



**Universidad Austral de Chile**

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Hugo Folch V.**

Instituto de Inmunología

Facultad de Medicina

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS DEL TIPO  
T<sub>H</sub>1 Y T<sub>H</sub>2 EN DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T  
DE BOVINOS SENSIBILIZADOS CON ANTÍGENO DE *Brucella abortus*  
RB51 Y *Brucella abortus* RB51SOD**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
***Licenciado en Bioquímica*** y Título  
Profesional de ***Bioquímico***

**MARÍA JOSÉ OYARZÚN ALVAREZ**

**VALDIVIA - CHILE**

**2005**

*A mis queridos padres Jaime y Oriana,  
y a mis hermanas María paz, María Consuelo  
y Pilarcita.*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en forma muy especial a mi profesor patrocinante Dr Hugo Folch, por su gran apoyo y confianza depositada en mi para desarrollar esta tesis. Además de su paciencia y buen humor con el cual enfrentó momentos críticos durante esta investigación, los cuales me dieron tranquilidad y confianza para poder continuar adelante.

A los profesores Dr. Miguel Barría y Dr. Víctor Leyán por su gran disposición y ayuda frente a cualquier problema o duda.

A la Dra. Alejandra Droguett por enseñarme a realizar la técnica hibridación “*in situ*”.

A Priscila Muñoz por su extraordinaria ayuda en los momentos en que más se necesitaba, y también por su compañía y amistad.

A todo el personal docente, administrativo y auxiliar del Instituto de inmunología por las facilidades que me otorgaron, y por el gran cariño con el que me trataron.

A Sergio Sánchez por su ayuda con los gráficos de poblaciones linfocitarias.

A mis queridas amigas Pamela del Canto, Alejandra Maureira, Paola Gavilán, Nevenka Mercado y Marlys Moller por su compañía y sincera e incondicional amistad.

Y en último lugar, agradezco a lo más importante que tengo, mi familia. Gracias a mis queridos padres, Jaime y Oriana por su gran amor, paciencia y apoyo durante todos estos años. A mis hermanas María Paz, María Consuelo y Pilar Constanza por el cariño y amistad que siempre me han brindado. Y a mi abuelita Dina, por el gran amor y cuidados que siempre me ha entregado. Gracias! Los quiero mucho.

Esta tesis se desarrolló en el Instituto de Inmunología y fue financiada por FONDECYT 1000431.

## INDICE DE CONTENIDOS

		Página
	<b>INDICE DE FIGURAS</b>	iii
	<b>ABREVIATURAS</b>	iv
<b>1</b>	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>SUMMARY</b>	2
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	11
<b>3.1</b>	Animales	11
<b>3.2</b>	Cepas bacterianas y antígenos de <i>Brucella</i> usados	11
<b>3.3</b>	Obtención de linfocitos	12
<b>3.4</b>	Efecto de la vacunación en bovinos inmunizados con <i>B. abortus</i> RB51 y RB51SOD en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T	12
<b>3.4.1</b>	Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias	14
<b>3.5</b>	Ensayo de proliferación de linfocitos “ <i>in vitro</i> ”	14
<b>3.6</b>	Identificación de citoquinas producidas por células linfoides aisladas de bovinos inmunizados y estimulados “ <i>in vitro</i> ” con <i>B. abortus</i> RB51 y la proteína Cu/Zn SOD recombinante	16
<b>3.6.1</b>	Sondas utilizadas	16
<b>3.6.2</b>	Controles utilizados	16
<b>3.6.3</b>	Preparación de las muestras	17

3.6.4	Protocolo de Hibridación “ <i>in situ</i> ”	17
3.7	Análisis estadístico	18
4	<b>RESULTADOS</b>	19
4.1	Efecto de la vacunación en las subpoblaciones T de linfocitos bovinos	19
4.2	Capacidad inmunogénica de la vacuna <i>B. abortus</i> RB51 para inducir una respuesta blastogénica en linfocitos periféricos de bovinos cuando estos son estimulados “ <i>in vitro</i> ” con la bacteria entera o la proteína Cu/Zn SOD	25
4.3	Determinación de mRNA específico para INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en linfocitos de bovinos vacunados con <i>B. abortus</i> RB51 comercial, e incubados “ <i>in vitro</i> ” con <i>B. abortus</i> RB51 muerta por calor o Cu/Zn SOD recombinante, comparados con los cultivos sin estímulo antigénico	28
5	<b>DISCUSIÓN</b>	36
6	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	39

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>	
<b>Figura 1</b>	<b>Inmunocitoquímica de poblaciones celulares T</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Porcentaje promedio <math>\pm</math> D.E de células T CD3<sup>+</sup></b>	<b>21</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Porcentaje promedio <math>\pm</math> D.E de células T CD4<sup>+</sup></b>	<b>22</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Porcentaje promedio <math>\pm</math> D.E de células T CD8<sup>+</sup></b>	<b>23</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Porcentaje promedio <math>\pm</math> D.E de células T <math>\gamma</math>-<math>\delta</math>.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Respuesta blastogénica luego de 15, 30 y 45 días post inmunización</b>	<b>26</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Respuesta blastogénica 30 días post inmunización</b>	<b>27</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Nivel de síntesis de mRNA para INF-<math>\gamma</math>, IL-2 e IL-4 de linfocitos cultivados sin estímulo antigénico</b>	<b>29</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Nivel de síntesis de mRNA para INF-<math>\gamma</math>, IL-2 e IL-4 de linfocitos estimulados “<i>in vitro</i>” con RB51</b>	<b>30</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Nivel de síntesis de mRNA para INF-<math>\gamma</math>, IL-2 e IL-4 de linfocitos estimulados “<i>in vitro</i>” con la proteína SOD</b>	<b>31</b>
<b>Figura 11</b>	<b>Hibridación “<i>in situ</i>” para INF-<math>\gamma</math></b>	<b>33</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Hibridación “<i>in situ</i>” para IL-2</b>	<b>34</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Hibridación “<i>in situ</i>” para IL-4</b>	<b>35</b>

**ABREVIATURAS**

AEC	Amino-etil-carbazol
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl Phosphate and Nitro Blue Tetrazolium Chloride
CG	Citosina-guanina
cpm	Cuentas por minuto
D.E.	Desviación estándar
DEPC	Di-etil-pirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
INF- $\gamma$	Interferón-gamma
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Tampón citrato sódico salino
TBS	Tampón Tris-HCl salino
UFC	unidades formadoras de colonias
UI	unidades internacionales
g	Aceleración de gravedad

$\mu\text{Ci}$	microCurie
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{l}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
ml	mililitro
mM	milimolar
$^{\circ}\text{C}$	grados Celsius



## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el rol de la proteína Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD) de *Brucella* en la respuesta inmune bovina contra esta bacteria. Estudios previos en ratones han demostrado que SOD es un buen inductor de la respuesta inmune del tipo T<sub>H</sub>1, mediada por células T y conocida por ser determinante para la defensa contra patógenos intracelulares. Si esta característica de la proteína SOD, demostrada en el modelo experimental murino, puede ser demostrada en la especie bovina, se abre la posibilidad de mejorar la vacunación en esta especie usando vacunas de DNA que lleven incerto el gen de SOD o cepas que sobreexpresen dicho gen.

Con el fin de demostrar esta posibilidad, grupos de 5 animales fueron vacunados con la vacuna comercial *B. abortus* RB51 o con la cepa recombinante que sobreexpresa SOD, los animales vacunados y sus controles inyectados con PBS, fueron sangrados y se aislaron los linfocitos periféricos. Después de la inmunización, se determinaron las subpoblaciones T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$ , luego se determinó la capacidad de SOD de inducir transformación blástica y el tipo de citoquinas sintetizadas.

Los resultados demostraron que ni la cepa comercial RB51 ni la cepa recombinante de *Brucella* que sobreexpresa SOD, indujeron un cambio significativo en las subpoblaciones T estudiadas, además SOD fue incapaz de inducir transformación blástica “*in vitro*” en linfocitos obtenidos de animales inmunizados. Por otro lado, la proteína bajo estudio no indujo la síntesis de mRNA para INF- $\gamma$  esperada, por el contrario, SOD fue capaz de aumentar después de 24 horas de incubación la síntesis de mRNA para IL-4, en estas mismas células.

De estos resultados, podemos concluir que SOD en bovinos no es un buen estimulante de inmunidad mediada por células T, como fue demostrado en ratones.

## SUMMARY

In the present work we studied the role of *Brucella* Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) in the bovine immune response against *Brucella*. Previous work in mice demonstrate that SOD is a good antigen to induce a T<sub>H</sub>1 immune response and therefore an important inducer of T cell mediated response against intracellular pathogens. If this characteristic of SOD demonstrated in the murine experimental model, can be also shown in bovines, it opens the possibility to improve the vaccination of this specie using the DNA or overexpression vaccine approach. In order to demonstrate this possibility, groups of five bovines were vaccinated with the comercial RB51 *Brucella* vaccine or with the recombinant strain that overexpress SOD. Immunized animals and its controls were bled and the peripheral lymphocytes studied. Then, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and T  $\gamma\delta$  subpopulation were determined, as well as the capacity of SOD to induce blast transformation and the type of cytokine synthesized.

The results demonstrate that neither, the comercial RB51 strain or the recombinant *Brucella* strain induced a significative change in the T subpopulations studied. SOD was unable to induce blast transformation “*in vitro*” when lymphocytes were obtained from immunized animals and the protein under study did not induce INF- $\gamma$  mRNA as expected. By contrary, SOD was able to increase IL-4 after 24 hours of incubation of peripheral T lymphocytes.

We may conclude that SOD in bovines is not a good stimulant for cell mediated immunity at the contrary of previously demonstrated in mice.

## 2. INTRODUCCIÓN

*Brucella abortus* es una bacteria de forma cocobacilar, aeróbica, gram negativa, inmóvil, que se caracteriza por ser un parásito intracelular. Este patógeno es capaz de multiplicarse y sobrevivir en una variedad de células del huésped, en particular se puede alojar en las células fagocíticas o macrófagos que no están activadas. Esta bacteria es causante de la Brucelosis, que es una enfermedad infectocontagiosa, zoonótica, descrita originalmente por Bruce en la isla de Malta (citado por Davis *et al*, 1967) y que posteriormente se comprobó que era causante del aborto bovino.

