



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**“EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS Y  
EXPRESIÓN DE IL-4, IL-10, IL-12 E INTERFERÓN GAMMA, CON EL  
DESARROLLO DE LINFOCITOSIS PERSISTENTE EN VACAS INFECTADAS  
CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA(vLEB)”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**RICARDO FAVILA DE ALBA**

**TUTOR:**

**DRA. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO, FES-CUAUTITLAN**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. JOSÉ ANGEL GUTIÉRREZ PABELLO, FMVZ**

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO, FES-CUAUTITLAN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	PAG.
1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	4
3. ABREVIATURAS	5
4. INDICE DE TABLA Y DE FIGURAS	7
5. INTRODUCCIÓN	8
5.1 Etiología	8
5.2 Signos clínicos y lesiones	10
5.3 Transmisión	12
5.4 Diagnóstico	14
5.5 Respuesta inmune contra virus	15
5.6 Respuesta inmune contra el VleB	16
6. HIPÓTESIS	18
7. OBJETIVOS	18
8. MATERIAL Y MÉTODOS	
8.1 Diseño Experimental	19
8.2 Material Biológico	19
8.3 Titulación de anticuerpos contra el vLEB	19
8.4 Evaluación y/o obtención de ADN complementario (ADNc)	20
8.5 Diseño de iniciadores	20
8.6 PCR cuantitativa (qPCR)	21
8.7 Cuantificación relativa de la expresión de citocinas por qPCR	22
8.8 Análisis Estadístico	22
9. RESULTADOS	24
10. DISCUSIÓN	32
11. CONCLUSIÓN	39
12. BIBLIOGRAFÍA	40

## 1. RESUMEN

La linfocitosis persistente (LP) es la característica central de la infección por el virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB) misma que denota el inicio de la enfermedad clínica. Con la finalidad de relacionar los títulos de anticuerpos y la expresión de IL-4, IL-10, IL-12 e interferon gamma (IFN $\gamma$ ) con la presencia de LP, 34 vacas se agruparon con base a valores predeterminados de infección por vLEB y de LP como: vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> (n= 11), vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup> (n= 12) y vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup> (n= 11). Posteriormente, se utilizaron muestras de suero, ARN y ADNc, procedentes del archivo de dos muestreos mensuales, para determinar los títulos de anticuerpos mediante diluciones seriadas (1:50-1:6400) y la expresión de citocinas mediante prueba de ELISA indirecta y PCR cuantitativa, respectivamente. Las vacas vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> mostraron títulos de anticuerpos más altos que las vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>. Los títulos de anticuerpos exhibieron una relación directamente proporcional, estadísticamente significativa con los conteos linfocitarios, mismos que fueron más altos y estadísticamente diferentes en el grupo de altos títulos vLEB<sup>+</sup> que los del grupo negativo a vLEB. Con respecto a la expresión de citocinas, todas fueron más altas en el grupo negativo al vLEB comparadas con los grupos vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> y vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>. Siendo estadísticamente significativa para la IL-10 y la IL-12. Los resultados sugieren una expansión policlonal de células B IgM<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> (células blanco del vLEB) la cual promueve altos títulos de anticuerpos frente al vLEB en vacas afectadas por LP<sup>+</sup> y una severa supresión inmune en animales vLEB<sup>+</sup>. Hipotéticamente, dicha proliferación puede causar enriquecimiento células Breg, ya que el fenotipo IgM<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> ha sido recientemente descrito como Breg en humanos, lo que suprime las respuestas Th1 y Th2 y la secreción de IL-10 por retroalimentación negativa. Asimismo, las vacas no infectadas pueden poseer algún tipo de resistencia ya que siguieron siendo negativas durante todo el experimento, lo que podría explicarse por una secreción de IFN $\gamma$  mediada por IL-12 y probablemente por rasgos genéticos tales como la presencia de alelos de resistencia del complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bola). Se deben realizar más estudios para caracterizar la población de células Breg y para confirmar la presencia de alelos de resistencia Bola.

