

# Evaluación de subpoblaciones de linfocitos T en bovinos vacunados contra la tuberculosis bovina: estudio longitudinal comparativo

## Evaluation of T lymphocyte subpopulations in cattle vaccinated against bovine tuberculosis: longitudinal comparative study

Xochitl Eva González González<sup>a</sup>, Laura Jaramillo Meza<sup>b</sup>, Ricardo Lascurain Ledezma<sup>c</sup>, Jorge Torres Barranca<sup>a</sup>, Eve-Lyne Quevillon Cardinal<sup>d</sup>, Fernando Díaz Otero<sup>b</sup>

### RESUMEN

La respuesta inmune a las micobacterias es compleja y en ella participan diferentes poblaciones de linfocitos T; sin embargo la clave en la defensa contra estos microorganismos es el establecimiento de una respuesta inmune tipo Th1. El objetivo fue realizar un análisis de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y de la expresión del marcador de activación en becerras vacunadas con BCG, o con el extracto proteico del filtrado de cultivo (CEPE) de *Mycobacterium bovis* bajo condiciones de campo. Se formaron tres grupos con cinco becerras cada uno, seleccionadas aleatoriamente. Uno se inoculó subcutáneamente con BCG, 10<sup>4</sup> UFC; otro con 300 µg/ml del CFPE y el tercero fue el testigo. Los resultados de seguimiento de la respuesta inmune se analizaron por MANOVA. La BCG indujo la producción de IFN-γ en una etapa más temprana que el CFPE, sin diferencia estadística entre ellos. El CFPE además de inducir la producción de IFN-γ favoreció la respuesta mediada por anticuerpos ( $P < 0.05$ ). En el grupo vacunado con BCG se observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD4 en los cultivos estimulados con PPD bovis ( $P < 0.05$ ). La proporción de linfocitos T γδ activados fue mayor en el grupo vacunado con CFPE en el día 30 postvacunación; misma que se incrementó para el grupo BCG al día 60. La dosis de vacuna BCG empleada fue capaz de inducir una respuesta proliferativa de linfocitos CD4 con mayores niveles de IFN-γ que el CFPE como inmunógeno, señalando el desarrollo de una mejor respuesta inmune en los becerros vacunados con la BCG.

**PALABRAS CLAVE:** Tuberculosis bovina, Vacunas, Inmunidad, Linfocitos.

### ABSTRACT

The immune response to mycobacteria is complex and involves different T cell subsets. However, the key in the resistance against the bacillus is the establishment of a cell-mediated immune response. The objective of this study was to carry out a comparative analysis of different subpopulations of T lymphocytes and expression of cellular activation marker CD25 in calves vaccinated with BCG or with *Mycobacterium bovis* culture filtrate protein extract (CEPE) under field conditions. Three randomly assigned groups of 5 calves each were formed. One of them vaccinated subcutaneously with BCG, 10<sup>4</sup> CFU; another with 300 µg/ml of CFPE and the third group was the control. The results of monitoring the immune response were analyzed by MANOVA. The BCG induced IFN-γ production in an earlier stage than the CFPE in the vaccinated groups with no statistical difference between them. The CFPE, besides inducing IFN-γ production, enhanced antibody-mediated response ( $P < 0.05$ ). The group vaccinated with BCG showed a higher percentage of CD4 T lymphocytes in cultures stimulated with bovine PPD ( $P < 0.05$ ). The rate of γδ T lymphocyte activation was higher in CFPE group at d 30 post-vaccination, which increased for BCG group at d 60. Thus the dose of BCG vaccine used in the study was capable of inducing a proliferative response of CD4 T cells with higher levels of IFN-γ than CFPE as immunogen, indicating a better immune system enhancement in calves vaccinated with BCG.

**KEY WORDS:** Bovine tuberculosis, Vaccines, Immunity, Lymphocytes.

Recibido el 17 de agosto de 2010. Aceptado el 14 de enero de 2011.

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, UAM-X. México.

<sup>b</sup> CENID-Microbiología Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), SAGARPA. Carretera México-Toluca, Km. 15.5 Col. Palo Alto. México 05110, Tel: (+52-55) 36180800 Ext. 34 o 60. Fax: (+52-55) 36180805, diof0009@servidor.unam.mx. Correspondencia al último autor.

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

<sup>d</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) produce un impacto directo en la eficiencia productiva y reproductiva del ganado bovino de leche, y como consecuencia provoca importantes pérdidas económicas al sector pecuario; a más de representar un riesgo para la salud humana<sup>(1)</sup>; por eso las estrategias de control basados en la vacunación se consideran la mejor alternativa. Para conseguir éxito en ese propósito es necesario determinar las condiciones óptimas bajo las cuales debe aplicarse la vacuna, así como comprender los mecanismos inmunológicos que ofrecen resistencia contra la enfermedad. Siendo *Mycobacterium bovis* un patógeno intracelular es deseable que las vacunas que se empleen induzcan una inmunidad tipo Th1, caracterizada por la producción significativa de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL-12), citocinas responsables de la activación y efecto microbicida de los macrófagos, principales células efectoras contra microorganismos intracelulares<sup>(2)</sup>.

En bovinos infectados con *M. bovis* se determinó que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos producen cantidades más altas de IFN- $\gamma$  en relación a otras poblaciones celulares<sup>(3)</sup>. De igual modo, las células T CD8<sup>+</sup> poseen un papel importante en la resistencia hacia la tuberculosis, ya que además de destruir directamente a las células infectadas, delimitan el granuloma e impiden la diseminación bacteriana<sup>(4,5)</sup>. Estudios experimentales empleando dosis altas de vacuna BCG ( $8 \times 10^6$  UFC) señalan que la primera población que se activa y prolifera después de la vacunación es la de los linfocitos T $\gamma\delta$ ; mientras que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aumentan a partir de la cuarta semana, siendo las células CD8<sup>+</sup> la última población en activarse<sup>(6)</sup>.

Los linfocitos T $\gamma\delta$  representan el enlace entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida; poseen funciones antiinflamatorias, de protección y de regulación, por tanto representa una primera línea de defensa contra patógenos intracelulares<sup>(7)</sup>. Estas células se acumulan en el sitio de lesión al inicio del proceso infeccioso y funcionalmente son capaces de producir IFN- $\gamma$ , y exhibir citotoxicidad en

## INTRODUCTION

Bovine tuberculosis (BT) has a direct impact in the productive and reproductive efficiency of dairy cattle, causing major economic losses in agriculture, as well as representing a human health risk<sup>(1)</sup>; therefore, control strategies based on vaccination are considered the best alternative. In order to achieve that purpose it is necessary to determine optimal conditions under which vaccination should be administered, as well as to comprehend the immunological mechanisms that offer resistance against the disease. Being *Mycobacterium bovis* an intracellular pathogen, it is desirable that the vaccines used induce Th1 immunity type, characterized by significant production of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumoral necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 12 (IL-12), cytokines responsible for microbicidal effect and activation of the macrophages, main effector cells against intracellular microorganisms<sup>(2)</sup>.

In bovines infected with *M. bovis* it was determined that specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes produce higher quantities of IFN- $\gamma$  in contrast to other cellular populations<sup>(3)</sup>. Likewise, CD8<sup>+</sup> T cells play an important role in resistance against tuberculosis, besides directly destroying infected cells, they delimit the granuloma and prevent bacterial dissemination<sup>(4,5)</sup>. Experimental studies using high doses of BCG vaccine ( $8 \times 10^6$  CFU) report that the first population that is activated and proliferates after vaccination are  $\gamma\delta$  T lymphocytes; while CD4<sup>+</sup> T lymphocytes increase from the fourth week, being CD8<sup>+</sup> the last population to activate<sup>(6)</sup>.

The  $\gamma\delta$  lymphocytes represent the link between innate and adaptive immunity; they possess inflammatory, protection and regulatory functions; therefore, they represent the first line of defense against intracellular pathogens<sup>(7)</sup>. These cells accumulate at the lesion site at the beginning of the inflammatory process and are functionally capable of producing IFN- $\gamma$ , and exhibit cytotoxicity in response to infected macrophages, another of its abilities is to recognize non-peptidic antigens in the absence of classical mechanisms of antigenic presentation<sup>(8,9)</sup>. Molecule CD25, better known as

respuesta a macrófagos infectados, otra de sus habilidades es reconocer antígenos no peptídicos en ausencia de mecanismos clásicos de presentación antigénica<sup>(8,9)</sup>. La molécula CD25 mejor conocida como la cadena alfa del receptor de IL-2 está involucrada en la activación y regulación de las funciones efectoras de los linfocitos, así como en la división y la proliferación de células de memoria. Por tanto su cuantificación es un indicador temprano de la activación celular<sup>(10)</sup>.