En el género *Brucellae* se pueden distinguir varias especies, cada una con un huésped que ataca de preferencia: así tenemos *B. ovis* que ataca a los ovinos, *B. melitensis* cuyo huésped natural son los caprinos, *B. abortus* cuyo gran reservorio son los bovinos, *B. suis* que ataca al cerdo y *B. canis* que ataca preferentemente a la especie canina. De estas especies, las que constituyen un problema pecuario y económico importante para el hombre son *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*. En los países de la cuenca del Mediterráneo, *B. melitensis*, constituye el mayor problema zoonótico. En nuestra región, *B. abortus* es la especie que constituye el mayor problema de pecuario y causa las mayores pérdidas económicas en la ganadería y sus productos.

Los constituyentes antigénicos capaces de inducir una importante respuesta inmune contra *B. abortus* están compuestos principalmente por lipopolisacáridos (LPS) y proteínas (Hindsill y Berman, 1967). El LPS es un componente bacteriano, que en el caso de *Brucella*, como en todas las bacterias que lo portan, es un importante activador de la respuesta inmune humoral, esta molécula de LPS está conformada por determinantes antigénicos extraordinariamente inmunodominantes, y adicionalmente tiene propiedades mitogénicas policlonales para células B (Verstrete *et al*, 1982). Esta respuesta inmune humoral, se considera que no protege contra la enfermedad, pero es de gran

utilidad en el diagnóstico, ya que todas las pruebas serológicas hasta ahora implementadas están basadas en la determinación de anticuerpos anti cadena “O” del LPS. Por otro lado, las proteínas aportan los antígenos capaces de estimular la respuesta inmune celular basada en la activación de los linfocitos T, que juegan un rol determinante en la defensa del huésped frente a este microorganismo intracelular (Douglas *et al*, 1984).

Con el fin de prevenir esta enfermedad en la especie bovina, se utilizó en Chile hasta el año 1997 la vacuna viva basada en *B. abortus* cepa 19 que se caracteriza por ser una cepa lisa, atenuada, con poder de protección relativo. La capacidad protectora de esta cepa vaccinal depende de la prevalencia de la enfermedad en el lugar en que se utilice. La principal desventaja de este inmunógeno es la respuesta serológica contra la cadena “O” del LPS, la cual no es posible diferenciar de la producida por la enfermedad con las técnicas diagnósticas de rutina (Alton, 1978). El problema de diferenciación entre la respuesta vaccinal y la respuesta a la infección, ha constituido un limitante serio para la erradicación de la enfermedad. Por esta razón, desde junio de 1997, se utiliza en Chile como vacuna oficial la *Brucella abortus* cepa RB51, que en el cultivo crece como colonias rugosas y que es la resultante de una mutante a partir de un subcultivo con rifampicina de *B. abortus* cepa 2308 (Schurig *et al*, 1995). Esta bacteria se caracteriza por producir todos los antígenos de una cepa virulenta menos la cadena “O”. En cuanto a la efectividad de esta vacuna, en trabajos realizados en varios países, se ha estimado que la protección sería similar o mejor a la obtenida por la cepa 19. La gran ventaja de la cepa RB51 es la total ausencia de seroconversión en los animales vacunados, ya que no induce la producción de anticuerpos involucrados en el diagnóstico, y por lo tanto no interfiere con este (Schurig *et al*, 1995).

Por otro lado, como ya hemos dicho, la respuesta inmune celular es la responsable de la defensa. En general, la respuesta inmune celular depende de los linfocitos T como elementos

efectores, modulada a su vez por linfocitos T reguladores con funciones “helper” y de supresión. Estas células T se dividen en dos subpoblaciones, así tenemos los linfocitos T  $CD4^+$  que como elementos efectores participan en la hipersensibilidad de tipo retardada y como células reguladoras dan señales positivas a otras células involucradas en la respuesta inmune, por lo que se han designado linfocitos T “helper” (LTH). Por otro lado, tenemos las células T  $CD8^+$ , que como efectores son linfocitos encargados de lisar a las células que exponen en su membrana antígenos extraños, denominándose por esto linfocitos T citotóxicos (LTC), o también pueden actuar como elementos reguladores dando señales negativas para otras células linfoides, recibiendo por esto el nombre de linfocitos T supresores.

Hace aproximadamente unos 20 años, los linfocitos T “helper” fueron divididos en dos subpoblaciones distintas: las células  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$ . Esta división se debe a que estos dos subgrupos celulares producen citoquinas distintas (Mosmann *et al*, 1986; Powrie y Mazon, 1988; Bottomly, 1988; Coffman *et al*, 1988; Romagnani, 1991). Las células  $T_{H1}$  cuando son estimuladas, generan principalmente Interferón gamma ( $INF-\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2), y factor de necrosis tumoral (TNF)-  $\beta$ , mientras que las células  $T_{H2}$  secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Dado el efecto estimulante específico de cada una de estas citoquinas, las células  $T_{H1}$ , mediante las citoquinas del tipo  $T_{H1}$  son las encargadas de ayudar en la respuesta inmune celular. De estos factores,  $INF-\gamma$  es especialmente efectivo en la activación de macrófagos, paso esencial en la inducción de sistemas efectores en este tipo de respuesta (Flesch y Kaufmann, 1989). Por otro lado, las células  $T_{H2}$  median la actividad “helper” para la inmunidad humoral, promoviendo la proliferación de células B y la diferenciación de estas en células secretoras de anticuerpos (Abbas, 1988; Whalen *et al*, 1988).

Como se dijo anteriormente, para la activación del sistema macrofágico destinado a eliminar a la bacterias intracelulares alojadas en su citoplasma, la más importante de las citoquinas  $T_H1$  es sin duda  $IFN-\gamma$ , que es producido por células natural killer (NK) y células T tanto  $\alpha-\beta$  como  $\gamma-\delta$ . Su función es por un lado activar al sistema macrofágico y por otro, inducir la polarización de la respuesta inmune celular (Fernández-Botran *et al*, 1988). Por el contrario, de las citoquinas  $T_H2$ , la más relevante es  $IL-4$ , que es producida por las mismas poblaciones celulares antes mencionadas, pero bajo un grupo de estímulos distintos (Seder *et al*, 1992). De la literatura queda claro que la polarización de la respuesta inmune hacia el lado celular o humoral, depende de cual de estas citoquinas se produce primero y en mayor cantidad. Una vez instaurada la respuesta inmune, tanto  $IFN-\gamma$  como  $IL-4$  continúan siendo producidas por células “helper”  $T_H1$  y  $T_H2$  respectivamente pero antes de esto, al inicio de la respuesta tal como lo hemos dicho, estas citoquinas son producidas por células NK y por células T  $\gamma-\delta$ .

La “polarización de la respuesta inmune” hacia el lado celular o humoral depende de múltiples factores como por ejemplo calidad y cantidad del antígeno y back-ground genético del individuo respondedor (Reiner y Locksley, 1995), elementos que a su vez influyen en el procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T. Por otro lado, la célula presentadora de antígeno (APC) juega un rol determinante en la calidad de la respuesta inmune que se va a generar, actuando por medio de las citoquinas que produce y moléculas de adhesión que expresa.

Infecciones experimentales en ratones han demostrado que para *Brucella abortus*, la respuesta inmune protectora está basada en gran medida en la inmunidad celular (Pavlov *et al*, 1982; Cheers y Ho, 1983; Araya *et al*, 1989; Araya *et al*, 1990), lo que hace presumible que la subpoblación de células “helper”  $T_H1$  esté jugando un rol preponderante en la inducción de inmunidad protectora (Mosmann *et al*, 1986). En el caso de *Brucella abortus* se sabe que al igual

que para otros parásitos bacterianos intracelulares, la activación macrofágica, mediada por INF- $\gamma$ , un producto característico de la células T<sub>H1</sub>, juega un rol importante en el aumento de la capacidad de las células del sistema retículo endotelial para destruir esta bacteria (Jones y Winter, 1992; Stevens *et al*, 1992; Zhan y Cheers, 1992; Jiang y Balwin, 1993).

En cuanto a el o los antígenos que pueden inducir protección, las proteínas parecen ser los componentes de *Brucella* responsables de la inducción de inmunidad celular (Douglas *et al*, 1984), motivo por el cual los antígenos proteicos de esta bacteria han recibido gran atención por parte de los investigadores empeñados en el desarrollo de nuevos, mejores y más eficientes inmunógenos para vacunación (Verstrete *et al*, 1982; Winter *et al*, 1983; Santos *et al*, 1984; Brooks-Alder y Splitter, 1988). Otros autores han demostrado que proteínas totales de *Brucella*, cuando son enfrentados “*in vitro*” con linfocitos de animales sensibilizados, son capaces de inducir linfoproliferación (Tabatabai *et al*, 1989., Smith *et al*, 1990., Dzata *et al*, 1991., Brooks-Worrel y Splitter, 1992a). Investigaciones en esta misma línea, han probado que diferentes fracciones proteicas, obtenidas a partir de un extracto crudo total de la bacteria, inducen en linfocitos provenientes de animales inmunizados, diferentes niveles de INF- $\gamma$  e IL-2. Estos niveles se correlacionan positivamente con los índices de linfoproliferación, indicando que los distintos componentes de *Brucella*, poseen diferentes capacidades para inducir perfiles de linfoquinas distintos (Zhan *et al*, 1993a; Zhan *et al*, 1993b). Con respecto a este punto, en nuestro laboratorio se han efectuado estudios sobre activación de células T en ratones, usando como antígeno la proteína de 14.5 Kd Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn SOD), observándose que induce una muy buena respuesta inmune celular, ya que se demostró que la activación linfocitaria mediante este antígeno, produce grandes cantidades de INF- $\gamma$  e IL-2 y una producción casi nula de IL-4 (Oñate *et al*, 2003). Estos resultados permitieron hacerse la pregunta si SOD de *Brucella* expresada en *E. coli* podía

proteger ratones frente al desafío con cepa patógena. Los resultados de estos experimentos fueron positivos ya que ratones vacunados con *E.coli* modificadas con el gen para SOD protegieron contra el desafío con la cepa patógena, en cambio los animales controles inyectados con *E. coli* sin el inserto resultaron tan vulnerables como los controles inyectados con PBS. Posteriormente, mediante un esquema de desafío similar al descrito para la *E. coli* recombinante, se probó en ratones la capacidad inmunogénica de una vacuna de DNA que lleva inserto el gen que codifica para SOD de *Brucella*, este tipo de vacuna también fue capaz de dar protección efectiva (Oñate *et al*, 2003). Estos resultados abrieron la posibilidad de mejorar la vacuna existente *B. abortus* RB51, haciendo que esta cepa sobreexpresara la proteína SOD. Efectuados los ensayos con esta nueva cepa RB51 recombinante se pudo constatar que en ratones era más eficiente para generar una respuesta inmune defensiva que la cepa vaccinal comercial (Vemulapalli *et al*, 2002). Otros autores han reportado que células linfoides de animales vacunados con *B. abortus* cepa 19, son capaces de proliferar cuando se incuban “*in vitro*” con Cu/Zn SOD (Cheville *et al*, 1993; Stevens *et al*, 1994). Por lo tanto, esta proteína parece estar dentro del grupo de proteínas que se han descrito como mayores inductores de proliferación (Brooks-Worrell y Splitter, 1992b)

