8+, células  $\gamma/\delta$  y células NK <sup>72</sup>.

Las células T CD8+ tienen un papel importante en la resistencia a tuberculosis, ya que muestran un patrón de secreción de citocinas tipo TH1, la cual tiene una actividad antimicrobiana en macrófagos infectados y también tiene estas células un efecto citotóxico restringido por el complejo MHC clase I <sup>73</sup>. La función de las células T CD8+, sugieren que esteriliza el granuloma, por la muerte de las células infectadas por micobacterias <sup>74</sup>, y su función primordial es delimitar el granuloma e impedir la diseminación bacteriana <sup>75</sup>.

Observaciones realizadas en bovinos con respecto a los cambios de esta población de linfocitos CD8+ a través del tiempo bajo condiciones normales, es decir animales sanos desde la primera semana de nacimiento hasta las 30 semana de edad, sus porcentajes están en un 10 % <sup>72</sup>. Algunos experimentos han demostrado que esta subpoblación (CD8+), se ve incrementada bajo diferentes esquemas de vacunación, en donde habitualmente se emplean dosis altas ( $8 \times 10^8$  UFC de la BCG) <sup>76</sup>, y en el cual reporta, que la relación de las poblaciones celulares en los terneros no vacunados y vacunados no influyo en los porcentajes celulares. Sin embargo, en animales infectados naturalmente, los linfocitos CD8+, se ven incrementados hasta un 25 % bajo el estímulo del PPD bovino <sup>77</sup>. En el presente estudio se evaluó la proliferación celular de los linfocitos CD8+ en

animales vacunados con dosis reducidas de BCG ( $10^4$  UFC), CFPE y así como el testigo, en donde se encontró diferencias estadísticamente significativas respecto al tiempo, para el grupo vacunado con BCG al día 15 y para el día 90 para el grupo vacunado con CFPE.

Cuando se analiza la relación CD4+/CD8+ en el grupo vacunado con BCG se observó preferentemente una disminución ligera a los 7 días postvacunación y un leve incremento a los 15 días, y el mayor incremento se mostró a los 30 días postvacunales. Así mismo el grupo vacunado con el CFPE, mostró que entre los 30-60 días fue mayor la relación CD4+/CD8+, comparada con el resto de los grupos. En estudios de vacunación con dosis mayores ( $10^8$  UFC de BCG), en las primeras tres semanas no existe incremento, no obstante a la sexta semana (45 días) se observa claramente un mayor incremento de la relación CD4+/CD8+ <sup>78</sup>. Estas diferencias entre lo reportado y nuestros resultados pueden ser debidas en principio a las altas dosis de vacunación empleadas por otros autores, comparativamente a lo que se desarrolló en este trabajo, ya que estas diferencias se encuentran entre 100-1000 veces dosis mayores, otra diferencia en este trabajo es que las micobacterias se encontraban presentes en el establo, ya que la prevalencia al inicio de la vacunación era del 35 %, las condiciones naturales las cuales exponen constantemente el sistema inmune de las becerras. El efecto de variaciones en las subpoblaciones CD4+/CD8+ no fue muy claro, ya que a través de la edad del becerro varía esta relación, por el simple efecto de la maduración del sistema inmune del animal, sin embargo no observamos estas variaciones ya que el grupo testigo su porcentaje de CD8+ se encontraba incrementado, y esto primordialmente por efecto del ambiente contaminado por micobacterias ambientales o en su caso por la presencia de *M. bovis*.

Las células T, que presentan el marcador CD25, el cual es el receptor de IL-2, es una molécula que está involucrada con la activación y función reguladora de los linfocitos <sup>79</sup>, así como en la división y la proliferación de las células T de memoria <sup>80</sup>. En el ganado, se ha demostrado que las distintas subpoblaciones de células T poseen el marcador CD25 en respuesta al estímulo de antígenos de la micobacteria <sup>80</sup>. La interacción antígeno/complejo MHC de las células T,