Dentro de las estrategias del progreso de mejores vacunas contra la TB se considera necesario identificar aquellos antígenos capaces de inducir una respuesta inmune celular. En relación a ello, se ha observado que las micobacterias vivas, son eficientes en la generación de protección contra la enfermedad; este hecho se ha utilizado como argumento para sustentar que los antígenos secretados durante el metabolismo activo de la micobacteria, y que están presentes en los extractos de filtrado de cultivo (CFPE) son esenciales para el propósito buscado<sup>(11)</sup>. Actualmente no existe claridad sobre cuáles son las mejores condiciones para proteger a los bovinos contra la tuberculosis bovina mediante la vacunación; lo que es innegable es que el tipo de inmunógeno empleado y la dosis son factores determinantes para la inducción de resistencia a la enfermedad<sup>(12,13)</sup>. Así, el objetivo del trabajo fue realizar un análisis comparativo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T y de la expresión del marcador de activación celular CD25 en animales vacunados con BCG, o con el extracto proteico del filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis* bajo condiciones de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Animales de estudio*

Se seleccionaron 15 beceras Holstein-Friesian, entre 15 a 30 días de edad, localizadas en un hato del estado de Hidalgo, México, y que provenían de madres negativas a la prueba de tuberculina; de igual modo durante los primeros días de su nacimiento se les suministró calostro de madres no rectoras. Las beceras se dividieron en tres grupos de forma aleatoria, con cinco animales cada uno. El Grupo I se inoculó subcutáneamente con la

IL-2 alpha chain receptor is involved in activation and regulation of lymphocyte effectors functions, as well as in division and proliferation of memory cells. Therefore, its quantification is an early indicator of cellular activation<sup>(10)</sup>.

Within the strategies to improve vaccines against BT, it is necessary to consider identifying those antigens capable of inducing immune cellular response. According to this, it has been observed that live mycobacteria are efficient in generating protection against the disease; this fact has been used as argument to sustain that the secreted antigens during mycobacteria active metabolism, which are present in culture filtered extracts (CFPE) are essential for this purpose<sup>(11)</sup>. Up to date, it is not clear which are the best conditions to protect bovines against bovine tuberculosis with vaccination; what is undeniable is that the immunogen used and dose are determinant factors to induce resistance to the disease<sup>(12,13)</sup>. Therefore, the aim of this research was to carry out a comparative analysis of the different subpopulations of T lymphocytes and of the expression of cellular activation marker CD25 in BCG vaccinated animals, or with culture filtrate protein of *Mycobacterium bovis* under field conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study animals*

Fifteen Holstein-Friesian calves between 15 to 30 d of age, of a herd in the State of Hidalgo, Mexico, coming from cows tested negative to tuberculin were selected; likewise, during the first days of birth they received colostrum from their non-reactive mothers. Calves were randomly divided in three groups, with five animals each. Group 1 was inoculated subcutaneously with *Mycobacterium bovis*-BCG strain Phipps vaccine ( $1 \times 10^4$  CFU); Group 2 received 300 µg/ml culture filtrate protein extract (CFPE) by the same route; Group 3 remained as control and was inoculated with 1 ml of PBS as placebo. Calves were sampled each 15 d during the first month and then each 30 d for three months to evaluate IFN- $\gamma$  production in blood samples stimulated with bovine PPD, and antibody levels by

vacuna BCG cepa Phipps de *M. bovis* ( $1 \times 10^4$  UFC); el Grupo 2 se inoculó con 300  $\mu\text{g/ml}$  del extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE) por la misma ruta; el Grupo 3, testigo, se inoculó con 1 ml de PBS como placebo. Las becerras se muestrearon cada 15 días en el primer mes y posteriormente cada 30 días por espacio de tres meses para evaluar la producción de  $\text{IFN-}\gamma$  en cultivos de sangre estimulados con PPD-bovino, niveles de anticuerpos mediante un ELISA empleando el CFPE de *M. bovis* como antígeno. La respuesta de las subpoblaciones celulares se determinó por citometría de flujo, luego de la estimulación antigénica *in vitro* de cultivos de células mononucleares de sangre periférica.

#### *Obtención del extracto proteico de filtrado de cultivo de M. bovis*

Se empleó la cepa AN5 de *M. bovis* para obtener el extracto proteico utilizado para la inmunización de las becerras y para la evaluación de la inmunidad humoral. La micobacteria se cultivó en medio líquido de Dorset-Henley a 37 °C por seis semanas, al término, los cultivos se filtraron obteniendo el medio libre de bacterias. Las proteínas constituyentes del filtrado se precipitaron con sulfato de amonio a una saturación del 80 %, y se recuperaron por centrifugación a 10,000 rpm por 60 min a 4 °C (Beckman rotor JS-13.1). El precipitado se suspendió en PBS pH 7.2 para dializarse primero contra agua y después con PBS empleando bolsas de diálisis (Spectra/Por) con límite de exclusión de 6 a 8 kDa<sup>(14)</sup>. La concentración de proteína del extracto se determinó por el método de Bradford<sup>(15)</sup>, su concentración se ajustó a 3 mg/ml y dividió en alícuotas que se almacenaron a -70 °C.

#### *Obtención de la vacuna BCG Phipps*

La cepa Phipps de BCG de *M. bovis* se cultivó en medio Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories, Detroit MD, USA) enriquecido con 10% de OADC (Oleic acid-Albumin-Dextrose-Catalase) (BBL Middlebrook OADC Enrichment, Becton Dickinson, Sparks MD, USA) a 37 °C por 15 días. Posteriormente, se inocularon frascos conteniendo medio Middlebrook 7H9 líquido (BBL Middlebrook 7H9 Broth Base, Becton Dickinson, Cockeysville

ELISA, using *M. bovis* CFPE as antigen. The response of cellular subpopulations was assessed by flow cytometry, after *in vitro* antigenic stimulation of peripheral blood mononuclear cell cultures.

#### *Obtainment of M. bovis culture filtrate protein extract*

The *M. bovis* strain AN5 was used for obtainment of protein extract used for immunization of the calves and for humoral immunity evaluation. Mycobacteria were grown in Dorset-Henley liquid medium at 37 °C for 6 wk; subsequently, cultures were filtered obtaining free-bacteria medium. Filtered constituent proteins were precipitated with ammonium sulfate at 80 % saturation, and they were recuperated by centrifugation at 10,000 rpm for 60 min at 4 °C (Beckman rotor S-13.1). The precipitate was suspended in PBS pH 7.2 to be first dialyzed against water and then with PBS using dialysis bags (Spectra/Por) with exclusion limit of 6 to 8 kDa<sup>(14)</sup>. Protein extract was assessed by Bradford's method<sup>(15)</sup>, its concentration was adjusted at 3 mg/ml and was divided into aliquots that were stored at -70 °C.

#### *Obtainment of BCG Phipps vaccine*

*M. bovis* BCG strain Phipps was grown in Middlebrook 7H11 medium (Difco Laboratories, Detroit MD, USA) enriched with 10% OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) (BBL Middlebrook OADC Enrichment, Becton Dickinson, Sparks MD, USA) at 37 °C for 15 d. Subsequently, test tubes containing Middlebrook 7H9 liquid medium (BBL Middlebrook 7H9 Broth Base, Becton Dickinson, Cockeysville MD, USA) enriched with 10% OADC and 0.5% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Inc.) were inoculated. Cultures were incubated at 37 °C for 8 d with constant agitation until reaching the logarithmic mean phase. Dilutions in 7H10 medium were carried out and cellular concentration at  $1 \times 10^4$  CFU/ml in sterile PBS was adjusted<sup>(16)</sup>.

#### *Interferon-γ test (IFN-γ)*

Blood samples with heparin were taken from calves and were distributed in cell-culture plates in sterile conditions at a ratio of 1.5 ml of blood per well,

MD, USA) enriquecido con 10% de OACD y 0.5% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, Inc.). Los cultivos se incubaron a 37 °C por ocho días con agitación constante; hasta alcanzar la fase media logarítmica. Se realizaron diluciones en medio 7H10 y se ajustó la concentración celular a  $1 \times 10^4$  UFC/ml en PBS estéril<sup>(16)</sup>.

#### *Prueba de Interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )*

Se obtuvieron muestras de sangre con heparina de las becerras, la cual se distribuyó en placas de cultivo en condiciones de esterilidad a razón de 1.5 ml de sangre por pozo, considerando tres pozos por muestra. Uno de los cultivos se estimuló con 100  $\mu$ l de PPD bovino, otro con 100  $\mu$ l de PPD aviar (ambos PPD a una concentración de 0.3 mg/ml) y dejó uno sin estimular. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h bajo una atmosfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación se obtuvo el plasma de los cultivos para evaluar la producción de IFN- $\gamma$  mediante un ELISA sándwich, empleando un kit comercial (BOVIGAM<sub>TM</sub> Bovine Gamma Interferon Test)<sup>(17)</sup>.

#### *Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)*

Para la determinación de anticuerpos se cubrieron placas de ELISA (Maxisorb, NUNC) con el CFPE de *M. bovis* a razón de 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l disuelto en solución amortiguadora de carbonato/bicarbonato (0.1 M), pH 9.6 por pozo. Los sitios de unión libres se bloquearon con leche descremada al 3% en PBST. Luego de este procedimiento y del lavado de las placas, se depositaron 100  $\mu$ l de cada uno de los sueros diluidos 1:100 en solución bloqueadora, y se incubaron por 1 h a 37 °C. Nuevamente se lavaron las placas y se agregaron 100  $\mu$ l de proteína-G peroxidasa (Sigma-Aldrich Chemicals. St. Louis MO., USA) a una dilución 1:10,000, incubando 1 h a 37 °C. Después de los correspondientes lavados se agregó la solución de revelado [4  $\mu$ g de orto-fenilendiamina (Sigma-Aldrich Chemicals. St. Louis MO., USA) disuelta en 10 ml solución amortiguadora de citratos pH 4.5, adicionando 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%]. La reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l/pozo de la

considering three wells per sample. One of the cultures was stimulated with 100  $\mu$ l of bovine PPD, other with 100  $\mu$ l of avian PPD (both PPD at a concentration of 0.3 mg/ml and one was left without stimulation. Cell-culture plates were incubated at 37 °C for 24 h under humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub>. Once incubated, plasma was obtained from the cultures for evaluation of IFN- $\gamma$  production by the sandwich ELISA, using a commercial kit (BOVIGAM<sub>TM</sub> Bovine Gamma Interferon Test)<sup>(17)</sup>.