Estos hallazgos han permitido elaborar nuestra hipótesis de trabajo, proponiendo estudiar y caracterizar la respuesta inmune de la especie bovina frente a Cu/Zn SOD de *Brucella abortus*.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La SOD de *Brucella abortus*, es en el bovino, al igual que en la especie murina, un buen inductor de la respuesta inmune del tipo T<sub>H</sub>1 o celular, a cargo de los linfocitos T.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si SOD es un buen inmunógeno para inducir respuesta inmune celular y si la sobreexpresión de SOD en la cepa vaccinal, induce un aumento de las células del tipo T<sub>H</sub>1 en bovinos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Vacunar bovinos con PBS como control, con la vacuna *B. abortus* RB51 comercial y con la cepa *B. abortus* RB51 que sobreexpresa la proteína SOD, llamada *B. abortus* RB51SOD.
- Determinar si la vacunación con *B. abortus* RB51 o RB51SOD induce cambios en las subpoblaciones celulares T de la especie bovina.
- Examinar si linfocitos provenientes de animales vacunados con la cepa RB51 o la cepa RB51SOD son capaces de proliferar al ser enfrentados “*in vitro*” con la proteína SOD recombinante.

- Estudiar las citoquinas del tipo  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$  de mayor relevancia, que producen las células de animales vacunados con *B. abortus* RB51 cuando son enfrentados “*in vitro*” con la bacteria entera o con la proteína SOD recombinante.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales

Para el estudio de subpoblaciones linfocitarias por medio de la técnica inmunocitoquímica y para los ensayos de transformación blástica, se utilizaron como animales experimentales 15 bovinos hembras mestizas, cuya edad era aproximadamente 8 meses, provenientes de un predio libre de brucelosis de la provincia de Osorno.

Para el estudio de identificación de citoquinas por medio de la técnica de hibridación “*in situ*”, se utilizaron como animales experimentales 5 bovinos hembras mestizas, cuya edad era de aproximadamente 8 meses, provenientes de un predio libre de brucelosis de la provincia de Valdivia.

#### 3.2 Cepas bacterianas y antígenos de *Brucella* usados

Las cepas bacterianas utilizadas para inmunizar a los bovinos fueron *B. abortus* RB51 comercial (Professional Biological Company, Denver, CO, USA), y la variante recombinante de esta cepa que sobreexpresa SOD, *B. abortus* RB51SOD, la cual fue donada por el doctor Gerhardt Schurig del College of Veterinary Medicine, Virginia Tech., USA. Como antígeno para las pruebas “*in vitro*” se utilizó la cepa RB51 comercial de *B. abortus* muerta por calor y la proteína Cu/Zn SOD recombinante pura obtenida en el laboratorio del doctor Ángel Oñate de la Universidad de Concepción.

### 3.3 Obtención de linfocitos

La obtención de linfocitos se realizó a partir de 20 ml de sangre total obtenida de cada bovino inmunizado con *B. abortus* cepa RB51, *B. abortus* RB51SOD y de los controles inyectados con PBS.

La sangre obtenida con heparina como anticoagulante se distribuyó en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugó a 670 g por 30 minutos. Luego se tomó la porción rica en leucocitos o “*buffy coat*”, y se traspasó a otro tubo en donde se diluyó con PBS, en una proporción de 1:8 aproximadamente. Esta dilución se colocó en un gradiente de 4 ml de Histopaque (SIGMA<sup>®</sup>, USA) de densidad 1.077 g/cm<sup>3</sup>. Los tubos así preparados se centrifugaron a 670 g por 20 minutos, luego se aislaron los linfocitos y se lavaron dos veces con 8 ml de PBS a 376 g por 7 minutos ajustando posteriormente la concentración celular a lo requerido en cada experimento.

### 3.4 Efecto de la vacunación en bovinos inmunizados con *B. abortus* RB51 y RB51SOD en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T

Con el fin de identificar y cuantificar subpoblaciones de linfocitos T, se utilizaron 15 bovinos, de los cuales 5 fueron inyectados con PBS como control negativo, 5 con  $2 \times 10^{10}$  células bacterianas de la cepa vaccinal comercial de *B. abortus* RB51 y 5 con igual cantidad de células de *B. abortus* RB51SOD. A los 15, 30 y 45 días después de haber sido vacunados, los animales se sangraron, luego se separaron los linfocitos y se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml, y 10  $\mu$ l de estas suspensiones celulares se colocaron sobre portaobjetos previamente xilanizados, dejándolas secar a temperatura ambiente. La determinación de las distintas subpoblaciones de linfocitos, se realizó mediante la técnica inmunohistoquímica. Con este objetivo las muestras de linfocitos fueron incubadas con un primer anticuerpo preparado en ratón,

específico para la subpoblación que se quiere detectar en una dilución de 1:100, por una hora a 37°C, luego se procedió a lavar 3 veces con PBS mantenido a temperatura ambiente. A continuación se incubó la preparación con un segundo anticuerpo anti inmunoglobulina de ratón biotilado (DAKO LSAB<sup>®</sup> 2 System, peroxidase, USA) por 10 minutos a temperatura ambiente. Terminada esta reacción las preparaciones fueron lavadas con PBS y luego se agregó el complejo estreptoavidina-peroxidasa (DAKO LSAB<sup>®</sup>2 System, Peroxidase) por 10 minutos a temperatura ambiente. Concluido esto, se procedió a revelar con AEC (DAKO<sup>®</sup>) por 5 minutos y posteriormente las muestras se montaron usando un medio acuoso (Faramount, DAKO). Como control negativo se realizó la misma reacción pero sin primer anticuerpo.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- a) Anti-CD3 de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc)

Línea celular: MM1A

Especificidad: CD3

Isotipo: IgG<sub>1</sub>

- b) Anti-CD4 de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc)

Línea celular: IL-A11

Especificidad: CD4

Isotipo: IgG<sub>2a</sub>

- c) Anti- CD8 de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc)

Línea celular: BAT82A

Especificidad: CD8 beta

Isotipo: IgG<sub>1</sub>

d) Anti- $\gamma\delta$  de bovino, anticuerpo monoclonal producido en ratón (VMRD, Inc)

Línea celular: CACT63A

Especificidad: A2/ reactividad predominante con células T  $\gamma\delta$

Isotipo: IgG<sub>1</sub>

### 3.4.1 Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias

El recuento de cada una de las subpoblaciones linfocitarias se realizó por separado en un microscopio óptico, con un aumento de 100X y con aceite de inmersión, utilizando un contador manual. En cada preparación se eligieron al azar aproximadamente 20 campos visuales. En cada uno de ellos se anotó el número total de células presentes y el número de células marcadas que corresponde a la subpoblación en estudio, obteniendo por un lado la suma total de células presentes y por otro, la suma total de células marcadas. En cada determinación se cuantificó un promedio de 500 células. Con los datos antes obtenidos se procedió a calcular por simple regla de tres el porcentaje de células marcadas correspondientes a la subpoblación en estudio.

### 3.5 Ensayo de proliferación de linfocitos “*in vitro*”

Para el ensayo de linfoproliferación, los linfocitos luego de ser aislados fueron ajustados a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml y se resuspendieron en 4 ml de RPMI 1640 o medio de cultivo completo (Sigma), el cual contenía anfotericina B 4 ug/ml, piruvato de sodio  $1 \times 10^{-3}$  M, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 120 ug/ml y 10% de SBF. Alícuotas de 100  $\mu$ l de esta suspensión fueron distribuidos en placas de 96 pocillos (Nunclon, Denmark), posteriormente cada pocillo recibió 100  $\mu$ l de medio de cultivo con antígeno, o sin antígeno como control negativo. Como antígenos se usaron *B. abortus* cepa RB51 muerta por calor a una concentración

de  $1 \times 10^8$  bacterias/ml y la proteína SOD a una concentración de  $0.8 \mu\text{g/ml}$ . El cultivo celular fue mantenido por 48 horas en atmósfera húmeda a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ , al término del cual las células en cada pocillo fueron pulsadas con  $0.5 \mu\text{Ci}$  de timidina tritiada ( $\text{H}^3\text{-Thy}$ ) (Amersham, Biosciences, USA) y cosechadas 24 horas después mediante un cosechador automático (Multimash 2000 Dynatech, USA), que después de sucesivos lavados con agua destilada, las dispuso automáticamente sobre filtros de fibra de vidrio, los cuales se dejaron secar a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos y la radioactividad incorporada al DNA fue medida en cada uno de los filtros en un contador de centelleo, colocando cada disco con el cultivo radioactivo en viales con solución de centelleo.

La incorporación de timidina tritiada fue expresada en cpm, con las cuales se obtuvo el “Índice de Estimulación” (IE), que es la razón entre la timidina incorporada expresada en cpm del cultivo estimulado por el antígeno y dividido por las cpm del cultivo sin estimular. Los resultados se expresaron como la media del IE obtenida para cada grupo experimental a los diferentes tiempos post vacunación. Los resultados de cada uno de los animales en estudio se obtuvieron del promedio de tres cultivos hechos bajo las mismas condiciones (Método descrito por Harris y col., 1989).

### **3.6 Identificación de citoquinas producidas por células linfoides aisladas de bovinos inmunizados y estimulados “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 y la proteína Cu/Zn SOD recombinante.**

Con el objetivo de cuantificar las células circulantes del bovino, que en determinado momento son capaces de producir citoquinas representativas de las poblaciones T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>, en otras palabras INF- $\gamma$ , IL-2 (T<sub>H1</sub>) e IL-4 (T<sub>H2</sub>) se montó la técnica hibridación “*in situ*”(HIS) para mRNA. Para esto, todo el material utilizado fue tratado y procesado en condiciones totalmente estériles, y todas las soluciones tampón destinadas a este procedimiento fueron preparadas con agua tratada con DEPC (SIGMA-ALDRICH, USA)

#### **3.6.1 Sondas utilizadas**

En los experimentos de hibridación “*in situ*” se utilizaron sondas biotiniladas específicas para INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 (Invitrogen<sup>™</sup>, USA), y ajustadas a una concentración de 40  $\mu$ M para los tres casos.