desencadena la expresión del receptor de IL-2. La interacción de IL-2 con el IL-2R, conduce a la estimulación de un conjunto de señales complejas, dentro de los mecanismos traduccionales, resultando en la proliferación celular <sup>81</sup>. Por lo tanto la expresión de IL-2R, es un indicador temprano de la activación celular, se ha demostrado la cuantificación del IL-2R bajo condiciones *in vitro* en PBMC, es un marcador eficaz de la IMC en becerros que han sido inmunizados con hemocianina de moluscos, han determinado que la IL-2 R se liberan 96 horas posteriores al estímulo antigénico <sup>82</sup>. Se han determinado la composición fenotípica de PBMC en animales infectados experimentalmente, determinando la cinética del porcentaje de expresión de IL-2R+, durante 95 días postinfección, se encuentra que el porcentaje de expresión de IL-2R+ se incrementa significativamente a los 30 días postinfección <sup>33</sup>. En nuestro experimento los porcentajes de población celulares que expresan el IL-2R+ al inicio y a través del tiempo son demasiado elevados, ya que al principio se encuentra en los tres grupos en promedio en un 40 %, donde únicamente se muestra diferencias significativas en grupo con CFPE a los 30 días postvacunación. El gran aumento que existe de IL-2R+ que expresan los linfocitos T, al inicio y a través del experimento, muestra de manera indirecta el contacto constante de becerros al desafío antigénico desde el momento del nacimiento, ya que esto lo establecemos por los niveles de prevalencia que se encuentran presentes en la explotación (35%).

Se podría cuestionar en nuestro trabajo porque inician los grupos de estudio con niveles altos de CD25 y consecutivamente sus niveles van bajando en los grupos vacunados, tendremos que tomar en cuenta que nuestro estudio se realizó en condiciones de campo en donde se ven involucradas diferentes factores tanto ambientales, nutricionales y de manejo.

En la relación CD25/ $\gamma\delta$  se observó una activación mayor de estas poblaciones en los grupos vacunados (BCG y CFPE) con respecto al grupo testigo, el comportamiento fue muy similar a la relación con CD4+/CD8+.

Con respecto a las células T  $\gamma/\delta$ , se ha visto que poseen la capacidad de producir IFN- $\gamma$ <sup>83</sup> y sirven de enlace entre a inmunidad innata y la inmunidad adaptativa del sistema inmune<sup>65, 82, 84, 85, 86</sup>. Se ha demostrado que esta subpoblación se puede inducir con altas dosis de BCG ( $8 \times 10^6$  UFC), incrementa sus valores promedio significativamente de un 8 % a 41 % en la 2<sup>o</sup> semana postvacunación conjuntamente con el IFN- $\gamma$ , gradualmente disminuyen hasta la 5<sup>o</sup> semana<sup>76</sup>. Observaciones similares han sido realizadas, sugiriendo el papel de esta células T en la respuesta inmune a infecciones micobacterianas<sup>87</sup>. Algunos experimentos han ayudado para conocer los mecanismos y el reconocimiento antigénico por las células T  $\gamma/\delta$ , el reconocimiento antigénico rápido a infecciones micobacterianas es debido a que estas células  $\gamma/\delta$ , reconoce antígenos sin ser procesados y antígenos no peptídicos que son presentados a través del MHC<sup>88</sup>. Esto implica que a diferencia del CD4+ o linfocitos T CD8+, las células T  $\gamma/\delta$ , reconocen antígenos micobacterianos en forma directa, en ausencia de los mecanismos clásicos de presentación antigénica<sup>89, 90, 91, 92</sup>.

En nuestro estudio se pudo observar que en los grupos vacunados los niveles del marcador  $\gamma/\delta$  en linfocitos T en un inicio, obtuvieron valores un poco más altos que los días consecutivos, sugiriendo una posible relación de esta subpoblación en la respuesta inmune en el reconocimiento de diversas proteínas antigénicas producidas por las micobacterias. Los resultados obtenidos en nuestro estudio no mostraron grandes cambios con respecto a esta subpoblación de linfocitos T  $\gamma/\delta$ , los niveles basales fueron entre 15-20 % al inicio del experimento. No se mostraron cambios significativos a través del tiempo.