#### *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*

For antibody assessment, ELISA plates (Maxisorb, NUNC) were coated with *M. bovis* CFPE at a ratio of 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l dissolved in carbonate/bicarbonate buffer (0.1M), pH 9.6 per well. Free binding sites were blocked with skimmed milk at 3% in PBST. After this process and plate washing, 100  $\mu$ l of each serum diluted at 1:100 blocking buffer were deposited and incubated for 1 h at 37 °C. Once again, plates were washed and 100  $\mu$ l of protein G-peroxidase (Sigma-Aldrich Chemicals. St. Louis MO., USA) were added to a 1:10 000 dilution, incubating for 1 h at 37 °C. After the corresponding washings, developing solution was added [4  $\mu$ l of ortho-phenylenediamine (Sigma-Aldrich Chemicals. St. Louis MO, USA) dissolved in 10 ml citrate buffer preparation, pH 4.5, added with 4  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 3%]. The reaction was stopped by addition of 50  $\mu$ l/well of stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2M). The test absorbances at 492 nm were assessed<sup>(18)</sup>.

#### *Obtainment of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)*

For cellular population assessment, blood in heparin from calves were obtained, diluted at 1:2 with sterile PBS and overlaid on Ficoll-Hypaque. Test tube content was centrifuged (Eppendorf 5810R) at 2,800 rpm for 40 min and PBMC interface was recovered. Cell suspension was washed with sterile PBS at a centrifugation of 1,500 rpm for 5 min. Cell viability was determined by trypan blue exclusion test. Subsequently, its concentration was adjusted to  $2.5 \times 10^6$  cells/ml in RPMI-1640 supplemented medium (10 mM of HEPES buffer, 2 mM of L-glutamine, 50  $\mu$ M of 2-mercaptoethanol, 100 U/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and 10% fetal serum).

solución de paro (H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2M). Se determinaron las absorbancias de la prueba a 492 nm<sup>(18)</sup>.

*Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

Para la determinación de las poblaciones celulares se obtuvo sangre de las becerras con heparina, la cual se diluyó 1:2 con PBS estéril y depositó sobre Ficoll-Hypaque. Los tubos con los contenidos se centrifugaron (Eppendorf 5810R) a 2,800 rpm por 40 min y recuperó la interfase de las PBMC. La suspensión celular se lavó con PBS estéril centrifugando a 1,500 rpm x 5 min. Se determinó la viabilidad de las células mediante el método de exclusión con azul tripan. Posteriormente se ajustó su concentración a 2.5 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI-1640 suplementado (10 mM del amortiguador HEPES, 2 mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomycin y 10% suero fetal).

*Estimulación de linfocitos*

La suspensión celular se distribuyó a razón de 1.5 ml/pozo en placas de cultivo de 24 pozos (Nunclon, Roskilde, Denmark), considerando dos pozos por muestra. Uno de los cultivos se estimuló con 100 µl de PPD bovis (0.3 mg/ml) y al otro se le adicionaron 100 µl de PBS como testigo. Los cultivos se incubaron a 37 °C por 72 h bajo una atmosfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación las células se colectaron y transfirieron a microtubos para eliminar el sobrenadante por centrifugación y efectuar un lavado con PBA (PBS estéril pH 7.2, conteniendo azida

*Lymphocyte stimulation*

Cell suspension was distributed at a ratio of 1.5 ml/well in cell-culture plates of 24 wells (Nunclon, Roskilde, Denmark), considering two wells per sample. One of the cultures was stimulated with 100 µl of bovine PPD (0.3 mg/ml), and 100 µl of PBS were added to the other one, as control. Cultures were incubated at 37 °C for 72 h under humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. At the end of incubation, cells were collected and transferred to micro tubes to discard all supernatant by centrifugation and were washed with PBA (sterile PBS pH 7.2, containing 0.2% sodium azide and 0.2% bovine serum albumin) to perform population labeling by indirect staining.

*T lymphocyte subpopulations and IL-2 receptor (CD25) labeling*

Cells were suspended in 1 ml of PBA and divided in four parts that were deposited in micro tubes, then centrifuged at 1,500 rpm for 10 min, monoclonal antibody correspondent to previous established dilutions was added, it was gently mixed and then incubated at room temperature for 30 min. After being washed by centrifugation, the second fluorescent monoclonal antibody was added according to the isotype of the first monoclonal antibody used (Table 1) and incubated for 30 min at room temperature. Finally, it was washed with PBA at 1,500 rpm for 10 min and 500 µl of FACSFlow solution were added (BD Biosciences San Jose, CA) for its analysis<sup>(19)</sup>.

*Flow cytometry*

The acquisition and analysis of subpopulation phenotype data was performed by FACSCalibur flow

Cuadro 1. Características de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en la técnica de citometría de flujo  
Table 1. Characteristics of primary and secondary antibodies used in flow cytometry

Specificity of monoclonal antibody	Catalog number (IgG isotype)	Specificity of the conjugate
CD4*	IL-A11(IgG2a)	**Phycoerythrin goat anti-mouse IgG, Fcγ subclass 2b
CD8*	BAT82A(IgG1)	**Fluorescein goat anti-mouse IgG, Fcγ subclass 1
CD25*	CACT116A(IgG2a)	**Phycoerythrin goat anti-mouse IgG, Fcγ subclass 2a
WC1-γδ*	CACTB32A(IgG1)	**Fluorescein goat anti-mouse IgG, Fcγ subclass 1

\* VMRD, \*\*Jackson ImmunoResearch.

de sodio al 0.2 % y albúmina sérica bovina al 0.2 %) para efectuar el marcaje de las poblaciones por tinción indirecta.

#### *Marcaje de subpoblaciones de linfocitos T y el receptor de IL-2 (CD25)*

Las células se suspendieron en 1 ml de PBA y se dividieron en cuatro partes que se depositaron en microtubos, luego de centrifugar a 1,500 rpm por 10 min se adicionó el anticuerpo monoclonal correspondiente a diluciones previamente establecidas, se mezcló suavemente y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 min. Después de lavarse por centrifugación se adicionó el segundo anticuerpo monoclonal fluorescente según el isotipo del primer anticuerpo monoclonal empleado (Cuadro 1), incubándose por 30 min a temperatura ambiente. Al final se lavó con PBA a 1,500 rpm 10 min, y se adicionaron 500 ml de la solución FACSCFlow (BD Biosciences San José, CA) para su análisis<sup>(19)</sup>.

#### *Citometría de flujo*

La adquisición y análisis de los datos del fenotipo de las subpoblaciones se realizó mediante el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson San José EU). Se capturaron 5,000 eventos y mediante un gráfico de tamaño contra complejidad celular se estableció la región de los linfocitos. Para el análisis de los datos se empleó el software WinMDI 2.8.

#### *Análisis estadístico*

Se realizó un análisis de varianza multivariada (MANOVA) para la comparación de resultados entre grupos en los diferentes tiempos de muestreo, empleando el programa estadístico JMP Starter (USA)<sup>(20)</sup>.

## RESULTADOS

#### *Evaluación de IFN- $\gamma$ en becerras vacunas con BCG o con CFPE*

Los niveles de IFN- $\gamma$  al inicio del experimento para los diferentes grupos en presencia del PPD bovis fueron bajos,  $0.178 \pm 0.0165$  (promedio de la  $D.O_{450nm} \pm$  error estándar), incrementándose a

cytometer (Becton Dickinson San Jose, USA). Five thousand events were acquired and by means of size vs cell complexity graphic, lymphocyte region was established. For data analysis, software WinMDI 2.8 was used.

#### *Statistical analysis*

Multivariate analysis of variance (MANOVA) was carried out for comparison of results between groups at different sample intervals, using JMP Starter (USA) statistical program<sup>(20)</sup>.

## RESULTS

#### *Evaluation of IFN- $\gamma$ in calves vaccinated with BCG or with CFPE*

At the beginning of the experiment, the levels of IFN- $\gamma$  for the different groups in presence of bovine PPD were low,  $0.178 \pm 0.0165$  (mean of  $OD_{450nm} \pm$  standard error), increasing over time and without being significant within the first 2 wk post-vaccination for the different groups. At 30 d, the greatest response was observed in the BCG vaccinated group,  $0.788 \pm 0.298$  vs  $0.487 \pm 0.104$  of the CFPE vaccinated group and  $0.2198 \pm 0.106$  of the control group. In the subsequent months, cytokine levels decreased in BCG vaccinated group; whereas at 60 d, CFPE vaccinated group showed the highest production level,  $0.8531 \pm 0.5812$ . During the experiment, mediator production increases evaluated for the control group were observed, but values recorded in the first 2 mo of the experiment did not exceed the ones determined for vaccinated groups, with the exception of the last sampling in which IFN- $\gamma$  production was superior to these,  $1.215 \pm 1.142$  (Figure 1a); there was no statistical difference between groups.

