

# Respuesta inmune en terneros experimentalmente infectados con diferentes dosis de *Mycobacterium bovis*

BLANCO, F.C.<sup>1</sup>; BIANCO, M.V.<sup>1</sup>; MEIKLE, V.<sup>1</sup>; GARBACCIO, S.<sup>2</sup>; VAGNONI, L.<sup>1</sup>; CATALDI, A. A.<sup>1</sup>; BIGI, F.<sup>1</sup>

## RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad zoonótica producida por *Mycobacterium bovis* que afecta a animales de producción causando pérdidas económicas y representa, además, un problema para la salud pública. El conocimiento de la respuesta inmune inducida en el ganado bovino (el principal hospedador de *M. bovis*), durante la tuberculosis bovina es esencial para el desarrollo exitoso de medidas de control de la enfermedad. En este trabajo se determinó el perfil de respuesta celular que se desarrolla en terneros experimentalmente infectados con variadas dosis de *M. bovis*. Se observó que la respuesta celular CD4 es independiente de la dosis de inóculo, mientras que la respuesta celular CD8 es mínima cuando se infectan los animales a bajas dosis. También se observó que el nivel de producción de interferón gama (IFN- $\gamma$ ) por células monocíticas de sangre periférica no se asocia a la dosis de inóculo.

**Palabras Clave:** Tuberculosis bovina, Respuesta inmune, Infección experimental, *M. bovis*

## ABSTRACT

*Mycobacterium bovis*, the causative agent of bovine tuberculosis, infects animals of agricultural importance and others mammals, including humans. Therefore, this disease causes significant economical losses and is a public health hazard. To better understand the immune response against *M. bovis* in cattle, in this study we characterized the immunological profile towards *M. bovis* antigens in cattle experimentally infected at various doses of a virulent *M. bovis* strain by measurement of IFN- $\gamma$  production in peripheral blood mononuclear cells and by determining which lymphocyte subsets are involved in recall responses of peripheral blood mononuclear cells from infected cattle to *M. bovis* antigens. We found that the level of CD4 cell activation is similar among infected group irrespectively of the doses used to infect the animals, while activation of CD8 cells is dose-dependent. We also found that the production of IFN- $\gamma$  in peripheral blood mononuclear cells after specific stimuli is not associated with the bacterial counts in the infectious doses.

**Keywords:** Bovine tuberculosis, Immune response, experimental infection, *M. bovis*.

## INTRODUCCIÓN

*Mycobacterium bovis*, el agente causal de la tuberculosis bovina, infecta a animales de importancia agropecuaria y reservorios salvajes. Mientras que el bovino es el principal hospedador de *M. bovis*, otros mamíferos también pueden ser infectados. En la Argentina se encontraron cerdos con lesiones tuberculosas y se identificaron también ciervos y cabras tuberculosas (1). Así, la tuberculosis bovina es un factor que limita el desarrollo de la industria lechera y de la

carne en el comercio internacional, por lo que es esencial controlar y erradicar esta enfermedad.

La tuberculosis bovina es, además, una enfermedad zoonótica importante en muchos países del mundo ya que representa un problema para la salud pública. La infección en humanos ocurre con el consumo de leche no pasteurizada o sus derivados, o cuando la gente entra en contacto con el ganado infectado. Un estudio llevado a cabo en la principal cuenca lechera de nuestro país mostró que en el

1 Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, N. Repetto y De los Reseros, 1686 Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

2 Instituto de Patobiología, CICVyA-INTA, N. Repetto y De los Reseros, 1686 Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

Recibido 18 de marzo de 2011 // Aceptado 21 de junio de 2011 // Publicado online 06 de julio de 2011

período 1984-1989, *M. bovis* fue responsable del 2,4 al 6,2% de los casos de tuberculosis en humanos, de los cuales el 64% de esos pacientes eran trabajadores rurales y de frigoríficos (2).

La respuesta inmune efectiva contra la tuberculosis está basada en inmunidad celular del tipo T *helper* 1 (Th1) (3, 4, 5). La respuesta T celular adaptativa involucra la activación de células T CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$  por células dendríticas (DC), las cuales migran del sitio de la infección en el alvéolo pulmonar a los nódulos linfáticos (6, 7). La producción de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 12 (IL-12) por las DCs o los macrófagos infectados con micobacterias patógenas es primordial para el desarrollo de las células Th1 (5, 7, 8, 9, 10). De manera contraria, la respuesta de tipo T *helper* 2 (Th2) inducida por la infección con *M. bovis* contrarresta a la Th1 e incrementa la inmunidad humoral a medida que la infección progresa. La respuesta de tipo Th2 se caracteriza por la producción de las citoquinas tales como interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 5 (IL-5) e interleuquina 10 (IL-10).