El antígeno leucocitario común CD45RO+ tiene como función modular la transducción de la señal de activación de los linfocitos T, su isoforma CD45RO+ se presenta en las subclases de memoria de los linfocitos T CD4+, T CD8+, células mononucleares que presentan WC1+, TCR  $\gamma/\delta$  y también en monocitos, granulocitos y en linfocitos B<sup>93</sup>. Una característica clave de una respuesta inmune es el desarrollo de células T de memoria (CD45RO+), tras la activación por el antígeno una población de células T antígeno-específicas se activan. Por lo que

subsecuentemente cuando tiene un segundo contacto con este antígeno su cinética se incrementa rápidamente, así se ha demostrado en modelos de ratón y en humanos<sup>94</sup>. En bovinos son pocos los estudios acerca de este tipo de células CD45RO+, especialmente a lo que se refiere en la TB. En nuestro estudio en becerras se obtuvo una respuesta para este marcador pero su duración fue muy corta con respecto al tiempo, ya que entre los 15 y 30 días se obtuvieron valores del 55 % y posteriormente (60 y 90 días) fueron bajando notablemente a un 10 % en todos los grupos. Con esta población de linfocitos T CD45RO+, observamos que su mayor presencia se encuentra postvacunación, sin embargo a tiempos posteriores, disminuye considerablemente, esto posiblemente podría ser considerando la dosis vacunal ( $10^4$  UFC), la cual ha sido poco utilizada en modelos experimentales, pero para establecer que porcentaje de las células CD45RO+ son linfocitos T CD4+ o T CD8+ de memoria, sería necesario realizar una doble marcación. Otra situación posible es considerando que después que se evoco una respuesta primaria (21-30 días), la población CD45RO+ migro al sistema linfático, disminuyendo abruptamente sus valores en sangre periférica.

## 8. CONCLUSIÓN

- La producción del IFN- $\gamma$  por la vacunación (BCG y CFPE), fue evidente únicamente entre los 30 y 60 días.
- La vacunación influyo en la expresión de las diferentes subpoblaciones de linfocitos.
- La presencia de micobacterias ambientales y micobacterias patógenas influyo en el establecimiento de la respuesta inmune.
- La relación CD4+/CD8+ fue mayor a los 30 días en CFPE y BCG.
- La relación CD25/ $\gamma\delta$  fue mayor en el grupo vacunado con CFPE al día 30 y con BCG fue al día 60.



- Para la evaluación de los linfocitos CD25 y  $\gamma/\delta$  fue determinante la presencia de micobacterias ambientales y micobacterias patógenas, ya que no hubo un aumento significativo.
- El BCG y el CFPE fueron inmunogénicos no dañinos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Daniel, T. M., Bates, J. H., Downes, K.A. History of Tuberculosis. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. Bloom, B. R. Ed. Washington, D. C. ASM: 1994, 13-24.
2. Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J., Holcom, T. A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in preColumbian Peruvian mummy. Proc Natl Acad Sci. USA. 1994, 91: 2091-2094.
3. Smith, P. G., Moos, A. R. Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control. Epidemiology of tuberculosis. Bloom, B. R. Ed. Washington, D. C. ASM. 1994, 47-62.
4. Welsh, M. D., Cunningham, R. T., Corbett, D. M., Girvin, R. M., McNair, J., Skuce, R. A., Bryson, D. G., Pollock, J. M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunology. 2005, 114: 101-111.
5. Buddle, B. M., de Lisle, G. W., Pfeffer, A., Aldwell, F. E. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis*. In calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccine. 1995, 13: 1123-1130.
6. Hogg, A. E., Worth, A., Bevrey, P., Howard, C. J., Villarreal-Ramos, B. The antigen-specific memory CD8<sup>+</sup> T-cell response induced by BCG in cattle resides in the CD8<sup>+</sup>γδTCR-CD45RO<sup>+</sup> T-cell population. Vaccine. 2009, 27: 270-279.
7. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. 2004, 17 (1): 1-15.
8. Acha P., Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC, Publicación científica. 2003, 580: 266-283.
9. De Lisle G.W., Mackintosh C.G. & Bengis R.G. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. In Infecciones