#### *Humoral immune response in calves vaccinated with BCG or with CFPE*

The antibody average before vaccination was similar between groups,  $0.144 \pm 0.0307$  ( $OD_{492nm} \pm$  standard error); levels continuously increased during the first weeks after injection, mainly for CFPE inoculated group, recording the greatest value for this group at 30 d,  $1.003 \pm 0.202$ . A similar

través del tiempo y sin ser significativo en las primeras dos semanas pos vacunación para los diferentes grupos. A los 30 días se observó la mayor respuesta en el grupo vacunado con BCG,  $0.788 \pm 0.298$  vs  $0.487 \pm 0.104$  del grupo vacunado con CFPE y  $0.2198 \pm 0.106$  del grupo testigo. En los meses subsecuentes los niveles de la citocina descienden en el grupo vacunado con BCG; en tanto que a los 60 días en el grupo vacunado con el CFPE se registró el nivel más alto de producción,  $0.8531 \pm 0.5812$ . Durante el experimento se observaron incrementos en la producción del mediador evaluado para el grupo testigo, pero los valores que se registraron en los primeros dos meses del experimento no excedieron a los que se determinaron para los grupos vacunados, a excepción del último muestreo en el que la producción de IFN- $\gamma$  fue superior a estos,  $1.215 \pm 1.142$  (Figura 1a), no existió diferencia estadística entre grupos.

*Respuesta inmune humoral en becerras vacunadas con BCG o con CFPE*

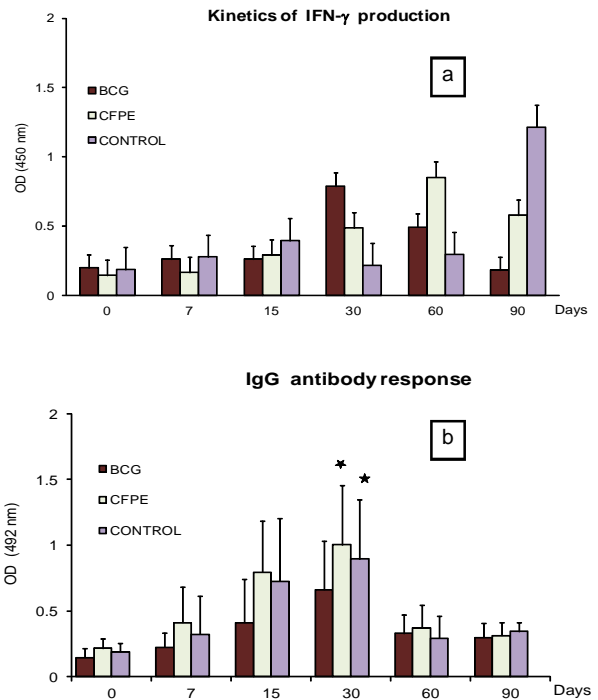
El promedio de anticuerpos antes de la vacunación fue similar entre grupos,  $0.144 \pm 0.0307$  (D.O<sub>492nm</sub>  $\pm$  error estándar); luego de la aplicación los niveles se fueron incrementando durante las primeras semanas principalmente para el grupo inoculado con el CFPE, registrándose precisamente el valor más alto para este grupo a los 30 días,  $1.003 \pm 0.202$ . Un comportamiento similar se observó en el grupo testigo, mayormente los niveles de anticuerpos determinados para este grupo fueron más altos que los que se registraron en las becerras vacunadas con BCG,  $0.894 \pm 0.203$  vs  $0.661 \pm 0.369$  respectivamente. En los meses posteriores la respuesta de anticuerpos desciende para todos los grupos (Figura 1b). Los resultados mostraron diferencia significativa en tiempo ( $P < 0.05$ ).

*Evaluación de subpoblaciones de linfocitos T*

El porcentaje promedio de células T CD4<sup>+</sup> que se registró antes de la aplicación de las vacunas en las becerras que fueron inoculadas con BCG y las del grupo testigo fue del 25 %, en tanto que el del grupo vacunado con CFPE fue del 17 %. A los 15 días pos vacunación hubo un incremento significativo luego de la estimulación *in vitro* en el grupo

Figura 1. Cinética de producción de IFN- $\gamma$  (a) y respuesta de anticuerpos IgG (b) en los grupos vacunados con BCG, o con el CFPE de *Mycobacterium bovis* y grupo testigo durante los tres primeros meses postvacunación

Figure 1. Kinetics production of IFN- $\gamma$  (a) and IgG antibody response (b) in vaccinated groups with BCG or with *Mycobacterium bovis* CFPE, and control group during the first three months post-vaccination



The IFN- $\gamma$  was evaluated by sandwich ELISA in supernatants of whole blood culture stimulated with bovine PPD; OD<sub>450 nm</sub>  $\pm$  standard error mean value. Antibody evaluation was determined by indirect ELISA with *M. bovis* CFPE coated plates; OD<sub>492 nm</sub>  $\pm$  standard mean error value. ( $P < 0.05$ ).

performance was observed in the control group, the antibody levels determined for this group were higher than the recorded in BCG vaccinated calves,  $0.894 \pm 0.203$  vs  $0.661 \pm 0.369$ , respectively. In the following months, antibody response decreased in all groups (Figure 1b). The results showed significant difference in time ( $P < 0.05$ ).

*Evaluation of T lymphocyte subpopulations*

The average percentage of CD4<sup>+</sup> T cells that was recorded before the administration of vaccines in

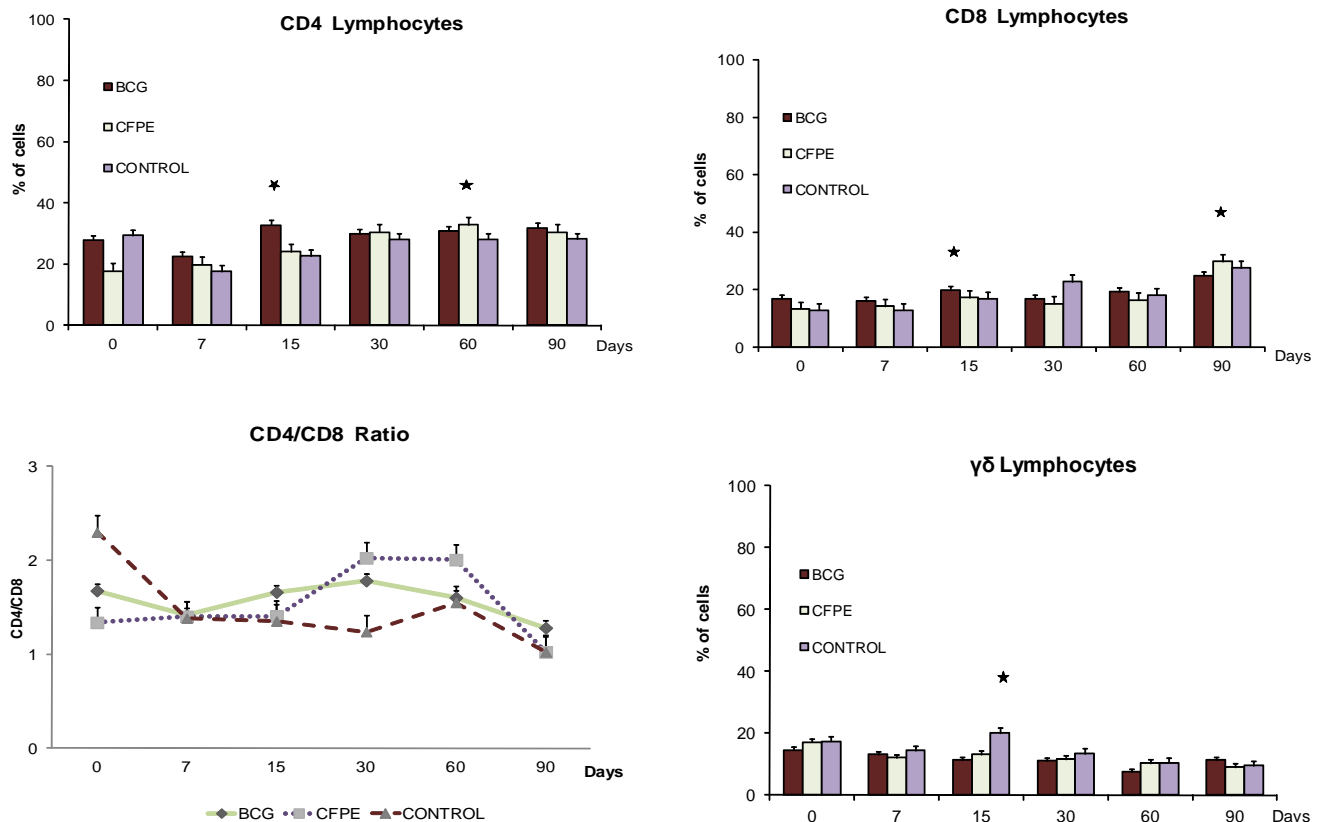


vacunado con BCG, 32.7 % ( $P < 0.05$ ). De igual modo, un porcentaje significativo de esta población celular se determinó en el grupo inoculado con el CFPE a los 60 días, 32.8 % ( $P < 0.05$ ) (Figura 2a). En relación a las células T CD8<sup>+</sup> en el grupo vacunado con BCG el porcentaje más alto se registró a los 15 días con un valor promedio del 19 % ( $P < 0.05$ ), situación que coincide en tiempo con el mayor porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> observado para este grupo. En tanto que en el grupo inoculado con el CFPE el valor más alto de células T CD8<sup>+</sup> se determinó a los 90 días, 29 % ( $P < 0.05$ ). Los porcentajes del grupo testigo estuvieron por debajo de los valores de los grupos vacunados en las

calves that were inoculated with BCG and control group was 25 %, whereas the average percentage determined in CFPE vaccinated group was 17 %. At 15 d post-vaccination, there was significant increase after *in vitro* stimulation in BCG vaccinated group, 32.7 % ( $P < 0.05$ ). Likewise, a significant percentage of this cellular population was determined in the CFPE inoculated group at 60 d, 32.8 % ( $P < 0.05$ ) (Figure 2a). Regarding CD8<sup>+</sup> T cells in BCG vaccinated group, the greatest percentage was recorded at 15 d with a mean value of 19 % ( $P < 0.05$ ), condition that coincides in time with the greatest percentage of CD4<sup>+</sup> T cells observed in this group. While in CFPE inoculated group the