## 2. ABSTRACT

Persistent lymphocytosis (PL) is a hallmark of bovine leukemia virus (BLV) infection, which denotes the onset of disease. In order to relate the antibody titers, and expression level of IL-4, IL-10, IL-12, and interferon gamma (IFN $\gamma$ ) with the observation of PL, 34 cows were grouped according to pre-determined status of BLV infection and PL as follows: BLV<sup>+</sup>/PL<sup>+</sup> (n= 11), BLV<sup>+</sup>/PL<sup>-</sup> (n= 12) and BLV<sup>-</sup>/PL<sup>-</sup> (n= 11). Then, sera, RNA and cDNA from archival of 2 monthly samplings were used to determine antibody titers by serial dilution (1:50-1:6400) and cytokine expression level through an indirect ELISA test and quantitative PCR, respectively. The BLV<sup>+</sup>/PL<sup>+</sup> cows depicted higher antibody titers than BLV<sup>+</sup>/PL<sup>-</sup>. The antibody titers showed a statistically significant direct relationship with lymphocyte counts which were higher and significantly different in the high titer BLV<sup>+</sup> group compared to the negative group. Regarding cytokine expression, all cytokines were higher in the BLV negative group compared to the BLV<sup>+</sup>/PL<sup>+</sup> and BLV<sup>+</sup>/PL<sup>-</sup>, being statistically significant for IL-10 and IL-12. The data suggests a polyclonal IgM<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>Bcell proliferation (target cell of BLV infection) which promoted high BLV titers in PL<sup>+</sup> affected cows, and a severe immune suppression in BLV<sup>+</sup> animals. Hypotetically, such proliferation may cause an enrichment of Breg cells since the phenotype IgM<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> has been recently described as Breg cells in human literature, suppressing Th1 and Th2 responses, and IL-10 secretion by negative feedback. In addition, the uninfected cows may possess some kind of resistance since they remained negative throughout the experiment which may be explained by IL-12-mediated secretion of IFN $\gamma$ , and probably by genetic traits such as Bovine Lymphocyte Antigens (BoLA) resistance alleles presence. Further studies must be performed to characterize the putative Breg population and to confirm the presence of BoLA resistance alleles.

### 3. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ARN: ácido ribonucleico

APC: células presentadoras de antígenos

BoLA: complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Bovine lymphocyte antigens, por sus siglas en inglés)

CMHII: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II

ConA: Concavalina A

Cp: punto de cruce (crosspoint, por sus siglas en inglés)

DO: densidad óptica

DTT: ditioneitol

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, por sus siglas en inglés)

*env*: envoltura

g: gramos

gp: glicoproteínas

HPRT: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa

Ig: inmunoglobulinas

IL: interleucina

IFN: interferón (IFN por sus siglas en inglés)

LB: linfocitos B

LEB: leucosis enzoótica bovina

LP: linfocitosis persistente

LT: linfocitos T

M: mol o moles

mg: miligramos

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

min: minutos

µg: microgramos

µl: microlitros

mL: mililitros

mM: milimolar

Mpm: marcador de peso molecular

nM: nanomoles

ng: nanogramos

NTC: control sin templete (non template control, por sus siglas en Inglés)

PA: vacas con títulos altos de anticuerpos.

PB: vacas con títulos bajos de anticuerpos.

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, por sus siglas en Inglés)

qPCR: PCR cuantitativa

pM: picomoles

*pol*: polimerasa

PBMC: células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells, por sus siglas en Inglés).

RT: retrotranscripción

s: segundos

*Taq*: Thermusaquaticus

Th: T cooperadores (Thelper, por sus siglas en inglés)