- micobacterianas en animales domésticos y salvajes. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2001, 20 (1): 86-111.
10. Tomo B. L'évolution des zoonoses. *In* Actualización en el campo de las zoonosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2000, 19 (1): 302-309.
  11. Abalos P & Retamal P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 2004, 23 (2): 583-594.
  12. Hancox M. bovine tuberculosis: milk and meat safety. *Lancet*, 2002, 359: 706-707.
  13. Cosivi, O., Meslin, F. X., Daborn, C, J., Grange, J. M. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. *Rev. Sci. Technol.* 1995, 14: 733-746.
  14. Hardie, R. M., Watson, J. M. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol. Infect.* 1992, 109: 23-33.
  15. González S. N. Estado actual de la tuberculosis en México y en el ámbito mundial. *Vacunación Hoy.* 2007, 15 (86): 50-55.
  16. García, C. L., Millán, S. F., Anaya, E. AM. Situación de la tuberculosis bovina en México, 1990-2004. *Memorias de XXIX Congreso Nacional de Buiatría*, 2006.
  17. Clavijo, A. M., Rolo de M., Alfaro, C. Corso, M. Todo lo que usted debe saber sobre la tuberculosis bovina. *Revista Digital CENIAP HOY Número Especial 2004.* Maracay, Aragua, Venezuela.
  18. Pan/American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, regional office of the World Health Organization, International Meeting on the Eradication of Bovine Tuberculosis in the America; Saltillo Coahuila, México. Nov 1991, 18-20.
  19. Soto, O. C. Caracterización de la reacción histoquímica de *Mycobacterium tuberculosis* con rojo neutro. Correlación con el contenido de Sulfolípidos. *Universidad Autónoma de Barcelona.* 2002.
  20. Ryan, K. J., Ray, C. G. *Sherris Medical Microbiology.* 4th ed., McGraw Hill, 2004.

21. Murray, J. L., Styblo, K., Rovillon, A. Tuberculosis in developing countries burden, intervention and cost. Bull. Int. Union Tuber. Lung Dis. 1990, 65: 6-24.
22. Coates, A. R. M., Allen, R. W., Hewitt, J., Ivanyi, J., Mitchison, D. A. Antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. Lancet, II, 1981, 167: 167-169.
23. Yoshida, N. Role of gamma/delta T-cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. Kurume Med J. 2001, 48: 175-181.
24. Abbas, A., Lichtman, A. Inmunología celular y molecular 4ta ed. España. Ed. McGraw Hill. 2003; 354-360.
25. Haslo, K., Ardersen, A., Nagai, S., Gottschau, A., Sorensen, T., Ardersen, P. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infec. Immun. 1995, 63: 804-810.
26. Herrera, B. T. M., Torres, R. M., Juárez, C. E., Sada, D. E. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. Rev Inst Nal Enf Resp. Mex. 2005, 18: 327-336.
27. Jareway, Ch., Travers, P. Inmunología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2° ed. Ed. Masson. España. 2003.
28. Stenger, S., Modin, R. L. T-cell in immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Current Opinion in Microbiol. 1999, 2: 89-93.
29. Batoni, G., Esin, S., Harris, R. A., Kallenius, G., Svenson, S. B., Anderson, R., Campa, M., Wigzell, H.  $\gamma\delta$ + and CD4+  $\alpha\beta$ + human T-cell subset responses upon stimulation with various *Mycobacterium tuberculosis* soluble extract. Clin. Exp. Immunol. 1998, 112: 52-62.
30. D'Souza, C. D., Cooper, A. M., Frank, A. A., Mazzaccaro, R.J., Bloom, B. R., Orme, I. M. An anti-inflammatory role for  $\gamma\delta$  T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 1997, 158: 1217-1221.
31. Kaufmann, S. H. E., Blum, C., Yamamoto, S. Crosstalk between  $\alpha\beta$  T cells and  $\gamma\delta$  T cells *in vivo*: activation of  $\alpha\beta$  T cells responses after  $\gamma\delta$  T cells with monoclonal antibody GL3. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993, 90: 9620-9624.