Figura 2. Porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> (a), porcentaje de linfocitos CD8<sup>+</sup> (b), índice de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (c) y porcentaje de linfocitos WC1<sup>+</sup>γδ determinados en cultivos de PBMC estimulados con PPD de *M. bovis* en grupos de becerros vacunados con BCG, CFPE y grupo testigo; valor promedio ± error estándar. ( $P < 0.05$ ).

Figure 2. Percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocytes (a), percentage of CD8<sup>+</sup> lymphocytes (b), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio (c) and percentage of WC1<sup>+</sup>γδ lymphocytes determined in PBMC culture stimulated with bovine PPD in groups of calves vaccinated with BCG, CFPE and control group; mean value ± standard error. ( $P < 0.05$ ).



primeras semanas del experimento, a excepción de los 30 días, cuando el porcentaje fue mayor que los de los grupos vacunados, 22 % *vs* 16 % para BCG y 15 % para CFPE, (Figura 2b). Al inicio la proporción CD4/CD8 era más alta en el grupo testigo 2.29 *vs* 1.67, que se registró para el grupo inoculado con BCG y de 1.33 para el grupo inoculado con CFPE. En las semanas subsecuentes y al final del experimento la proporción en este grupo disminuyó y se mantuvo abajo de la de los grupos vacunados. Mientras que, en el grupo inoculado con BCG se incrementó ligeramente a los 30 días en relación a su valor basal y sin ser mayor a la proporción del grupo inoculado con CFPE; en este último el aumento fue significativo en relación a su valor basal y al que se observó para los demás grupos en los días 30 y 60, con valores de 2.02 y 2.0 respectivamente. Al final del experimento la proporción fue similar entre grupos (Figura 2c).

En relación a las células  $\gamma\delta$ , los porcentajes iniciales fueron similares entre grupos, luego de la vacunación sólo fue evidente un incremento significativo a los 15 días en el grupo testigo, 20 % ( $P < 0.05$ ); pero no para los grupos vacunados en ese periodo, ni en los subsecuentes muestreos, antes bien el porcentaje de estas células disminuyó para los grupos vacunados y testigo a través del tiempo (Figura 2d).

#### *Evaluación de la expresión de CD25*

La expresión de este marcador fue significativa en el grupo inoculado con CFPE a los 30 días con un valor promedio del 65 % ( $P < 0.05$ ) contra el 48 % que se registró al inicio. De igual modo, en el grupo inoculado con BCG se registraron incrementos a los 7 y 30 días, sin ser significativos. La expresión de CD25 en el grupo testigo fue similar e incluso mayor a la que se determinó para los grupos vacunados en las primeras cuatro semanas, en específico el valor más alto para éste se observó en la segunda semana. En el segundo y tercer mes evaluado la expresión de CD25 desciende para todos los grupos, (Figura 3a). Al hacer un análisis comparativo de la activación de células  $\gamma\delta$ , se observó que la relación CD25/ $\gamma\delta$  fue en ascenso en los grupos vacunados durante los primeros dos

greatest value of CD8<sup>+</sup> T cells was determined at 90 d, 29 % ( $P < 0.05$ ). The control group percentages were below values of vaccinated groups during the first weeks of the experiment, except at 30 d, when the percentage was greater than the one of vaccinated groups, 22 *vs* 16 % for BCG and 15 % for CFPE (Figure 2b). At the beginning, CD4/CD8 ratio was greater in control group, 2.29 *vs* 1.67, than the recorded for BCG vaccinated group, and 1.33 for the CFPE inoculated group. In the following weeks and at the end of the experiment, the ratio in this group decreased and remained below the one of vaccinated groups. Whereas in BCG inoculated group, it increased slightly at 30 d in contrast to its basal value and without being greater than the ratio of CFPE inoculated group; in the latter the increase was significant in regard to its basal value and the one observed in the rest of the groups at 30 and 60 d, with values of 2.02 and 2.0, respectively. At the end of the experiment, the ratio was similar between groups (Figure 2c).

Regarding  $\gamma\delta$  cells, the initial percentages were similar between groups, after vaccination only a significant increase at 15 d was evident in control group, 20 % ( $P < 0.05$ ); not so for vaccinated groups during that period of time, or in subsequent samplings; more likely, the percentage of these cells decreased in vaccinated groups and control over time (Figure 2d).

#### *Evaluation of CD25 expression*

The expression of this marker was significant in CFPE inoculated group at 30 d, with a mean value of 65 % ( $P < 0.05$ ) *vs* 48 % recorded at the beginning. Likewise, increases at 7 and 30 d were recorded in BCG vaccinated group, without being significant. CD25 expression in control group was similar and also higher than the one determined for vaccinated groups in the first 4 wk; specifically, the greatest value for this was observed during the second week. In the second and third month evaluated, CD25 expression dropped in all groups (Figure 3a). In the comparative analysis of  $\gamma\delta$  cell activation, it was observed that CD25/ $\gamma\delta$  ratio rose continuously in the vaccinated groups during the first 2 mo; in this regard, it was possible to observe

meses; respecto a ello, fue posible apreciar que en el grupo inoculado con el CFPE la relación fue mayor a los 30 días, con un valor de 5.6; mientras que para el grupo vacunado con BCG la relación más alta se observó a los 60 días con un valor de 5.9. En el grupo testigo la relación siempre estuvo por debajo de los grupos vacunados durante el periodo evaluado (Figura 3b).

## DISCUSIÓN

La inmunidad contra la tuberculosis implica una serie compleja de interacciones entre varias poblaciones celulares, que tienen como finalidad controlar y mantener la infección, así como prevenir al hospedero de una posible reactivación. Estudios al respecto señalan un papel central para las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, las cuales no sólo contribuyen a la defensa del hospedero secretando citocinas activadoras de los macrófagos, sino también lisan o destruyen células infectadas por micobacterias<sup>(2,3)</sup>.

En la evaluación de vacunas contra la TB la cuantificación y seguimiento de la producción de IFN- $\gamma$ , por las células T específicas, ha sido un parámetro esencial que permite determinar parcialmente el establecimiento de la inmunidad protectora, de manera que el aumento de la eficacia de la vacuna está ligado al incremento de la producción específica de IFN- $\gamma$ <sup>(12)</sup>. De acuerdo a ello, los resultados del presente estudio muestran una producción incrementada y moderada de IFN- $\gamma$  en las becerras vacunadas con BCG o con el extracto proteico de *M. bovis* en función del tiempo; apreciándose los niveles más altos a los 30 días pos vacunación en el grupo inoculado con BCG, mientras que para el grupo inoculado con el CFPE la mayor producción se registró a los 60 días; indicando que la dosis baja de vacuna BCG empleada fue capaz de inducir más pronto un nivel apreciable de IFN- $\gamma$ , que el CFPE en los grupos vacunados. En el grupo testigo la producción de la citocina fue significativa a los tres meses que procedieron a la vacunación en relación a los grupos vacunados, situación que se relaciona con la continua sensibilización de los animales a micobacterias ambientales o a las propias cepas de campo

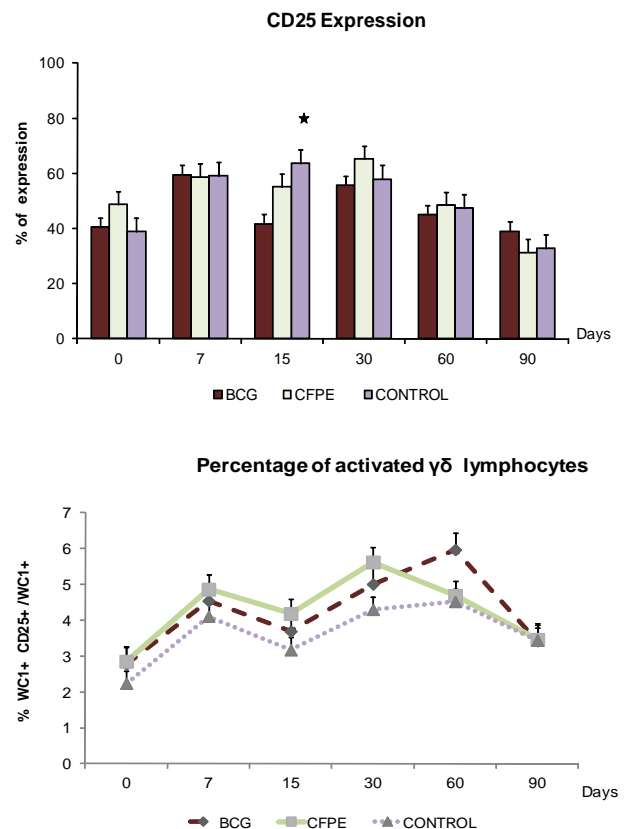
that in CFPE inoculated group the ratio was higher at 30 d, with a value of 5.6; while for BCG vaccinated group the highest ratio was observed at 60 d, with a value of 5.9. In the control group, ratio was always below than the vaccinated groups during the evaluation period (Figure 3b).