Las secuencias nucleotídicas de cada sonda utilizada son las siguientes:

- INF- $\gamma$  : Biotina- AAG TCT CGG TTT AAC AGA GGA AGA T
- IL-2 : Biotina- ACT TCT TTC ATT GTG TTC CCC GTA GAG C
- IL-4 : Biotina- AGC TGG TAG GTG AGA CCC ATT AAT AG

#### **3.6.2 Controles utilizados**

Como control negativo se incubó con la solución de hibridación sin sonda. Y como control positivo se utilizó un oligo-dT (Invitrogen<sup>™</sup>, USA), el cual fue aplicado en una dilución de 1:50 con la solución de hibridación.



### 3.6.3 Preparación de las muestras

Luego de ser aislados los linfocitos, estos se contaron y se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml en RPMI completo, a continuación las suspensiones celulares fueron distribuidas en duplicado en placas de 24 pocillos (Nunclon, Denmark), colocando 500  $\mu$ l de suspensión celular y 500  $\mu$ l de antígeno, ajustados a su concentración con RPMI completo, por cultivo. Como antígenos se usaron *B. abortus* cepa RB51 muerta por calor a una concentración de  $1 \times 10^8$  bacterias/ml, la proteína SOD a una concentración de 0.8  $\mu$ g/ml y como control negativo se realizó un cultivo solo con medio de cultivo completo. El cultivo celular fue mantenido por 24 horas en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo de incubación, cada uno de los cultivos antes mencionados se centrifugaron a 376 g por 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y del pellet celular se tomaron 10  $\mu$ l, los cuales se dispusieron sobre portaobjetos de vidrio (B&C Germany) previamente xilanizados, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### 3.6.4 Protocolo de Hibridación “*in situ*”

Una vez secas las células, se fijaron en PFA 4% por 20 minutos a 4°C y luego se lavaron tres veces por 5 minutos con PBS 1X frío. A continuación las células se trataron con Proteinasa K (Fermentas) a una concentración de 0.1  $\mu$ g/ml por 10 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego, para bloquear la fosfatasa alcalina endógena se trató con Levamisol (Sigma) 5mM por 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS y la biotina endógena se bloqueó usando el kit comercial Endogenous Avidin/Biotin Bloking Kit (Zymed<sup>®</sup>, USA). Después de la etapa de bloqueo, las células se incubaron por 1 hora a 37°C en cámara húmeda con solución de prehibridación la que contiene buffer SSC 5X, solución de Denhardt 5X, SDS 10 g/L, DNA fragmentado y desnaturalizado de espermio de salmón 0,1 mg/ml (Winkler, USA.).

A continuación se realizó la etapa de hibridación, en donde las muestras se incubaron con las sondas por toda la noche a 37°C en cámara húmeda. Cuando la etapa de hibridación finalizó se procedió a lavar rigurosamente con 4X SSC (SIGMA)/30% formamida (Winkler) a 37°C dos veces por 5 minutos, 2X SSC/30% formamida a 37°C dos veces por 5 minutos y 0.2 SSC/30% formamida a 37°C dos veces por 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas por 15 minutos a temperatura ambiente con TBS (0.05 M Tris-HCl (pH 7.6), 0.15 M NaCl), para luego proceder a agregar el complejo estreptoavidina-fosfatasa alcalina (estreptoavidina-AP) (ZYMED<sup>®</sup>), por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se realizó un lavado con TBS por 10 minutos a 37°C, y dos lavados más con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.

Por último, el revelado de la reacción se realizó incubando las muestras por 2 horas a temperatura ambiente con el sustrato BCIP/NBT (VECTOR, USA). Luego las muestras se montaron en un medio acuoso, y el grado de reacción de las células fue cuantificada a partir de fotografías tomadas bajo el microscopio con un aumento de 40X, usando el programa computacional UN- SCAN- IT versión 4.1 a través del cual se obtuvo un valor promedio representativo de la tinción expresado en píxeles. En cada caso se analizó un total de 50 células para cada grupo elegidas al azar.

### **3.7 Análisis estadístico**

La significancia estadística de los porcentajes de las diferentes poblaciones linfocitarias fue evaluada usando la prueba t-student pareada de dos colas para comparar dos muestras, y se consideró significancia estadística cuando  $p < 0,05$ . Los resultados de linfoproliferación y cuantificación de citoquinas son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (número de células). Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism<sup>®</sup>.

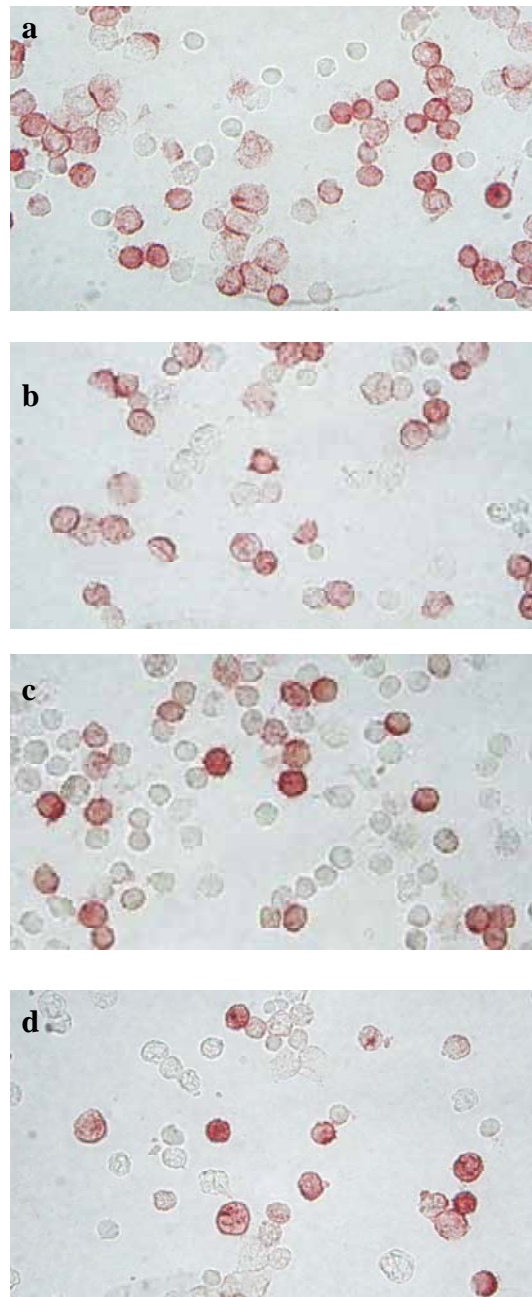
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efecto de la vacunación en las subpoblaciones T de linfocitos bovinos

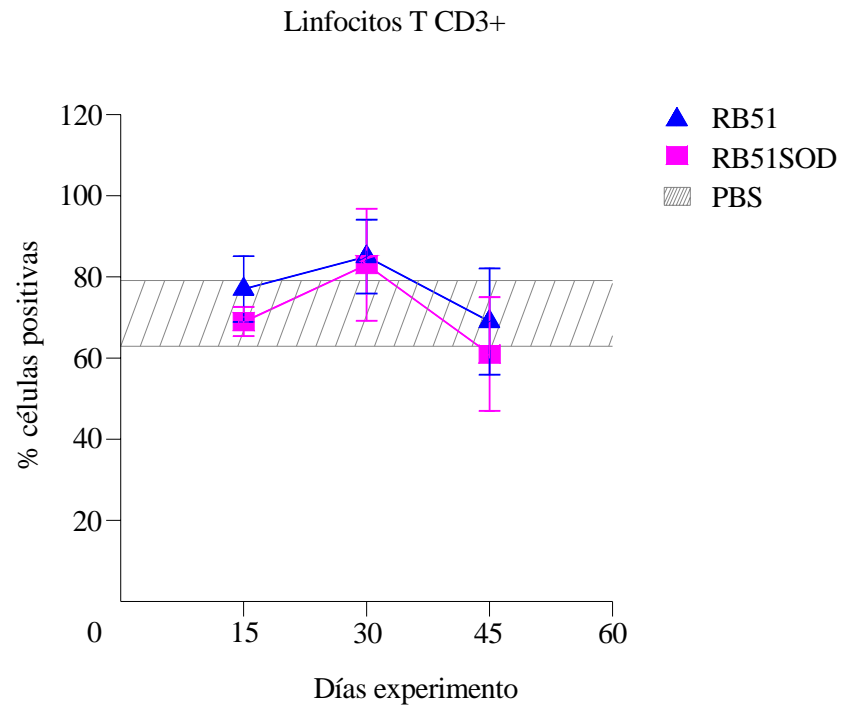
Con el fin de determinar si la vacunación con *B. abortus* RB51, inducía algún cambio en las subpoblaciones celulares de los linfocitos T en los bovinos inmunizados, y si la sobreexpresión de la molécula SOD en la cepa de *B. abortus* RB51SOD hacía alguna diferencia a este respecto con la vacuna comercial actualmente en uso, grupos de 5 animales cada uno, se inocularon con PBS como control, la vacuna contra *B. abortus* RB51 comercial y *B. abortus* RB-51-SOD en una dosis de  $2 \times 10^{10}$  UFC vía subcutánea. Los animales se sangraron de la vena yugular a los 15, 30 y 45 días después de la vacunación, se separaron los linfocitos totales y se determinó por inmunocitoquímica los porcentajes correspondientes a las subpoblaciones de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células T  $\gamma\delta$ . Las células portadoras de cada una de las moléculas antigénicas se pueden distinguir y contar frente al microscopio óptico.

En la Figura 1 se muestran fotografías representativas de células teñidas con anticuerpos específicos para cada una de las poblaciones en estudio. En este caso la serie mostrada corresponde a la muestra de un animal previamente inmunizado con la vacuna *B. abortus* RB51. El aspecto microscópico de las células del resto de los animales estudiados fue similar al caso acá mostrado.