32. Ladel, C. H., Blum, C., Dreher, A., Reifenberg, K., Kauffmann, S. H. E. Protective role of  $\gamma\delta$  T cells and  $\alpha\beta$  T cells in tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* 1995, 25: 2877-2881.
33. Pollock, J. M., Pollock, D. A., Campbell, D. G., Girvin, R. M., Crockard, A. D., Neill, S. D., Mackie, D. P. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 1996, 87: 236-241.
34. MacHugh, N. D., Mburu, J. K., Carol, M. J., Wyatt, C. R., Orden, J. A., Davis, W. C. Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology* 1997, 92: 340-345.
35. Clevers, H., MacHugh, N. D., Bensaid, A., Dunlap, S., Baldwin, C. L., Kaushal, A., Iams, K., Howard, C. J., Morrison, W. I. Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4-CD8- T cell receptor gamma/delta+ T lymphocytes. *Eur J 238 Immunol.* 1990, 20: 809-817.
36. Cassidy, J. P., Bryson, D. G., Gutierrez Cancela, M. M., Forster, F., Pollock, J. M., Neill, S. D. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. *J Comp Pathol* 2001, 124: 46-51.
37. Alexander, D., Shiroo, M., Robinson, A., Biffen, M., Shivnan, E. The role of CD45 in T-cell activation resolving the paradoxes?. *Immunol Today.* 1992; 13: 477-81.
38. Sánchez-Guerrero, V. I. M., Herrero, H. N., Vegara, P. R., M., Campos, M., García-Alonso, A. M., Álvarez, L. M. R. Diferente expresión de CD45RA y CD45RO por linfocitos T CD4+ en asma intrínseca y extrínseca. *Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín.* 1998, 13 (3): 160-166.
39. García, L. F., Barrera, L. F. Perspectivas para nuevas vacunas antituberculosas en la era posgenómica. *Biomédica.* 2004, 24 (1): 228-238.
40. Clemens, J. D., Chuong, J. J. H., Feinstein, A. R. The BCG controversy: A methodological and statistical reappraisal. *JAMA* 1983; 249: 2362-69.
41. Wijngaard, P. L. J., Metzelaar, M. J., MacHugh, N. D., Morrison, W. I., Clevers, H. C. Molecular characterisation of the WC1 antigen expressed

- specifically on bovine CD4-CD8 gamma-delta T-lymphocytes. *J. Immunol.* 1992, 149: 3273-3277.
42. Liébana, E., Girvin, R. M., Welsh, M. D., Neill, S. D., Pollock, J. M. Generation of CD8+ T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 1999, 67: 1034-1044.
43. Wedlock, N., Vesosky, B., Skinner, M. A. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate protein and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 2000, 68 (10): 5809-5815.
44. Rook, G. A. W., Hernández-Pando, R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol.* 1996, 50: 259-284.
45. Flynn, J. L., Chan, J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001, 19: 4089-4098.
46. Gulle, H., Fray, L. M., Gormley, E. P., Murray, A., Moraity, K. M. Response of bovine T cells to fractionated lysate and culture filtrate proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Vet. Immun. Immunopathol.* 1995, 48: 183-190.
47. Buddle B. M., Pollock, J. M., Skinner, M. A., Wedlock, N. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int Jour Paras.* 2003, 33: 555-566.
48. Preparación y estandarización del derivado proteico purificado (PPD) de la tuberculina. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina. OPS-OMS. Nota Técnica N° 17. Nov. 1972.
49. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-254.
50. Hogg, A. E., Worth, A., Beverley, P., Howard, C. J., Villarreal-Ramos B. The antigen-specific memory CD8+ T-cell response induced by BCG in cattle resides in the CD8+ $\gamma/\delta$ TCR-CD45RO+ T-cell population. *Vaccine* 2009, 27: 270-279.