## DISCUSSION

Immunity against tuberculosis implies a complex series of interactions between several cellular

Figura 3. Porcentaje de expresión de CD25 en linfocitos T totales (a) y en linfocitos WC1+ gd (b) obtenidos en cultivos de PBMC estimulados con PPD de *M. bovis* de los grupos de becerras vacunadas con BCG, CFPE y grupo testigo; valor promedio  $\pm$  error estándar ( $P < 0.05$ ).

Figure 3. CD25 expression percentage in total T lymphocytes (a) and WC1+ gd lymphocytes (b), obtained from PBMC culture stimulated with bovine PPD from vaccinated calves with BCG, CFPE and control group; mean value  $\pm$  standard error ( $P < 0.05$ ).



virulentas de *M. bovis* circulantes, considerando que el estudio se realizó bajo condiciones naturales, en una explotación en la que se había determinado una prevalencia del 5 % en nacencias y 35 % en vacas en producción.

Se ha comprobado que las becerras al nacer son inmuno-competentes y naturalmente sensibles a los antígenos de micobacterias ambientales, tal es el hecho que a las seis semanas los becerros alcanzan niveles de respuesta inmunitaria celular similares a la de los adultos<sup>(20)</sup>, indicando que a edad temprana los becerros se encuentran inmunológicamente aptos para establecer programas de inmunización, lo cual debe considerarse en el caso particular de las vacunas contra la tuberculosis bovina a fin de evitar la sensibilización por micobacterias ambientales y favorecer el desarrollo de una inmunidad protectora específica<sup>(21,22)</sup>.

Estudios relacionados con el establecimiento de una respuesta protectora ante un desafío controlado en función de la dosis de vacuna BCG, muestran que dosis mayores a  $6 \times 10^6$  UFC a pesar de que inducen una elevada producción de IFN- $\gamma$  en becerras vacunadas, su capacidad de protección ante el desafío es menor que aquella que se desarrolla en becerras vacunadas con una dosis baja<sup>(23)</sup>. Estudios en modelo ratón muestran que dosis bajas inducen preferentemente una respuesta Th1 por el aumento significativo de las citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que dosis altas favorecen el desarrollo de un respuesta Th2 debido a la producción de IL-4 e IL-10, respuesta que no ofrece resistencia ante el desafío micobacteriano<sup>(24)</sup>. Referente a ello, en becerras se ha observado que la vacunación a dosis alta induce una respuesta mixta Th1/Th2, definida por la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4. De igual modo se ha determinado que la aplicación repetida de la vacuna induce esta respuesta mixta, que ante el desafío micobacteriano no es protectora<sup>(25)</sup>.

Se ha puesto en duda la participación de la inmunidad mediada por anticuerpos (IMA) en la protección contra la TB, debido a que la micobacteria es un patógeno intracelular que habitualmente tiene su nicho dentro del macrófago, donde los anticuerpos circulantes, se dice, son

populations, which have the objective to control and maintain infection, as well as to prevent the host of possible reactivation. Other studies report a central role for different T lymphocyte subpopulations, not only contributing for host defense secreting active macrophage cytokines, but also lysing or destroying infected cells by micobacteria<sup>(2,3)</sup>.

In the evaluation of vaccines against BT, quantification and follow-up of IFN- $\gamma$  production, by specific T cells, has been an essential parameter that allows to partially determine the establishment of protective immunity; therefore, improvement of vaccine efficacy is associated with IFN- $\gamma$  specific production increase<sup>(12)</sup>. According to that, the results of the present study show increase and moderate IFN- $\gamma$  production in calves vaccinated with BCG or with *M. bovis* protein extract in terms of time; observing the highest levels at 30 d post-vaccination in BCG group, while for the CFPE inoculated group, the greatest production was recorded at 60 d; showing that low dose of BCG vaccine used was capable to induce more rapid significant levels of IFN- $\gamma$ , than CFPE in vaccinated groups. In control group, cytokine production was significant at three months after inoculation in contrast to vaccinated groups, situation that is associated with continuous exposure of animals to environmental mycobacteria or to circulating *M. bovis* virulent field strains, considering that the study was carried out under natural conditions, in a livestock farm where prevalence of 5 % births and 35 % productive cows had been determined.

It has been proven that calves at birth are immunocompetent and naturally sensitive to environmental mycobacterial antigens, because at 6 wk of age calves reach cell immune response levels similar to adults<sup>(20)</sup>, showing that at short age calves they are immunologically capable for the establishment of an immunization program, which should be considered particularly in the case of vaccines against bovine tuberculosis, in order to avoid sensitivity to environmental mycobacterial antigens and enhance the development of a specific protective immunity<sup>(21,22)</sup>.

Studies related with the establishment of a protective immune response against a controlled challenge in

inaccesibles al microorganismo. Sin embargo, no se puede descartar su participación en la defensa contra la enfermedad, ya que estos facilitan la internalización y fagocitosis por opsonización; además, se ha señalado la internalización por los macrófagos vía receptores Fc que inducen la producción de intermediarios de oxígeno y favorecen la fusión fagosoma-lisosoma. Se ha observado en ratones deficientes de anticuerpos e infectados con *M. tuberculosis* un mayor número de UFC en sus bazo con respecto a ratones testigo sin déficit de anticuerpos mostrando el efecto protector de estos en el control de la enfermedad<sup>(26)</sup>. En este estudio fue evidente que el CFPE además de promover una cantidad apreciable de IFN- $\gamma$ , también indujo un incremento importante en los niveles de anticuerpos en los animales vacunados; resultados similares han sido informados por otros investigadores, quienes han evaluado la utilidad del CFPE como inmunógeno solo, o en combinación con la vacuna BCG en vaquillas. Cuando se emplea solo, como en este trabajo, ellos observaron una respuesta retardada en la producción de IFN- $\gamma$  con niveles altos de anticuerpos, mientras que la combinación BCG-CFPE indujo una producción elevada de IFN- $\gamma$  y un nivel bajo de anticuerpos<sup>(27)</sup>.

Se considera que el papel protector de los anticuerpos dentro de los mecanismos de defensa frente a *M. bovis*, varía dependiendo de la etapa en que se encuentre el proceso infeccioso. Inicialmente cuando la micobacteria llega a la superficie de la mucosa, los anticuerpos actúan como elementos efectores, demostrando el valor de los mecanismos clásicos 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 logra establecerse, los anticuerpos 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 anticuerpos y generar anticuerpos antiidiotipos. La internalización del anticuerpo por medio del receptor Fc es esencial para el desarrollo de la inmunidad celular<sup>(28)</sup>. La opsonización, además de aumentar la capacidad de presentación celular, la actividad

terms of BCG vaccine dose, show that doses higher than  $6 \times 10^6$  CFU besides inducing great IFN- $\gamma$  production in vaccinated calves, their protection capacity against challenge is lower than the one developed in vaccinated calves with low doses<sup>(23)</sup>. Mouse model studies show that low doses mainly induce Th1 response because of the significant increase of IL-2 cytokines and IFN- $\gamma$ , while high doses enhance the development of Th2 response due to IL-4 and IL-10 production, response that does not offer resistance against mycobacterial challenge<sup>(24)</sup>. In this sense, it has been observed that a high vaccination dose in calves induces a mixed Th1/Th2 response, defined by IFN- $\gamma$  and IL-4 expression. Likewise, it has been determined that repeated vaccine administration induces this mixed response, which is non-protective against mycobacterial challenge<sup>(25)</sup>.

The participation of antibody-mediated immunity (AMI) for protection against BT has been put in doubt, because the mycobacterium is an intracellular pathogen that is usually within the macrophage, where circulating antibodies, is said, are inaccessible to microorganisms. However, their participation in defense of the disease cannot be discarded, since these facilitate internalization and phagocytosis by opsonization; besides, the internalization via the Fc receptor of macrophages, which induce production of oxygen intermediates and enhance phagosomelysosome fusion, has been reported. In antibody-deficient and *M. tuberculosis* infected mice, a greater number of CFU has been observed in their spleen *versus* control mice without antibody deficit showing the protective effect of these on disease control<sup>(26)</sup>. In this study, it was evident that CFPE besides promoting significant quantity of IFN- $\gamma$ , it also induced a major increase in antibody levels of vaccinated animals; similar results have been reported by other researchers, who have evaluated the usefulness of CFPE as immunogen alone, or in combination with BCG vaccine in calves. When it is used alone, as in this study, a delayed response in IFN- $\gamma$  production with high antibody levels was observed, while BCG-CFPE combination induced great IFN- $\gamma$  production and low level of antibodies<sup>(27)</sup>.