Estudios en infecciones experimentales de bovinos con cepas virulentas de *M. bovis* indicaron que inoculaciones con bajas dosis de bacterias resultan en una patología indistinguible de aquellas con altas dosis (11). Si bien dichos estudios hacen una descripción detallada de la patología desarrollada luego de las infecciones experimentales con *M. bovis*, los mismos no describen el perfil inmune que se induce en respuesta a dichas infecciones experimentales. Con el objeto de contribuir a este conocimiento y determinar el impacto que ejerce la carga bacteriana en la dosis de inóculo sobre la respuesta inmune, en este estudio se analizó por citometría de flujo la activación de poblaciones linfocitarias en células mononucleares de sangre periférica de terneros inoculados con diferentes dosis de una cepa virulenta de *M. bovis*. Asimismo, se determinó la producción de IFN- $\gamma$  en dichas poblaciones celulares como un marcador de inmunidad celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Infecciones experimentales y preparación de células mononucleares de sangre periférica

Se infectaron tres grupos de cuatro terneros cada uno, de la raza Holando-Argentino por la vía intratraqueal con la cepa de colección *M. bovis* NCTC 10772 en las siguientes dosis:  $10^9$ ,  $10^7$  y  $10^5$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los ensayos se realizaron en dos etapas en un box de bioseguridad de nivel III localizado en el CNIA-INTA. Las experiencias cumplieron con las reglamentaciones locales para el uso de animales de experimentación y de organismos infecciosos de categoría III. Se tomaron muestras de sangre previamente a las infecciones y a los 15 y 90 días post infección (dpi) para la evaluación del estado inmune.

Se empleó sangre heparinizada (10 ml) para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por gradiente de centrifugación sobre histopaque

1077 (Sigma Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incubaron las CMSP a 37° C en medio RPMI completo suplementado con suero fetal bovino al 10% (Internegocios) y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a concentración final de PPDB (del inglés *protein purified derivated*) (Biocor) en placas de cultivo de 12-pozos por 48h.

Parte de la sangre entera heparinizada (1,2 ml) fue empleada para la determinación de la liberación de IFN- $\gamma$  por kit de ELISA Bovigam (Prionics). La técnica fue realizada según protocolo especificado por el fabricante.

### Citometría de flujo

Se incubaron  $2 \cdot 10^6$  células con o sin PPDB. Luego de las incubaciones se marcaron las células con anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos (AdD Serotec, Oxford, UK) para evaluar la expresión de los marcadores de superficie  $\gamma\delta\text{TCR}+\text{WC1}+$  (MCA838F, IgG2a), CD4 (MCA 1653A647, IgG2a) CD8 (MCA837PE, IgG2a) y CD25 (IL-2R) (MCA2430F y MCA2430PE). Los controles de isotipo empleados fueron MOUSE IgG2a NEGATIVE CONTROL:RPE (MCA929PE), MOUSE IgG2a NEGATIVE CONTROL: Alexa Fluor 647 (MCA929A647) y MOUSE IgG2a NEGATIVE CONTROL: FITC (MCA929F)(AdD Serotec, Oxford, UK).

Se analizaron las células marcadas en un citómetro FACScalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) empleando el programa CellQuest, adquiriendo 10.000 eventos por muestra. El análisis se realizó en el grupo de células con características linfocitarias según parámetros de tamaño y granularidad establecidos en el instrumento. Se determinó la expresión de IL-2R en poblaciones WC1+, CD4+ y CD8+. Los porcentajes de células que expresan IL-2R se calcularon como la razón entre las células positivas para CD25 en CD4+, CD8+ y WC1+ y el total de células de cada una de estas subpoblaciones.

El análisis de los datos se realizó empleando ANOVA para las comparaciones entre los diferentes grupos de animales en cada uno de los tiempos de muestreo y el test de Mann-Whitney para las comparaciones de los datos de un mismo grupo a diferentes tiempos de muestreo (Graph-Pad prism 3.0).