51. Rothel, J. S., Jones, S. L., Comer, L. A., Cox, J. C., Word, P. R. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J.* 1990, 67: 134-137.
52. Ritacco, V., López, B., Barrera, L., Nader, A., Fliess, E., Cantor, I. N. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Med.* 1990, 37: 19-27.
53. Glatman-Freedman. Advances in antibody mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. *Immunol Med Microbiol* 2003; 39:9-16.
54. Vordermieir HM, Venkataprasad N, Harris DP, Ivanyi J. Increase of tuberculosis infection in the organs of B celldeficient mice. *Clin. Exp. Immunol* 1996; 106:312-316.
55. Cavalcante S, Kritski AL, Ferreira MA, Souza MA, Laszlo A, Wemeck-Barrosdo EB, Fonseca LS. Association between an early humoral response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens and later development of tuberculosis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:170-4.
56. Forget A, Benoit JC, Turcotte R, Gusew-Chartrand N. Enhancement activity of anti-mycobacterial sera in experimental *Mycobacterium bovis* (BCG) infection in mice. *Infect Immun* 1976;13:1301-1306.
57. Hussain R, Shiratsuchi H, Phillips M, ellner J, Wallis RS. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in mycobacterial antigen-stimulated monocytes-implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:210-218 .
58. Adkins, B. Development of neonatal Th1/Th2 function. *Int. Rev. Immunol.* 2000, 19:157-171.
59. Morein, B., I. Abusugra, and G. Blomquist. Immunity in neonates. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002, 87:207-213.
60. Barrington, G.M., Parish, S.M. *Inmunologia Neonatal Bovina. Inmunología.* Buenos Aires, 2004: 1-15.

61. Senogles, D. R., Muscota C. C., Paul, P. S. Ontogeny of circulating B lymphocytes in neonatal calves. *Res Vet Sci.* 1978, 25: 34-36.
62. Osburn, B. I., Stabenfeldt, G. H., Ardens, A. A. Perinatal immunity in calves. *J. Am Vet Med Assoc.* 1974, 164: 295-298.
63. Cassisy, J.; Bryson, D.; Cancela, M.; Foster, F.; Pollock, J.; Neill, S. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early stage bovine tuberculous lesions. *J. Comp. Pathol.* 2001, 124: 46-51.
64. Neil, S.D.; Bryson, D.G.; Pollock, J.M., Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tubercul.* 2001, 81: 79-86.
65. Waters, W. R., Palmer, M. V., Pesch, B. A., Olsen, S. C., Wannmuehler, M. J., Whipple, D. L. Lymphocyte subset proliferative responses of *Mycobacterium bovis*-infected cattle to purified protein derivative. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000, 77: 257-73.
66. Waters, W. R., Nonnecke, B. J., Rahner, T. E., Palmer, M. V., Whipple, D. L., Horst, R. L. Modulation of *Mycobacterium bovis*-specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001, 8: 1204-12.
67. Rhodes, S. G., Palmer, N., Graham, S. P., Bianco, A. E., Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 2000, 68: 5393-400.
68. Lightbody, K.; Mcnair, J.; Neill, S.; Pollock, M. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunized and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Vet. Micro.* 2000, 75: 177-188.
69. Pollock, J.; Andersen, P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent *Mycobacteria* for specific diagnosis of tuberculosis. *J. Inf. Dis.* 1997, 175: 1251- 1254.
70. Ritacco, V.; López, B.; Dekantor, I.; Barrera, L.; Errico, F.; Nader, A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 1991, 50: 365-367.



71. Skinner, M.; Parlane, N.; McCarthy, A.; Buddle, B. Cytotoxic T-cell responses to *Mycobacterium bovis* during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis. *Immunol.* 2003, 110: 234-241.
72. Kampen, A, H. Olsen, I., Tollersrud, T., Storset, A, K., Lund, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, 113: 53-63.
73. Andersen, P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 1997, 45: 115–131.
74. Kaufmann, S. H. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today.* 1988, 9: 168–174.
75. Ladel, C. H., Daugelat, S., Kaufmann, S. H. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I and II deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur. J. Immunol.* 1995, 25: 377–384.
76. Buza, J., Kiros, T., Zerihun, A., Abraham, I., Ameni, G. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacilli Calmette Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion blood  $\gamma\delta$  T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, 130: 1-5.
77. Blanco, F. C., Schierloh, P., Bianco, M. V., Caimi, K., Meikle, V., Alito, A. E., Cataidi, A. A., Sasiain, M. C., Bigi, F. Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. *Microbio Immunol.* 2009, 53: 460-467.
78. Cantrell DA, Smith KA: Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J Exp Med.* 1983, 158: 1895–1911.
79. Akbar AN, Amlot PL, Ivory K, Timms A, Janossy G: Inhibition of alloresponsive naive and memory T cells by CD7 and CD25 antibodies and by cyclosporine. *Transplantation.* 1990, 50: 823–829.
80. Coutinho, A., Larsson, E. L., Gronvik, K. O., Anderson, J. Studies on T lymphocyte activation II. The target cells for Concanavalin A induced growth factors. *Eur. J. Immunol.* 1979. 9: 587-592.