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. La eficacia de los anticuerpos depende en algunos casos de una IMC intacta, pero la interdependencia y la redundancia entre estos sistemas es un hecho, por lo que los anticuerpos pueden potenciar la respuesta inmune celular, induciendo el mantenimiento de células de memoria en individuos infectados por *M. tuberculosis* o en su caso con *M. bovis*<sup>(29)</sup>.

En ganado vacuno infectado experimentalmente con *M. bovis* la subpoblación de células TCD4<sup>+</sup> parece dominar dentro de las principales células efectoras que proliferan en presencia de los antígenos micobacterianos, produciendo niveles altos de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , citocinas responsables de la actividad microbicida de los macrófagos, por lo cual se dice que una respuesta inmune con estas características evocada por la vacunación, se correlaciona con la protección contra la tuberculosis<sup>(6,30)</sup>. En condiciones normales, el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> oscila entre 20 a 25 % en las primeras semanas de edad de las becerras. En el presente estudio el porcentaje de CD4<sup>+</sup> en el grupo vacunado con BCG se incrementó significativamente a los 15 días pos vacunales, y a los 60 días en el grupo vacunado con el CFPE, coincidiendo en tiempo con la mayor producción de IFN- $\gamma$  observada para este grupo. Las actividades efectoras de la respuesta inmune celular incluyen no sólo la producción de citocinas, sino también la citólisis de células infectadas. La citotoxicidad para el control de patógenos, puede implicar la apoptosis vía interacción fas-ligando de Fas, o bien la lisis/apoptosis de la célula infectada como resultado de la liberación directa de gránulos citotóxicos<sup>(16)</sup>. Por lo cual, el incremento en el porcentaje de las células CD8<sup>+</sup> es un parámetro que permite determinar el establecimiento de inmunidad en los animales vacunados. Los resultados, en este caso, muestran un incremento significativo a los 15 días para el grupo vacunado con BCG, y a los 90 días para el vacunado con CFPE, señalando nuevamente un retardo en el establecimiento de una inmunidad celular para el último grupo referido.

It is considered that antibody protective role within defense mechanisms against *M. bovis* varies depending on the stage of the infectious process. Initially, when the mycobacterium reaches the mucosa surface, the antibodies act as effector elements, demonstrating the value of the neutralization and opsonization classical mechanisms, which would lead to efficient activation of the phagocytic cell and probably bacteria elimination. Supposing that infection takes place, antibodies may be of importance if new concept of their function is taken into account: with a regulator effect on AMI, its interaction with this system and ability to regulate antibody response and generate anti-idiotypic antibodies. The antibody internalization via Fc receptor is essential for the development of cell-mediated immunity<sup>(28)</sup>. The opsonization, besides increasing cell presenting capacity, lysosomal activity and pathogen intracellular degradation, also induces rapid and elevated IL-12 production, which stimulates rapid and preferential immune response towards Th 1. The antibody efficacy depends, in some cases, on an intact AMI, but interdependency and redundancy between these systems is a fact, for which antibodies may potentialize cellular immune response, inducing maintenance of memory cells in *M. tuberculosis* or, in its case, *M. bovis* infected individuals<sup>(29)</sup>.

In cattle experimentally infected with *M. bovis*, TCD4<sup>+</sup> cell subpopulation seems to dominate within the main effector cells that proliferate in presence of mycobacterial antigens, producing high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , cytokines responsible of macrophage microbicidal activity, for which it is said that an immune response with these characteristics induced by vaccination, is correlated with protection against tuberculosis<sup>(6,30)</sup>. In normal circumstances, the percentage of CD4<sup>+</sup> lymphocytes ranges between 20 and 25 % in the first weeks of age in calves. In the present study, the percentage of CD4<sup>+</sup> in BCG vaccinated group significantly increased at 15 d post-vaccination, and at 60 days in CFPE inoculated group, coinciding in time with greater IFN- $\gamma$  production observed in this group. The cell immune response effector activities not only include cytokine production, but also cytolysis of infected cells. Cytotoxicity for pathogen control may imply apoptosis via Fas/Fas ligand interactions,

Estudios de cambios poblacionales en vaquillas de más de seis meses de edad vacunadas con dosis altas de BCG ( $8 \times 10^6$  UFC) muestran que la población que se incrementa en las primeras semanas pos vacunación son las células, seguido de un aumento en la relación CD4/CD8 y declive de la proporción de las células a partir de la cuarta semana, observándose al final de la evaluación un decremento en la relación de esas poblaciones celulares<sup>(6)</sup>. En este estudio se observó en el grupo vacunado con BCG una disminución en el índice CD4/CD8 a los siete días pos vacunación, seguido de un ligero incremento en las semanas posteriores sin ser significativo, en tanto que en el grupo vacunado con el CFPE, la proporción fue mayor entre los 30 a 60 días, siendo el valor más alto determinado para el resto de los grupos; este incremento coincide con lo reportado en cuanto a tiempo de respuesta. No obstante, las diferencias entre lo reportado y nuestros resultados con la vacuna BCG pueden ser debidas a las altas dosis empleadas por otros autores (de 100 a 1000 veces mayores que las aplicadas a las becerras en este estudio); otra diferencia a considerar es la edad en la que se vacunaron las becerras, puesto que se ha observado que a mayor edad se favorece la sensibilización del sistema inmune por micobacterias ambientales y patógenas existentes en los hatos, influyendo grandemente en el balance de las diferentes subpoblaciones linfocíticas, por la constante exposición del sistema inmune de las becerras<sup>(25)</sup>; para evitar el efecto señalado, las becerras se vacunaron entre las dos y cuatro semanas de edad en este estudio, a fin de favorecer el desarrollo de una respuesta inmune específica.

El marcador de superficie CD25 es el receptor de IL-2 es una molécula involucrada con la activación y función reguladora de los linfocitos, así como en la división y proliferación de las células T de memoria. En los bovinos las diferentes subpoblaciones de células T son reguladas por CD25 en respuesta al estímulo de antígenos de la micobacteria<sup>(31)</sup>. En el experimento, la expresión de IL-2R al inicio y a través del tiempo fueron elevados, observándose sólo diferencia significativa en el grupo inoculado con CFPE a los 30 días pos vacunación. En bovinos sanos se ha mostrado que

or lysis/apoptosis of infected cell as result of direct release of cytotoxic granules<sup>(16)</sup>. Therefore, increase in CD8+ percentage is a parameter that allows determining the establishment of immunity in vaccinated animals. The results, show a significant increase at 15 d in BCG vaccinated group, and at 90 d in CFPE inoculated group, showing once more delay in cellular immunity establishment for the latter group.

Studies of heifers population changes of more than 6-mo of age, vaccinated with high doses of BCG ( $8 \times 10^6$  CFU) show that the population that increases in the first weeks post-vaccination are  $\gamma\sigma$  cells, followed by an increase in CD4/CD8 ratio and decline of  $\gamma\sigma$  cell rate from the fourth week, observing at the end of the evaluation a decrease in ratio of those cellular populations<sup>(6)</sup>. In this study, a decrease in CD4/CD8 ratio was observed in BCG vaccinated group at 7 d, followed by slight increase in the next weeks without being significant; whereas in CFPE inoculated group the rate was higher between 30 and 60 d, being the most highest value determined for the rest of the groups; this increase coincides with the reported in terms of time and response. Notwithstanding, differences between the reported and the results of this study on BCG vaccine may be due to high doses used by other authors (from 100 to 1,000 higher than the ones administered to calves in this study); other difference to be considered is the age in which calves were vaccinated, since it has been observed that aging enhances immune system sensitivity by environmental mycobacteria and existent pathogens in herds, greatly influencing in the balance of different lymphocyte subpopulations, for constant exposure of the immune system in calves<sup>(25)</sup>; to avoid this effect, calves were vaccinated between 2 and 4 wk of age during this study, with the aim to enhance specific immune response.

The IL-2 receptor CD25 used as a surface marker is a molecule involved in activation and regulatory function of lymphocytes, as well as in the division and proliferation of memory T cells. In cattle, different T cell subpopulations are regulated by CD25 in response to the stimulus of mycobacterium antigens<sup>(31)</sup>. At the beginning and throughout this

existe un nivel relativamente alto de expresión de CD25 en células T sin estimular<sup>(9)</sup>, lo cual explica de alguna manera los valores observados al inicio del experimento en los diferentes grupos, y en el grupo sin vacunar durante el desarrollo de éste. Un mayor grado de activación de las células  $\gamma\delta$  se observó en los grupos vacunados, pese a que no hubo una proliferación significativa de estas células, a excepción de la observada en el día 15 para el grupo vacunado con el CFPE; a este respecto se ha informado que la activación y expresión de CD25 en estas células puede ser consecuencia del efecto directo de la IL-2 secretada por las células CD4<sup>+</sup> luego del estímulo antigénico, sin que se inicie su proliferación<sup>(30)</sup>. A diferencia de lo que encontramos, otros estudios muestran fuerte grado de activación de las células  $\gamma\delta$  tras la vacunación de becerras con dosis altas de BCG, conjuntamente con un nivel alto de IFN- $\gamma$ <sup>(6)</sup>, lo cual indicaría el establecimiento de una sólida respuesta inmune hacia *M. bovis*; sin embargo hasta ahora los estudios de vacunación con dosis altas de BCG han mostrado bajo nivel protector ante desafíos experimentales<sup>(32)</sup>.