## RESULTADOS

### Activación de linfocitos CD4+, CD8+ en CMSP de terneros infectados experimentalmente con distintas dosis infectivas de *M. bovis*

A los 0, 15 y 90 dpi se tomaron muestras de sangre de todos los animales. Se procesaron las muestras de sangre para aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y se estimularon con el antígeno de *M. bovis* PPDB. Como se muestra en la figura 1b, todos los animales desarrollan una respuesta CD4+CD25+ equivalente, a los 15 y 90 dpi independientemente de la dosis de inoculación empleada. Dicha respuesta, medida por la ac-

tivación de linfocitos CD4, es mayor a los 90 dpi que a los estadios tempranos de la infección (15 dpi) ( $p < 0.05$ ). Las células WC1+ (figura 1a) no presentaron diferencias de activación entre los grupos. Al igual que lo ocurrido con las células CD4+, el porcentaje de WC1+ aumentó con el transcurso del tiempo pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el caso de los linfocitos CD8+CD25+ los porcentajes fueron distintos entre los grupos de animales ( $p < 0.05$ ). Los bovinos inoculados con la dosis  $10^9$  y  $10^7$  UFCs en comparación con los inoculados con la dosis de  $10^5$  UFCs presentaron mayores porcentajes de CD8+CD25+ (figura 1c). En concordancia con los datos obtenidos para las poblaciones de linfocitos CD4, la activación de linfocitos CD8+ luego de la estimulación con el antígeno PPDB fue incrementando a lo largo del período de infección.

**Activación de subpoblaciones linfocitarias en CMSPs estimuladas con PPDB.**

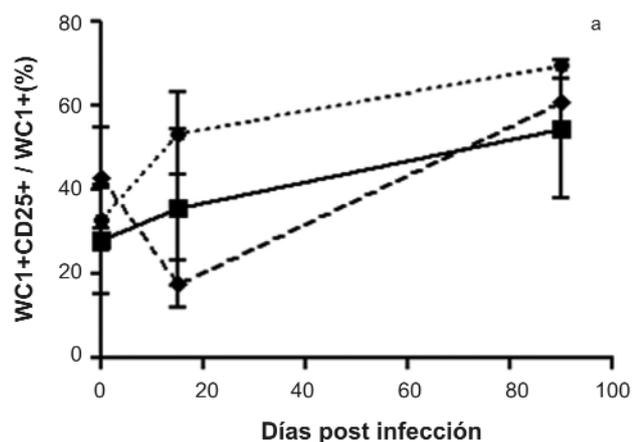


Figura 1a.

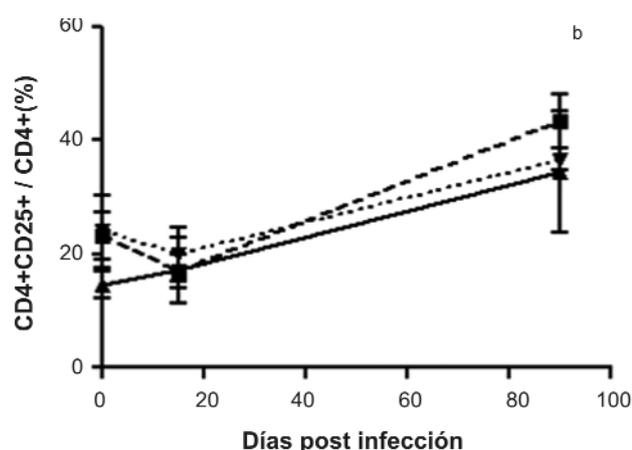


Figura 1b.

**Figura 1.** Porcentajes, media  $\pm$  SEM, de linfocitos WC1+(c), CD4+(b) y CD8+(c) presentes en CMSPs estimuladas con PPDB a los 0, 15 y 90 días post infección. Los grupos de animales fueron inoculados con  $10^5$  (---),  $10^7$  (—) y  $10^9$  (---) unidades formadoras de colonias de *M. bovis* NCTC 10772.