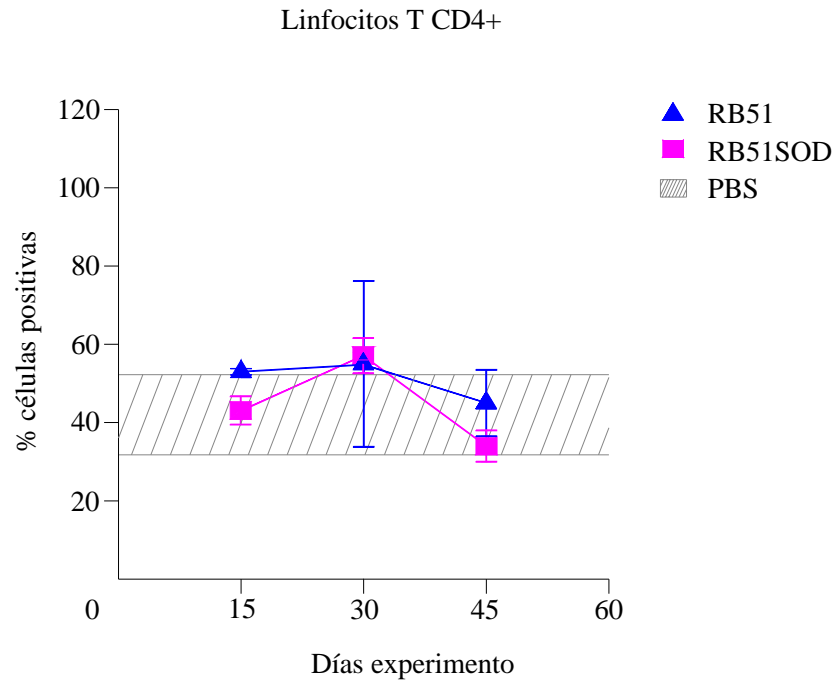
En cuanto a los porcentajes de las diferentes subpoblaciones T estudiadas, los resultados demuestran que la vacunación con *B. abortus* RB51 comercial y con la cepa RB51SOD no presentan diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes poblaciones linfocitarias, ya que no fueron alteradas durante el tiempo que duró el período de observación post- vaccinal (Fig 2, 3, 4 y 5).



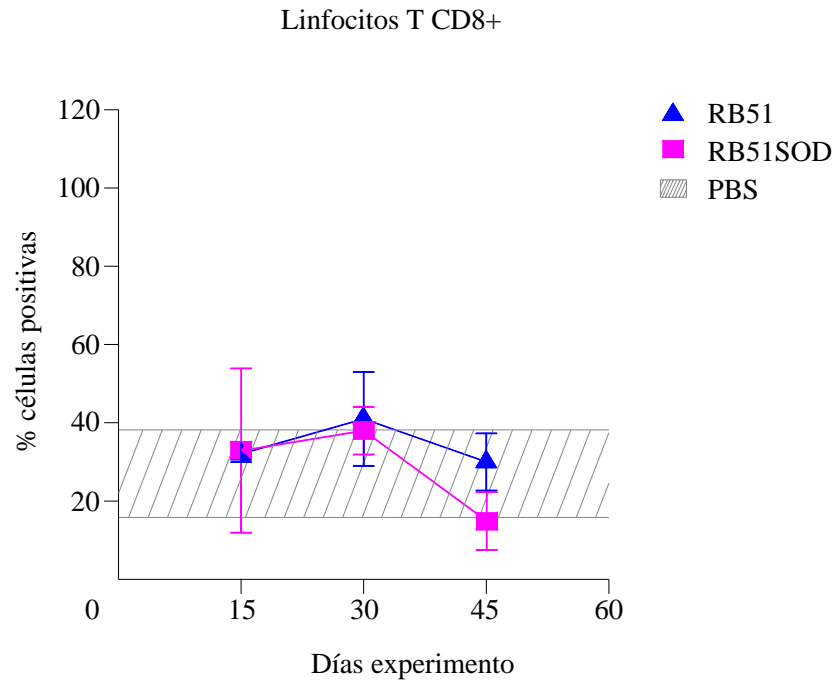
**Figura 1: Inmunocitoquímica de poblaciones celulares T.** Diferentes poblaciones celulares T, provenientes de animales sensibilizados 15 días después de ser vacunados con *Brucella abortus* RB51. a) células CD3<sup>+</sup> b) células CD4<sup>+</sup> c) células CD8<sup>+</sup> y d) células T  $\gamma\delta$ .



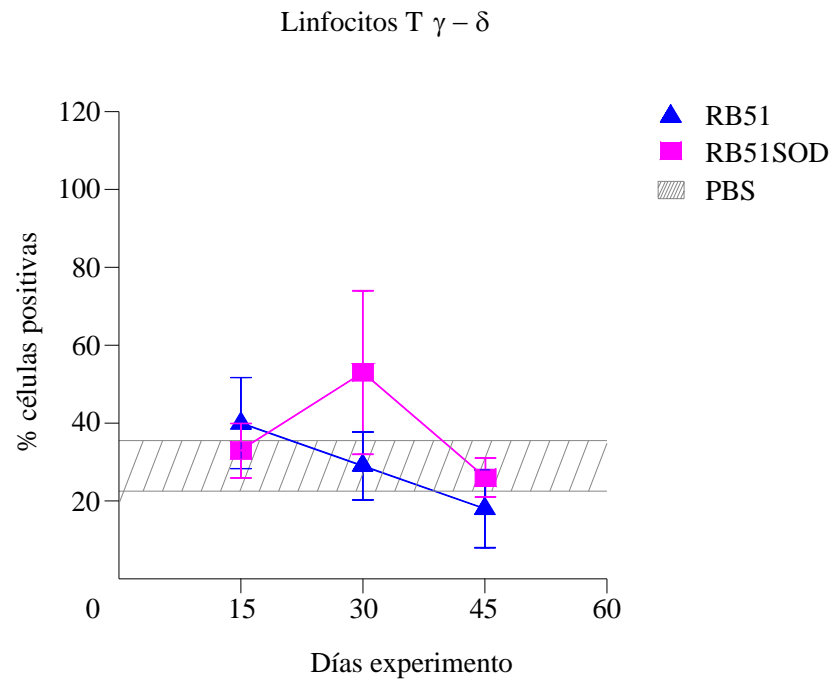
**Figura 2: Porcentaje promedio  $\pm$  D.E de células T CD3<sup>+</sup>.** Grupos de animales vacunados con *B. abortus* RB51 y RB51SOD a diferentes tiempos post vacunación comparado con el rango normal del grupo control inyectado con PBS.



**Figura 3: Porcentaje promedio  $\pm$  D.E de células T CD4<sup>+</sup>.** Grupos de animales vacunados con *B. abortus* RB51 y RB51SOD a diferentes tiempos post vacunación comparado con el rango normal del grupo control inyectado con PBS.



**Figura 4: Porcentaje promedio  $\pm$  D.E de células T CD8<sup>+</sup>.** Grupos de animales vacunados con *B. abortus* RB51 y RB51SOD a diferentes tiempos post vacunación comparado con el rango normal del grupo control inyectado con PBS.



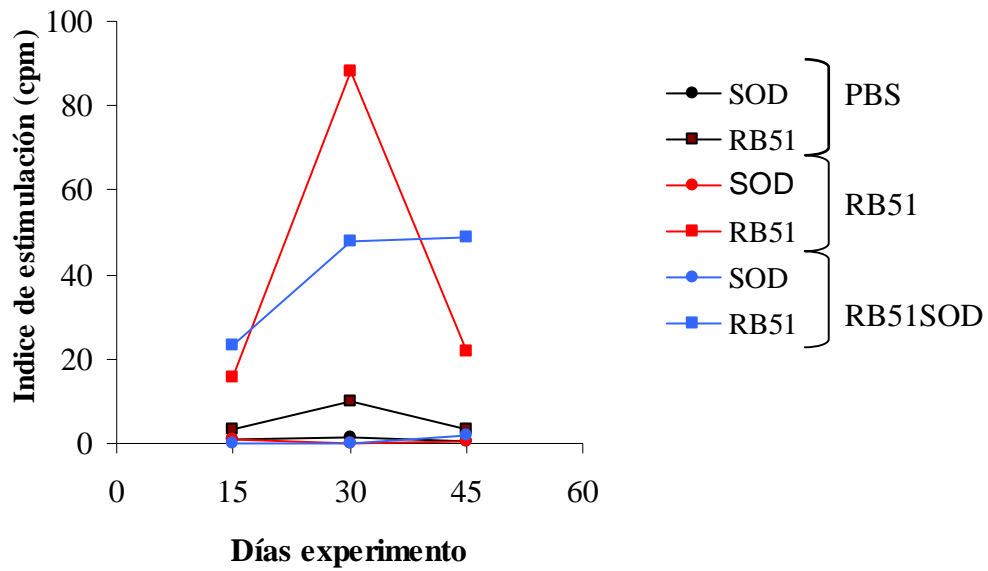
**Figura 5: Porcentaje promedio  $\pm$  D.E de células T  $\gamma - \delta$ .** Grupos de animales vacunados con *B. abortus* RB51 y RB51SOD a diferentes tiempos post vacunación comparado con el rango normal del grupo control inyectado con PBS.



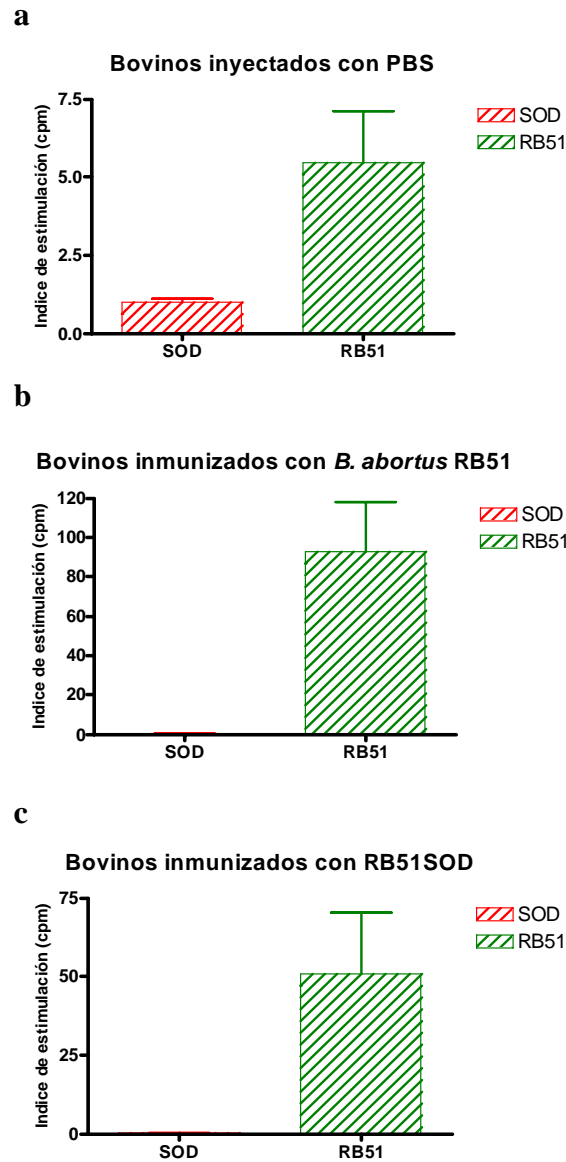
#### **4.2 Capacidad inmunogénica de la vacuna *B. abortus* RB51 para inducir una respuesta blastogénica en linfocitos periféricos de bovinos cuando estos son estimulados “*in vitro*” con la bacteria entera o la proteína Cu/Zn SOD.**