Las células T  $\gamma\delta$  sirven de enlace entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa<sup>(7)</sup>. Reconocen una gran variedad de antígenos así como pequeñas moléculas de fosfato orgánico y proteínas de antígenos sin procesar, que son presentados a través del MHC por lo que su eficiencia, a este respecto, es mejor que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup><sup>(7,8)</sup>. Hasta ahora, no existe una fórmula única, que señale cuáles son los mejores biomarcadores a considerar en el establecimiento de una inmunidad protectora inducida por vacunación contra la tuberculosis bovina; lo que sí está ampliamente documentado es la influencia que tiene la sensibilización del sistema inmune del hospedero por micobacterias ambientales y la edad de vacunación para conseguir una inmunidad duradera y específica contra *M. bovis*, por lo cual en el estudio se consideró la aplicación de las vacunas a edad temprana con resultados satisfactorios.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Los resultados indican que la aplicación de la vacuna BCG a una dosis baja, así como el empleo del

experimento IL-2R expresión was elevated, only observing significant difference in CFPE inoculated group at 30 d post-vaccination. In healthy bovines, it has been demonstrated that there is a relatively high CD25 expression level in non-stimulated T cells<sup>(9)</sup>, which explains in a certain way the values observed at the beginning of the experiment in the different groups, and in the non-vaccinated group during its developing. A higher degree of  $\gamma\delta$  cell activation was observed in vaccinated groups, despite there was no significant proliferation of these cells, with the exception of the observed at d 15 in CFPE inoculated group; in this regard, it has been reported that CD25 expression and activation in these cells may be consequence of a direct effect of IL-2 secreted by CD4<sup>+</sup> after antigenic stimulus, without initiating its proliferation<sup>(30)</sup>. In contrast to what was found, other studies show a strong degree of  $\gamma\delta$  cell activation after vaccination of calves with high BCG doses, along with a high IFN- $\gamma$  level<sup>(6)</sup>, which would show the establishment of a solid immune response to *M. bovis*; however, up until now, studies on vaccination with high BCG doses have shown low protective level against experimental challenges<sup>(32)</sup>.

The  $\gamma\delta$  T cells serve as a link between innate immunity and adaptive immunity<sup>(7)</sup>. They recognize a great variety of antigens as well as small phosphate organic molecules and antigen proteins without being processed, which are presented through MHC, for which their efficiency, in this sense, is better than CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes<sup>(7,8)</sup>. Up to date, there is no unique formula that indicates which are the best biomarkers to be considered in the establishment of a protective immunity induced by vaccination against bovine tuberculosis; what is widely documented is the influence that sensitivity of the host immune system has on environmental mycobacteria and the vaccination age to obtain a durable and specific immunity against *M. bovis*; for which in this study, the administration of early stage vaccination with satisfactory results was considered.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The results show that administration of BCG vaccine at a low dose, as well as the use of *M. bovis* CFPE



CFPE de *M. bovis* como inmunógeno, en becerras recién mantenidas durante el estudio en un hato lechero de alta prevalencia, promovieron la proliferación y activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, con un nivel moderado en la producción de IFN- $\gamma$ , los cuales son indicadores del desarrollo de una buena inmunidad contra *Mycobacterium bovis*.

as immunogenic, in calves kept in a high prevalence dairy herd throughout the study, promoted CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte proliferation and activation, with moderate IFN- $\gamma$  production, which are indicators of the development of good immunity against *Mycobacterium bovis*.

## AGRADECIMIENTOS

A la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), por la donación de los sobrenadantes de cultivo de *M. bovis* AN5. Así también por la asesoría incondicional al Dr. Chiharu Murata por el valioso apoyo en el análisis estadístico.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to the Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), for donating *M. bovis* AN5 culture supernatants, and to Dr. Chiharu Murata for guidance and counseling of the statistical analysis.

*End of english version*

## LITERATURA CITADA

- Clavijo AM, Rolo de M, Alfaro C, Corso M. Todo lo que usted debe saber sobre la tuberculosis bovina. Revista Digital CENIAP HOY 2004, Número Especial Maracay, Aragua, Venezuela. [en línea] [http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas\\_tec/ceniaphoy/articulos/ne/arti/clavijo\\_a/arti/clavijo\\_a.htm](http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/ne/arti/clavijo_a/arti/clavijo_a.htm). Consultado 15 May, 2010.
- Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, et al. Immune responses in bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2001;81(1-2):103-107.
- Buddle BM, Wedlock N, Denis M, Skinner MA. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. Vet Immunol Immunopathol 2005;108(1-2):45-51.
- Du G, Chen Cy, Shen Y, Quiu L, Huang D, Wang R, Chen ZW. TCR repertoire, clonal dominance, and pulmonary trafficking of Mycobacterium-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T effector cells in immunity against tuberculosis. J Immunol 2010;185(7):3940-3947.
- Woodworth JS, Behar SM. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8<sup>+</sup> T cells and their role in immunity. Crit Rev Immunol 2006;26(4):317-352.
- Buza J, Kirov T, Zerihun A, Abraham I, Ameni G. Vaccination of calves with Mycobacterium bovis Bacilli Calmete Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion blood  $\gamma\delta$  T cells. Vet Immunol Immunopathol 2009;130:1-5.
- Plattner BL, Hostetter J. Comparative gamma delta T cell Immunology: A focus on mycobacterial disease in cattle. Vet Med Inter 2011;2011:214384.
- Welsh MD, Kennedy HE, Smyth AJ, Girvin RM, Andersen P, Pollock JM. Responses of bovine WC1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells to protein and nonprotein antigens of Mycobacterium bovis. Infect Immun 2002;70(11):6114-6120.
- 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<sup>+</sup> Cells. Infect Immun 2001;69(1):89-96.
- Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and correlation with cell proliferation. Cytometry 1997;27(1):71-76.
- Grotzke JE, Siler AC, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. Secreted immunodominant Mycobacterium tuberculosis antigens are processed by the cytosolic pathway. J Immunol 2010;185(7):4336-4343.
- Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nat Rev Immunol 2001;1(1):20-30.
- Buddle BM, Wedlock D N, Parlange NA, Corner LA, De Lisle GW, Skinner MA. Revaccination of neonatal calves with Mycobacterium bovis BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. Infect Immun 2003;71(11):6411-6419.
- Preparación y estandarización del derivado proteico purificado (PPD) de la tuberculina. Centro Panamericano de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina. OPS-OMS. Nota Técnica N 17. 1972.
- Bradford MM. 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.
- Hogg AE, Worth A, Bevrley P, Howard CJ, Villarreal-Ramos B. The antigen-specific memory CD8<sup>+</sup> T-cell response induced by BCG in cattle resides in the CD8<sup>+</sup>  $\alpha$ TCR<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-cell population. Vaccine 2009;27(2):270-279.
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\alpha$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Austr Vet J 1990;67(4):134-137.
- Ritacco V, López B, Barrera L, Nader A, Fliess E, Cantor IN. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. J Vet Med 1990;37:19-27.

19. Nonnecke BJ, Waters WR, Foote MR, Palmer MV, Miller BL, Johnson TE, Perry HB, Fowler MA. Development of an adult-like cell-mediated immune response in calves after early vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Dairy Sci* 2005;88:195-210.
20. Bray H, Scott EM. Multivariate analysis of variance. USA. Sage University Paper. 1985;(54).
21. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Leslie GW. Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002;20(7-8):1126-1133.
22. Brandt L, Feino CJ, Weinreich OA, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: Some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002;70:672-678.
23. Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 1995;13:1123-1130.
24. Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of immune response independently of whether immunization is administered by intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infect Immun* 1998;66(2):5743-5750.
25. Buddle BM, Wedlock DN, Parlane NA, Corner LA, de Leslie GW, Skinner MA. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduce the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infect Immun* 2003;71(11):6411-6419.
26. Vordermeier HM, Venkataprasad N, Harris DP, Ivanyi J. Increase of tuberculosis infection in the organs of B cell deficient mice. *Clin Exp Immunol* 1996;106:312-316.
27. Wedlock N, Vesosky B, Skinner MA. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2000;68(10):5809-5815.
28. Olivares N, Vila A, Moya A, Sarmientos ME, Acosta A, Mohd N. Papel de los anticuerpos en la protección contra *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccinmonitor* 2006;15(3):15-20.
29. Waters RW, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, *et al.* Tuberculosis immunity: Opportunities from studies with cattle. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:768542.
30. Hope JC, Thom ML, McAulay M, Mead E, Vordermeier HM, Clifford D, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18(3):373-379.
31. Waters WR, Rahner TE, Palmer MV, Cheng D, Nonnecke BJ, Whipple DL. Expression of L-Selectin (CD62L), CD44, and CD25 on activated bovine T cells. *Infect Immun* 2003;71(1):317-326.
32. Buddle BM. Tuberculosis vaccines for cattle: the way forward. *Expert Rev. Vaccines* 2010;9(10):1121-1124.