81. Nualláin, E. M., Davis, W. C., Costello, E., Pollock, J. M., Monaghan, M. L. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle using an immunoassay for bovine soluble interleukin-2 receptor- $\alpha$  (sIL-2R- $\alpha$ ). 1997a.
82. Smyth, A.; Welsh, M.; Girvin, M.; Pollock, J. *In Vitro* Responsiveness of  $\gamma\delta$  T Cells from *Mycobacterial Bovis*-Infected Cattle to Mycobacterial Antigens: Predominant Involvement of WC1 + Cells. *Infection and Immun.* 2001, 69 (1): 89-96.
83. Bukowski, J.; Morita, C.; Brenner, M. Human  $\gamma\delta$  T-cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immun.* 1999, 11: 57-65.
84. Liebana, E.; Aranaz, A.; Dominguez, L.; Mateos, A.; Llamazares, O.; Ferr, E.; Domingo, M.; Vidal, D.; Cousins, D. The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprint of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Vet. Microbiol.* 1997, 54: 223-233.
85. McNair, J.; Corbett, D.; Girvin, R.; Mackie, D.; Pollock, J. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scand. J. Immunol.* 2001, 53: 365- 371.
86. Shen, Y., Zhou, D., Qiu, L., Lai, X., Simon, M., Shen, L., Kou, Z., Wang, Q., Jiang, L., Estep, J., Hunt, R., Clagett, M., Sehgal, P.K., Li, Y., Zeng, X., Morita, C.T., Brenner, M.B., Letvin, N.L., Chen, Z.W. Adaptive immune response of V $\gamma$ 2V $\delta$ 2+ T cells during mycobacterial infections. *Science (New York, NY)*. 2002, 295: 2255–2258.
87. Sireci, G., Champagne, E., Fournie, J. J., Dieli, F., Salerno, A. Patterns of phosphoantigen stimulation of human V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell clones include Th0 cytokines. *Hum. Immunol.* 1997. 58: 70–82.
88. Puan, K. J., Jin, C., Wang, H., Sarikonda, G., Raker, A. M., Lee, H. K., Samuelson, M. I., Marker-Hermann, E., Pasa-Tolic, L., Nieves, E., Giner, J. L., Kuzuyama, T., Morita, C. T. Preferential recognition of a microbial metabolite by human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells. *Int. Immunol.* 2007, 19: 657–673.

89. Boom, W. H. Gamma delta T cells and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 1999, 1: 187–195.
90. Tanaka, Y., C. T. Morita, Y. Tanaka, E. Nieves, M. B. Brenner, B. R. Bloom. Natural and synthetic nonpeptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature.* 1995, 375: 155–158.
91. Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, et al. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91: 8175–8179.
92. Schild, H., N. Mavaddat, C. Litzengerger, E. W. Ehrich, M. M. Davis, J. A. Bluestone, L. Matis, R. K. Draper, and Y. H. Chien. The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell.* 1994, 76: 29–37.
93. Bembridge, G. P., Machugh, N. D., Mckeever, D., Awino, E., Sopp, P., Collins, R. A., Gelder, K. I., Howard, C. J. CD45RO expression on ovine T cells: relation to biological function. *Immunology.* 1995, 86: 537-544.
94. Dutton, R. W., Bradley, L. M., Swain, S. L. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 1998, 16: 201–223.

»