La respuesta inmune celular de bovinos contra la vacuna *B. abortus* RB51 comercial, y la cepa recombinante *B. abortus* RB51SOD, se analizó mediante pruebas de transformación blástica “*in vitro*”. Para esto, se tomaron linfocitos periféricos purificados de animales inmunizados o sus controles inyectados con PBS y se cultivaron en presencia de  $1 \times 10^8$  células bacterianas/ml o 0,8 ug/ml de SOD recombinante pura. Como puede verse en la Figura 6 las células responden pobremente a la estimulación, en el cultivo con bacterias enteras, se observa en estas condiciones un cierto grado de incorporación de Timidina, lo que podría deberse a la capacidad de *Brucella* de estimular policlionalmente células T vírgenes, más interesante aún, en la misma figura puede observarse que los animales vacunados con *B. abortus* RB51 o RB51SOD responden muy bien “*in vitro*” a las bacterias muertas, sin embargo, los mismos linfocitos no muestran reactividad con el componente SOD de la bacteria, confundándose en el gráfico con la respuesta de los animales no inmunizados inyectados con PBS.

En la Figura 7, la baja o nula capacidad de responder a SOD demostrada anteriormente se analizó en mayor detalle para uno de los días del experimento. Se tomó el día 30 post inmunización por ser este el día de mayor respuesta. Puede observarse la respuesta “*in vitro*” al estímulo antigénico en cada uno de los grupos en estudio  $\pm$  la D.E. del grupo. Solo se observa una respuesta blastogénica evidente, en aquellas células linfoides provenientes de animales sensibilizados y enfrentados “*in vitro*” con bacterias muertas, en contraposición a una respuesta despreciable frente a la proteína SOD.



**Figura 6: Respuesta blastogénica luego de 15, 30 y 45 días post inmunización.** Linfocitos provenientes de bovinos inyectados con PBS como control, y de animales sensibilizados con *B. abortus* RB51 y *B. abortus* RB51SOD, enfrentados “*in vitro*” con la bacteria *B. abortus* RB51 muerta o la proteína Cu/Zn SOD recombinante. Cada punto representa el promedio obtenido para cada grupo experimental.



**Figura 7: Respuesta blastogénica 30 días post inmunización.** Cada uno de los grupos de animales fueron a) inyectados con PBS b) inmunizados con *B. abortus* RB51 y c) inmunizados con *B. abortus* RB51SOD. En cada caso los linfocitos de los animales de los diferentes grupos se incubaron “*in vitro*” con la bacteria *B. abortus* RB51 muerta por calor o con la proteína Cu/Zn SOD recombinante. Los valores representan la media del índice de estimulación obtenido en cada caso  $\pm$  D.E.

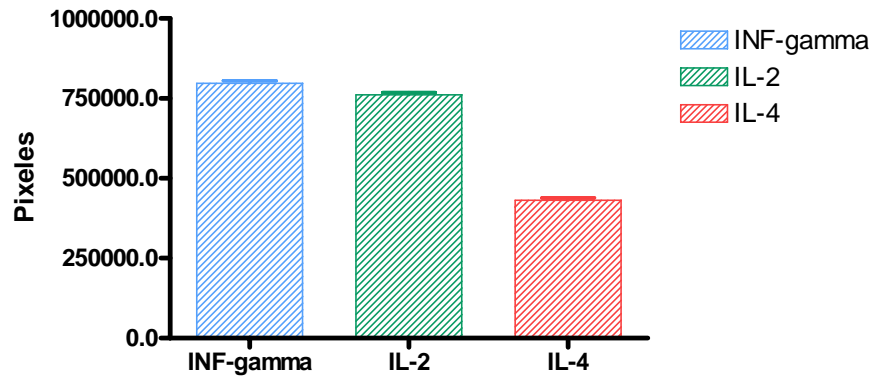
### **4.3 Expresión de mRNA específico para INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en linfocitos de bovinos vacunados con *B. abortus* RB51 comercial, e incubados “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 muerta por calor o Cu/Zn SOD recombinante, comparados con los cultivos sin estímulo antigénico**

Para esto, se realizaron ensayos de hibridación “*in situ*”, utilizando sondas específicas para el mRNA que codifica para las citoquinas INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4.

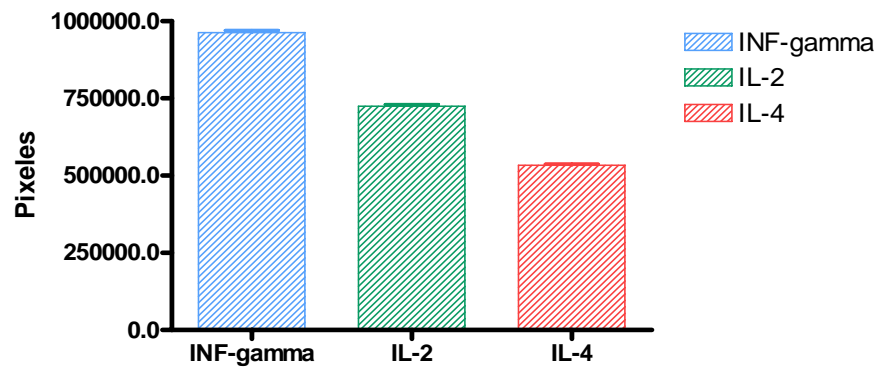
En la Figura 8 puede observarse la expresión del mRNA de INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 en linfocitos de animales vacunados con *B. abortus* RB51, pero que no recibieron estímulo antigénico “*in vitro*”, es decir, fueron cultivados solo con medio de cultivo completo, por lo tanto en este caso, la expresión del mRNA puede considerarse basal.

En el caso de las mismas células estimuladas “*in vitro*” en presencia de *B. abortus* RB51 muerta por calor, se observa en la Figura 9 que la expresión de INF- $\gamma$  aumenta, no así la expresión de IL-2 ni de IL-4.

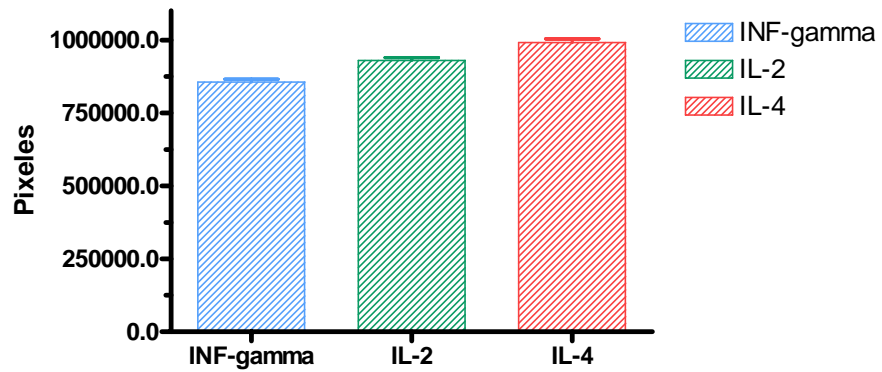
Por el contrario, en la Figura 10 se observa que los resultados obtenidos con las mismas células pero estimuladas “*in vitro*” con la proteína SOD, aumenta la síntesis del mRNA para IL-2 y se incrementa en forma notable la síntesis del mRNA para IL-4.



**Figura 8: Nivel de expresión de mRNA para INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 de linfocitos cultivados sin estímulo antigénico.** Los valores están representados en píxeles, arrojados por la intensidad de color proveniente de la hibridación “*in situ*” realizada a linfocitos cultivados por 24 horas sin estimulante.



**Figura 9:** Nivel de expresión de mRNA para INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 de linfocitos estimulados “*in vitro*” con RB51. Los valores están representados en píxeles, arrojados por la intensidad de color proveniente de la hibridación “*in situ*” realizada a linfocitos cultivados por 24 horas con *B. abortus* RB51.



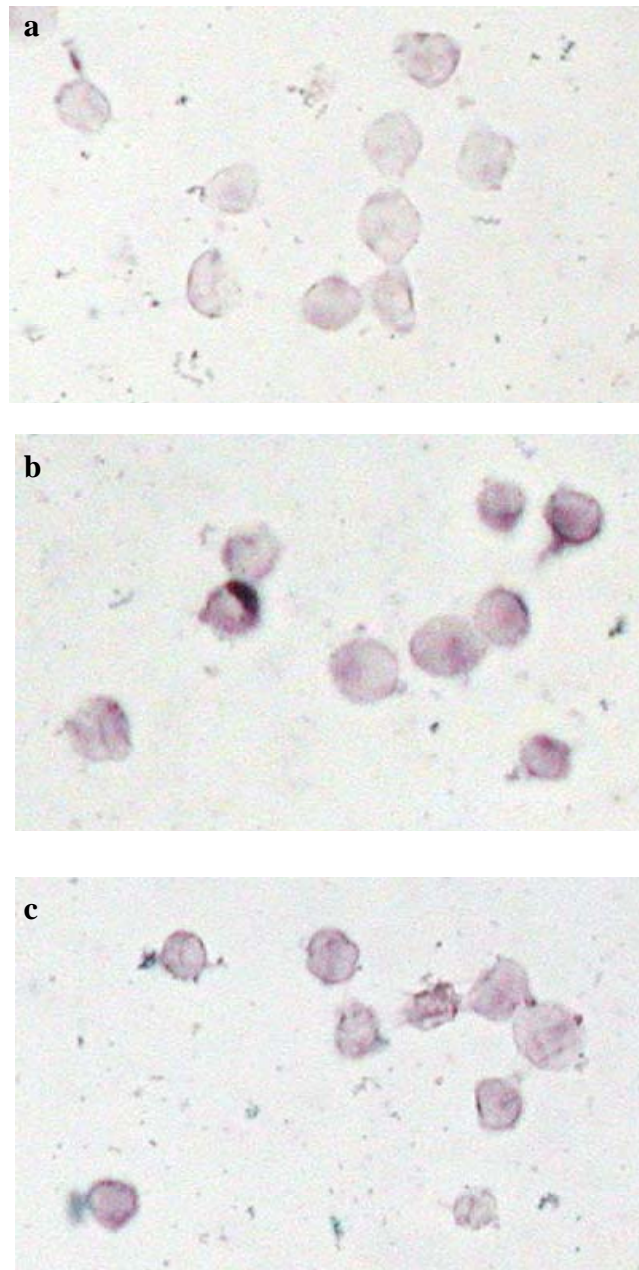
**Figura 10: Nivel de expresión de mRNA para INF- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 de linfocitos estimulados “*in vitro*” con la proteína SOD.** Los valores están representados en píxeles, arrojados por la intensidad de color proveniente de la hibridación “*in situ*” realizada a linfocitos cultivados por 24 horas con Cu/Zn SOD recombinante.