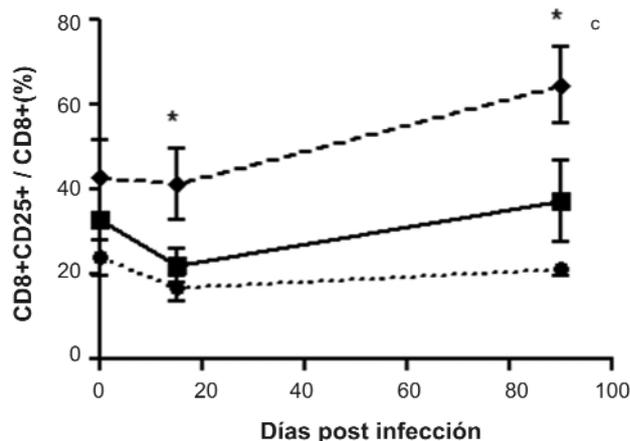


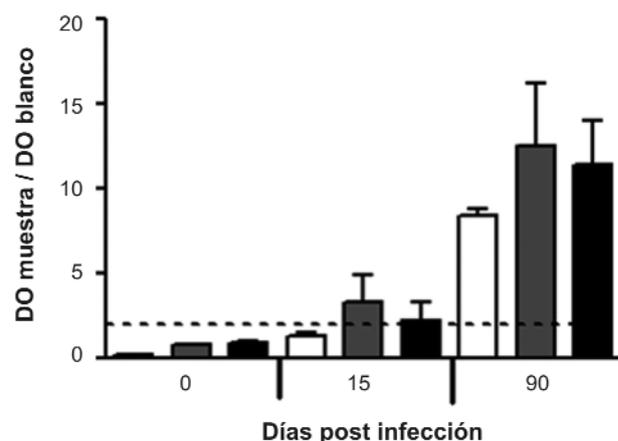
Figura 1c.

**Liberación de IFN- $\gamma$  en sangre de terneros infectados experimentalmente con distintas dosis infectivas de *M. bovis***

Se determinó la producción de IFN- $\gamma$  en sangre periférica antes de realizarse la infección (T0) y a los 15 y 90 dpi de todos los grupos de animales empleando el kit de ELISA Bovigam (Prionics).

Al tiempo 0, todos los animales empleados en el ensayo dieron negativo al test diagnóstico. A los 15 dpi, dos animales del grupo  $10^9$  y dos del grupo  $10^7$  reaccionaron frente al estímulo con PPDB con alta producción de IFN- $\gamma$  recién a los 90dpi la totalidad de animales del ensayo fueron positivos, con niveles medios de IFN- $\gamma$  superiores en los grupos de  $10^9$  y  $10^7$  en comparación con el de  $10^5$ .

**IFN- $\gamma$  liberado frente al estímulo con PPDB**



**Figura 2.** Determinación de IFN- $\gamma$  liberado en sangre entera estimulada con PPDB a los 0, 15 y 90 días post inoculación, los grupos de animales fueron infectados con  $10^5$  (barras blancas),  $10^7$  (barras grises) y  $10^9$  (barras negras) unidades formadoras de colonias de *M. bovis* NCTC 10772.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio revelan que se desarrolló una activación de linfocitos WC1+, CD4+ y CD8+ luego de la estimulación con el antígeno específico PPDB en terneros experimentalmente infectados con variadas dosis de *M. bovis*. Se observó una predominancia de células CD4+ activadas en respuesta al estímulo, independientemente de la dosis de bacterias que se empleó para infectar a los animales. En coincidencia con los resultados presentados en este trabajo, en estudios previos realizados en animales experimental y naturalmente infectados con *M. bovis* se describe una preponderancia de un perfil de respuesta CD4+ frente a estímulo específico a lo largo de la infección. (4, 12, 13, 14).

Si bien ha sido demostrado que los antígenos que se presentan de forma exógena inducen principalmente a células CD4+, las cuales son restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, la activación de células CD8+ luego del estímulo exógeno con antígenos de *M. bovis* ha sido extensivamente validada por los estudios de Liebana *et al.* (15). Los autores postulan que las células presentadoras de antígenos pueden adquirir de forma exógena antígenos micobacterianos mediante fagocitosis y presentarlos por la vía endógena en MHC de clase I (presentación cruzada). En este estudio y en coincidencia con estos trabajos y otros previos (15) se observó una expansión de células CD8+ luego de la estimulación antígeno-específica en aquellos animales inoculados con la dosis de  $10^7$  UFCs y en menor grado en aquellos inoculados con la dosis de  $10^9$  UFCs, lo que podría indicar que un exceso en la carga bacteriana induce una supresión de la respuesta. Sin embargo, se requiere de más estudios para confirmar esta observación. Los terneros inoculados con baja dosis de bacterias mostraron niveles muy pobres de activación de linfocitos CD8+, indicando que, a diferencia de lo que sucede con la activación de linfocitos CD4+, la respuesta de tipo CD8+ depende de la carga bacteriana inicial.