En las Figuras 11, 12 y 13 se muestran solo a modo ilustrativo fotografías representativas de las preparaciones obtenidas mediante hibridación “*in situ*”, en linfocitos de animales sensibilizados, y estimulados “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 entera muerta por calor, con la proteína SOD y sin estímulo antigénico.

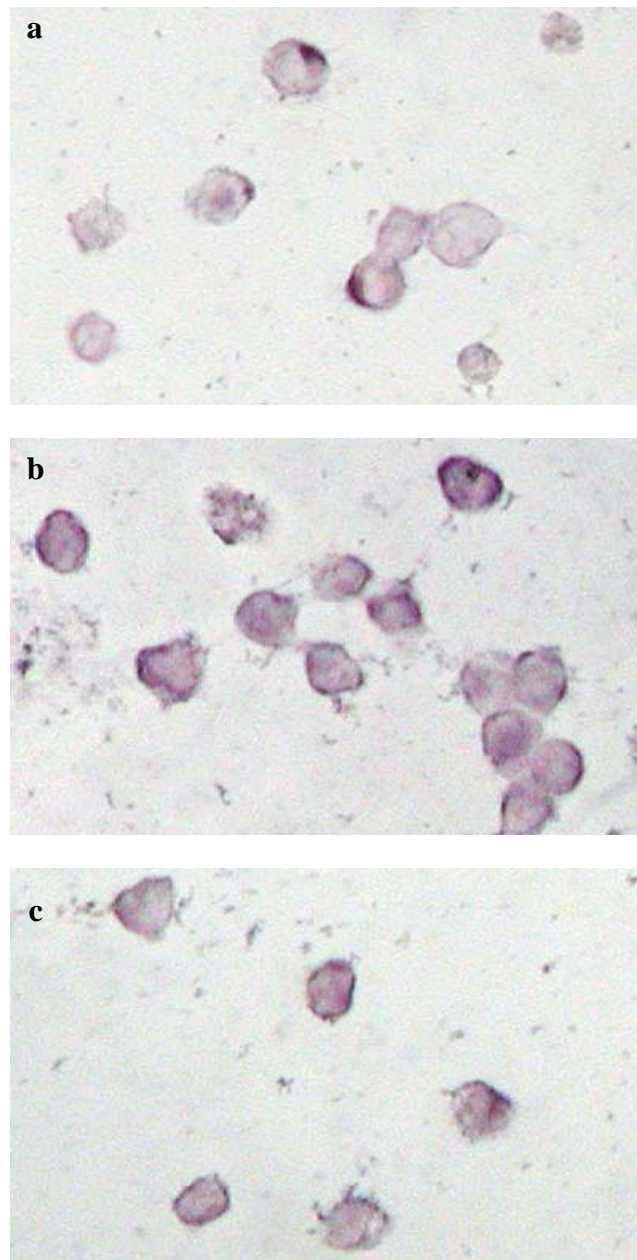
La Figura 11 muestra una hibridación “*in situ*” realizada con la sonda específica para INF- $\gamma$ , observándose que las células incubadas solo con medio de cultivo (Fig. 11a) dan una reacción positiva muy débil comparada con aquellas células estimuladas “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 (Fig. 11b) y SOD (Fig. 11c), las cuales dan una fuerte reacción positiva.

Algo similar se observa en las Figuras 12 y 13, las cuales corresponden a hibridaciones realizadas con sondas específicas para IL-2 e IL-4 respectivamente. En las Figuras 12a y 13a, correspondientes a células cultivadas solo con medio de cultivo completo, se observa una reacción positiva más débil comparada con aquellas células que fueron estimuladas “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 (Fig. 12b y 13b) y con SOD (Fig. 12c y 13c). Sin embargo, a simple vista no se observan mayores diferencias en cuanto a intensidad de la reacción entre los cultivos estimulados “*in vitro*” con los dos antígenos antes mencionados (*B. abortus* RB51 y SOD), ya sea para INF- $\gamma$ , IL-2 o IL-4.

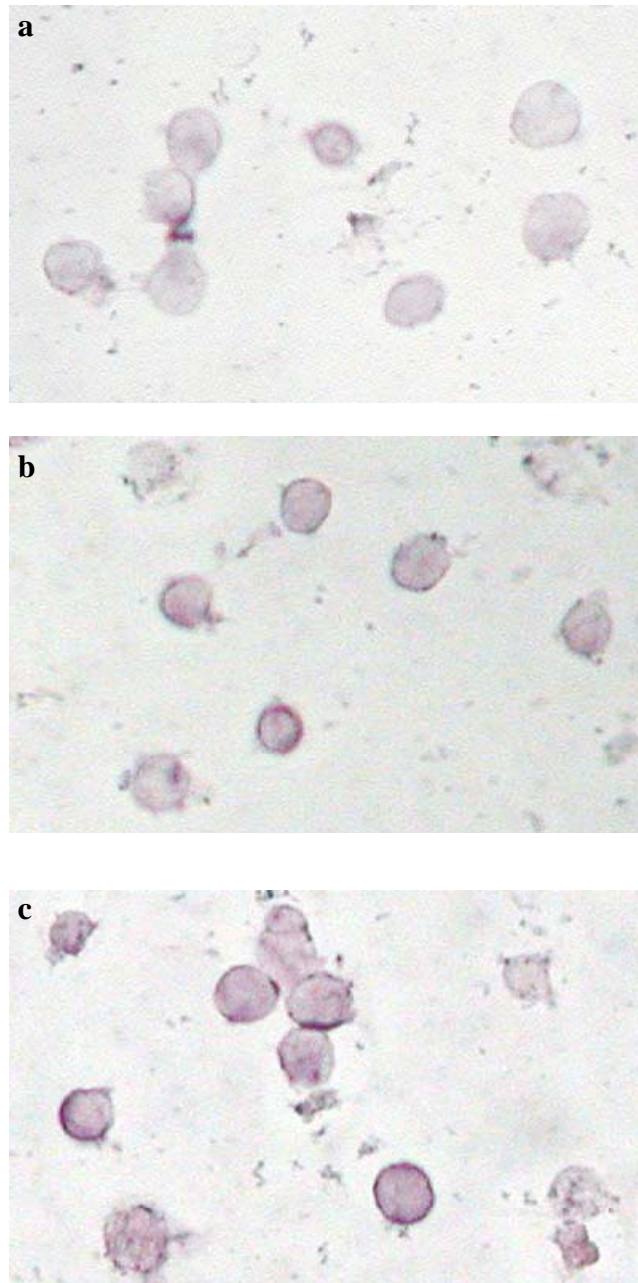




**Fig 11: Hibridación “*in situ*” para INF- $\gamma$ .** Linfocitos provenientes de bovinos vacunados con *B. abortus* RB51. a) Células cultivadas solo con RPMI b) Células estimuladas “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 c) Células estimuladas “*in vitro*” con Cu/Zn SOD.



**Fig 12: Hibridación “*in situ*” para IL-2.** Linfocitos provenientes de bovinos vacunados con *B. abortus* RB51. a) Células cultivadas solo con RPMI b) Células estimuladas “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 c) Células estimuladas “*in vitro*” con Cu/Zn SOD.



**Fig 13: Hibridación “*in situ*” para IL-4.** Linfocitos provenientes de bovinos vacunados con *B. abortus* RB51. a) Células cultivadas solo con RPMI b) Células estimuladas “*in vitro*” con *B. abortus* RB51 c) Células estimuladas “*in vitro*” con Cu/Zn SOD.

## 5. DISCUSIÓN

La vacunación con cepas vivas no patógenas, que compartan gran cantidad de antígenos con la cepa causante de la enfermedad, es la forma más eficiente que hasta ahora se conoce para inducir inmunidad protectora, ya que por lo general, además de la carga antigénica que lleva el inóculo, la bacteria o el virus inmunizante se puede reproducir un par de veces antes de ser eliminado. Además, estos microorganismos bacterianos poseen en su ADN secuencias ricas en CG no metiladas denominadas “oligonucleótidos con motivos CpG” que son reconocidos inmunoestimuladores que actúan a nivel de las células presentadoras (Krieg y col, 1995).

Con respecto a la vacuna para la Brucelosis, *B. abortus* RB51 es una cepa apatógena que es capaz de inducir una infección transitoria en ratones y bovinos que no va más allá de cuatro semanas, permitiendo que se genere la respuesta inmune. Con relación a este último aspecto, se sabe que la infección con microorganismos intracelulares como *Brucella* o *Mycobacterium* van acompañados de un alza importante de las poblaciones T  $\gamma$ - $\delta$ , las cuales poseen un efecto inmune protector frente a la infección (Kaufmann, 1993). En este trabajo esto no se pudo demostrar ya que bovinos vacunados no experimentaron aumento de esta subpoblación. Si se tiene en cuenta que las células T  $\gamma$ - $\delta$  representan para los rumiantes una importante barrera defensiva que está en la interfase entre la inmunidad innata y la inmunidad específica, los resultados encontrados en esta investigación parecerían indicar que las vacunas usadas no fueron capaces de activar este sistema de defensa que sí es estimulado frente a la invasión de cepas patógenas. En cuanto a las otras subpoblaciones estudiadas, es decir, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, se mantienen estables durante todo el período de observación después de la vacunación. Por otro lado, si se analizan los porcentajes relativos de las distintas subpoblaciones T en esta investigación, se encuentra con que estas

corresponden a las descritas por Moroni para el sector etareo analizado en el presente trabajo (Moroni, M. A. 2002).

Cuando se analizan los resultados de transformación blástica de linfocitos provenientes de animales vacunados con la cepa RB51 comercial, inducida por *Brucella* muerta o la proteína recombinante SOD, puede observarse que en todos los casos, la bacteria muerta induce una fuerte respuesta blastogénica. Llama la atención de que esto también ocurra, aunque en un grado muy inferior, en el grupo control inyectados con PBS, esto puede ser explicado por la presencia en la bacteria total, de componentes semejantes a los “superantígenos” capaces de estimular “*in vitro*” en forma policlonal a los linfocitos T, descritos para otras bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. A pesar de esto, puede observarse que los animales inmunizados responden en forma específica a este antígeno. Lo que llama más la atención en esta serie experimental, es que en las condiciones usadas no fue posible demostrar la capacidad estimuladora de Cu/Zn SOD de *Brucella* cuando ésta fue empleada para estimular el cultivo de linfocitos de animales inmunizados, o sus controles inyectados con PBS. Este resultado indica que a diferencia de lo demostrado en la especie murina, en el bovino la proteína SOD de *Brucella* no actúa como un antígeno capaz de estimular la respuesta inmune celular. La ausencia de transformación blástica concuerda con los resultados obtenidos en animales inmunizados con la cepa RB51 comercial, cuyos linfocitos fueron cultivados “*in vitro*” con *Brucella* muerta, SOD o solo con RPMI , y luego analizados por medio de la técnica hibridación “*in situ*” para IL-2 e INF- $\gamma$  (citoquinas T<sub>H1</sub>) y para IL-4 (la más importante citoquina T<sub>H2</sub>). Se advierte que SOD, al contrario de la bacteria muerta, cuando está presente en el cultivo, es capaz de inducir la expresión de IL-4, y no incrementa la expresión de citoquinas del tipo T<sub>H1</sub>, esto corrobora que SOD no estimula la respuesta inmune celular en el bovino, pero si la respuesta inmune humoral.

Adicionalmente, los niveles observados de INF- $\gamma$  e IL-2 fueron similares tanto en los animales vacunados con RB-51 o con la cepa RB51SOD, con la excepción de que esta última indujo mayores niveles de IL-4. Esto, de acuerdo a la literatura es curioso e inesperado, ya que en ratones se ha demostrado que la cepa de *B. abortus* RB51 que sobreexpresa SOD (RB51SOD) desarrolla una respuesta inmune celular que confiere una mayor una mayor resistencia (Vemulapalli y col., 2002).

Estos resultados tomados en su totalidad, permiten descartar la hipótesis de trabajo que proponía que Cu/Zn SOD de *Brucella abortus*, es en el bovino, al igual que en la especie murina, un buen inductor de la respuesta inmune del tipo T<sub>H</sub>1 mediada por los linfocitos T, lo cual estaría descartando la posibilidad de potenciar la vacuna *B. abortus* RB51, actualmente en uso, mediante el uso de cepas recombinantes que sobreexpresan la proteína SOD.

Finalmente, en base a los resultados presentados en este trabajo, es posible plantear las siguientes conclusiones:

- En la especie bovina, Cu/Zn SOD de *B. abortus*, no es un buen inductor de la respuesta inmune del tipo T<sub>H</sub>1.
- El presente estudio representa un buen ejemplo de que muchas veces no es posible extrapolar resultados de una especie a otra.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A.K. (1988) A reassessment of the mechanisms of antigen-specific T cell dependent B-cell activation. *Immunol. Today.*, 9, 89-94.

Alton, G. (1978) Recent developments in vaccination against bovine brucellosis.

*Aust. Vet.*, J. 54, 551-557.

Araya, L., Elzer, P., Rowe, G., Enright, F. and Winter, A. J. (1989) Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *B. Abortus*.

*J. Immunol.*, 143, 3330-3337.

Araya, L. and Winter, A. (1990) Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum.

*Infect. Immun.*, 58, 254-256

Bottomly, K. (1988) A functional dichotomy in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

*Immunol. Today.*, 9, 268-272.

Brooks-Alder, B. and Splitter, G. (1988) Determination of bovine lymphocyte response to extracted proteins of *Brucella abortus* by using protein immunoblotting.

*Infect. Immun.*, 56, 2581-2586.

Brooks-Worrell, B. and Splitter, G. (1992a) Sodium dodecyl sulfate-and salt-extracted antigens from various *Brucella* species induce proliferation of bovine lymphocytes.

*Infect. Immun.*, 60, 2136-2138.

Brooks-Worrell, B. and Splitter, G. (1992b) Antigens of *Brucella abortus* S19 immunodominant for bovine lymphocytes as identified by one-and two-dimensional cellular immunoblotting.

*Infect. Immun.*, 60, 2459-2464.

Cheers, C. and Ho, M. (1983) Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV.

Functional in natural resistance to facultative intracellular bacteria. *J. Retic. Soc.*, 34, 299-305.

Cheville, N., Stevens, M., Jensen, A., Tatum, F. and Halling, S. (1993) Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of

*Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, 54, 1591-1597.

Coffman, R., Seymour, B., Lebman, D., Hiraki, D., Christiansen, J., Shrader, B., Cherwinski, H.,

Savelkoul, H., Finkelman, F., Bond, M. and Mosmann, T. (1988) The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol. Rev.*, 102, 5-28.

Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Eisen, H. N. and Wood, W. B. (1967). Microbiology. Ed.

Hoerber Medical Division. 812-813.



Douglas, J., Rosenberg, E., Nikaido, H., Verstrete, D. and Winter, A. J. (1984) Porins of *Brucella* species. *Infect. Immunol.*, 44, 16-21.

Dzata, G., Wyckoff III, J. and Confer, A. (1991) Immunopotential of cattle vaccinated with a soluble *Brucella abortus* antigen with low LPS content: an analysis of cellular and humoral immune response. *Vet. Microbiol.*, 29, 15-26.

Fernandez-Botran, R., Sanders, V.M., Mosmann, T.R. and Vitetta, E. S. (1988) Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.*, 168, 543-558.

Flesh, I. and Kaufmann, S.H.E. (1989) Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 138, 4408-4413.

Harris, D., Backstrom, B., Booth, R., Love, S., Harding, D. and Watson, J. (1989) The mapping of epitopes of the 18 Kda protein of *Mycobacterium leprae* recognized by murine T cells a proliferation assay. *J. Immunol.*, 143, 2006-2012.

Hindsill, R. and Berman, D. (1967) Antigens of *Brucella abortus*. I. Chemical and immunoelectrophoretic characterization. *J. Bacteriol.*, 93, 544-549.

Jiang, X. and Baldwin, C (1993) Effect of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*.

*Infect. Immun.*, 61, 124-130.

Jones, S. and Winter, A. J. (1992) Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages.

*Infect. Immunol.*, 60, 3011-3014.

Kaufmann, S.H. (1993) Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 129-163.

Krieg, A.K., Yi, A-K., Matson, S. et al. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.*, 374, 549-549.

Moroni, M.A. (2002) Subpoblaciones linfocitarias en la especie bovina. Tesis, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, 27-30 pp.

Mosmann, T., Chewinski, H., Bond, M., Giedlin, M. R. and Coffman, R. (1986) Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136, 2348-2357.

Oñate, A. A., Céspedes, S., Cabrera, A., Rivers, R., Gonzales, A., Muñoz, C., Folch, H. and Andrews, E. (2003). A DNA Vaccine Encoding Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Brucella abortus* Induces Protective Immunity in BALB/c Mice. *Infect. Immun.*, 71, 4857-4861.

Pavlov, H., Hogarth, M., McKenzie, I. and Cheers, C. (1982) "In vivo" and "in vitro" effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection.

*Cell. Immunol.*, 71, 127-138.

Powrie, F. and Mazon, D. (1988) Phenotypic and functional heterogeneity of CD4<sup>+</sup> T cells.

*Immunol. Today.*, 9, 274-279.

Reiner, S.L and Locksley, R.M. (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*.

*Annu.Rev. Immunol.*, 13, 151-177

Romagnani, S. (1991) Human TH1 and TH2: Doubt no more. *Immunol. Today.*, 12, 256-257.

Santos, J., Verstrete, D., Pereira, V. and Winter, A. (1984) Outer membrane proteins from rough strain of four *Brucella* species. *Infect. Immun.*, 46, 188-194.

Schurig, G., McQuiston, J.R., Sriranganathan, N. and Boyle, S.M. (1995) Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host-range plasmids. *Methods. Mol. Biol.*, 47, 143-148.

Seder, R., Plaut, W., Davis, M., Fazekas, D. and Groth, B. (1992) The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine producing potential of CD4<sup>+</sup> T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 176, 1091-1098.

Smith, R., Adams, L., Sowa, B. and Ficht, T. (1990) Induction of lymphocyte responsiveness by the outer membrane-peptidoglycan complex of rough strains of *Brucella abortus*.

*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 26, 31-48.

Stevens, M., Pugh, G. and Tabatabai, L. (1992) Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.*, 60, 4407-4409.

Stevens, M., Tabatabai, L., Olse, S. and Cheville, N. (1994) Immune response to superoxide dismutase and synthetic peptides of superoxide dismutase in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or RB51. *Vet. Microbiol.*, 41, 383-389.

Tabatabai, L., Deyoe, B. and Patterson, J (1989) Immunogenicity of *Brucella abortus* salt-extractable proteins. *Vet. Microbiol.*, 20, 49-58.

Vemulapalli, R., He, Y., Sriranganathan, N., Boyle, S.M. and Schurig, G.G. (2002) *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines.

*Vet. Microbiol.*, 90, 521-532.

Verstrete, D., Creasy, M., Caveney, N., Baldwin, C., Blab, and Winter, A. J. (1982) Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization.

*Infect. Immun.*, 35, 979-989.

Whalen, B., Tony, H. and Parker, D. (1988) Characterization of the effector mechanism of help for antigen-presenting and by stander resting B cell growth mediated by Ia-restricted Th2 helper T cell lines. *J. Immunol.*, 141, 2230-2239.

Winter, A., Verstrete, D., Hall, C., Jacobson, R., Castleman, W., Meredith, M. and McLaughlin, C. (1983) Immune response to porin in cattle immunized with whole cell, outer membrane, and outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trehalose dimycolate and muramyl dipeptide adjuvants. *Infect. Immun.*, 42, 1159-1167.

Zhan, Y. and Cheers, C. (1992) Endogenous gamma interferon mediate resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.*, 61, 4899-4901.

Zhan, Y., Yang, J. and Cheers, C. (1993a) Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect. Immun.*, 61, 2841-2847.

Zhan, Y., Kelson, A. and Cheers, C. (1993b) Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Immunol.*, 80, 458-464.