La producción de IFN- $\gamma$  fue mayor a los 90 días post infección para todos los grupos de animales. El valor de la media fue superior en el grupo inoculado con la dosis mayor pero las diferencias con los otros grupos no fue estadísticamente significativa. Este resultado sugiere que un incremento en la carga bacteriana inicial no produce un impacto significativo en el sistema inmune en términos de producción de IFN- $\gamma$ .

## CONCLUSIONES

En resumen, la carga bacteriana inicial, presente en el inóculo, no parece tener efecto sobre los niveles de liberación de IFN- $\gamma$  y la activación de linfocitos CD4+ en terneros experimentalmente infectados con *M. bovis* pero el nivel de la activación de CD8+ varía según el número de bacterias de la dosis infectiva inicial.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la SECyT PICT2324, MinCyT, UE-Mercosur BiotechSur e INTA (proyecto AEBIO243512). FB y AC son investigadores del CONICET.

Agradecemos a Valeria Rocha, Javier Leiva, Diego Soeira y Luis Fernández por la asistencia técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. TORRES, P. 2006. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. Buenos Aires, SENASA. ([http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1013-situacion\\_tuberculosis\\_31\\_12\\_09.pdf](http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1013-situacion_tuberculosis_31_12_09.pdf))
2. LATINI, M.S.; LATINI, O.A.; LOPEZ, M.L.; CECONI, J.O. 1990. Tuberculosis bovina en seres humanos. *Rev Arg Torax* (51), 13-16.
3. KAUFMANN, S.H.M. 2005. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol* (26), 660-667.
4. POLLOCK, J.M.; POLLOCK, D.A.; CAMPBELL, D.G.; GIRVIN, R.M.; CROCKARD, A.D.; NEILL, S.D.; MACKIE, D.P. 1996. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* (87), 236-241.
5. WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; McNAIR, J.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* (114), 101-111.
6. MARTIN, C. 2006. Tuberculosis vaccines: past, present and future. *Curr Opin Pulm Med* (12), 186-191.
7. WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; PESCH, B.A.; OLSEN, S.C.; WANNMUEHLER, M.J.; WHIPPLE, D.L. 2000. Lymphocyte subset proliferative responses of *Mycobacterium bovis*-infected cattle to purified protein derivative. *Vet Immunol Immunopathol* (77), 257-273.
8. BUDDLE, B.M.; WEDLOCK, D.N.; DENIS, M.; SKINNER, M.A. 2005. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* (180), 45-71.
9. ORME, I.M.; COOPER, A.M. 1999. Cytokine chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* (20), 307-312.
10. WATERS, W.R.; NONNECKE, B.J.; RAHNER, T.E.; PALMER, M.V.; WHIPPLE, D.L.; HORST, R.L. 2001. Modulation of *Mycobacterium bovis*-specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Clin Diagn Lab Immunol* (8), 1204-1212.
11. JOHNSON, L.; DEAN, G.; RHODES, S.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M.; WANGOOA, A. 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis* (87), 71-76.
12. MAUE, A.C.; WATERS, W.R.; DAVIS, W.C.; PALMER, M.V.; MINION, F.C.; ESTES, D.M. 2005. Analysis of immune responses directed toward a recombinant early secretory antigenic target six-kilodalton protein-culture filtrate protein 10 fusion protein in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Infect Immun* (73), 6659-6667.
13. WATERS, W.R.; RAHNER, T.E.; PALMER, M.V.; CHENG, D.; NONNECKE, B.J.; WHIPPLE, D.L. 2003. Expression of L-selectin (CD62L), CD44 and CD25 on activated bovine T cells. *Infect Immun* (71), 317-326.
14. BLANCO, F.C.; SCHIERLOH, P.; BIANCO, M.V.; CAIMI, K.; MEIKLE, V.; ALITO, A.E.; CATALDI, A.A.; SASIAIN, M del C.; BIGI, F. 2009. Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. *Microbiol Immunol* (53), 460-7.
15. LIEBANA, E.; GIRVIN, R.M.; WELSH, M.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M. 1999. Generation of CD8 (+) T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* (67), 1034-1044.