TNF: factor de necrosis tumoral

U: unidades

vLEB: virus de la leucosis enzoótica bovina

## 4. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tablas:</b>	
<b>Tabla 1.</b> Secuencias de iniciadores.	21
<b>Figuras:</b>	
<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la partícula viral del vLEB.	10
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de transmisión de la LEB.	13
<b>Figura 3.</b> Diferencia en los conteos linfocitarios entre los grupos.	25
<b>Figura 4.</b> Promedios de título de Anticuerpos.	25
<b>Figura 5.</b> Diferencia entre títulos de anticuerpos.	25
<b>Figura 6.</b> Gradiente de temperaturas para IL-10.	27
<b>Figura 7.</b> Gradiente de temperaturas para IL-12.	27
<b>Figura 8.</b> Curva de concentración de MgCl <sub>2</sub> para IL-4.	28
<b>Figura 9.</b> Curva de concentración de MgCl <sub>2</sub> para IFN $\gamma$ .	28
<b>Figura 10.</b> Curva de amplificación de IFN $\gamma$ en qPCR.	29
<b>Figura 11.</b> Curva de disociación de IFN $\gamma$ en qPCR.	29
<b>Figura 12.</b> Expresión de IL-4 con base a los 3 grupos.	30
<b>Figura 13.</b> Expresión de IL-10 con base a los 3 grupos.	30
<b>Figura 14.</b> Expresión de IL-12 con base a los 3 grupos.	31
<b>Figura 15.</b> Expresión de IFN $\gamma$ con base a los 3 grupos.	31
<b>Figura 16.</b> Células reguladoras B y T.	36
<b>Figura 17.</b> Papeles recíprocos de células B y T reguladoras.	37



## 5. INTRODUCCIÓN

El ganado bovino productor de leche está expuesto a un gran número de enfermedades metabólicas, reproductivas e infecciosas agudizándose más en el sistema de producción intensivo (Ross, 2003). Dentro de las enfermedades infecciosas, se ha dado una gran importancia a las enfermedades bacterianas debido a que se considera que las enfermedades virales están controladas por la vacunación. Este concepto no es del todo acertado en el caso de la leucosis enzoótica bovina (LEB) (Mateos, 2005). La LEB pertenece a la lista B de la oficina internacional de epizootias (OIE) la cual está constituida por enfermedades transmisibles importantes desde el punto de vista socioeconómico y sanitario con considerables repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal (OIE, 2004). De hecho, el mayor impacto económico de la infección por el virus de la LEB (vLEB), es su interferencia en el movimiento internacional del ganado y semen más que a la enfermedad clínica en sí misma (Yeon Choi *et al.*, 2002).

La LEB está distribuida a nivel mundial y la prevalencia presenta una marcada diferencia regional (Andrews, 2004).

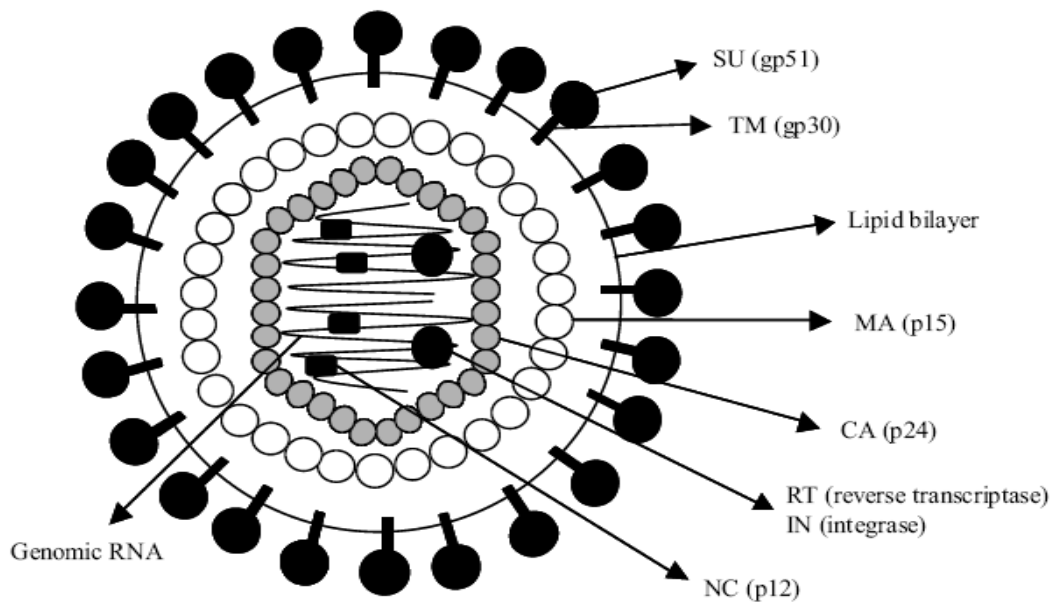
La enfermedad puede presentarse en 3 formas: a) Portadores asintomáticos los cuales corresponden al 65-70% del ganado infectado. La importancia de estos radica en que actúan como portadores y transmisores del virus, b) Linfocitosis persistente (LP) en alrededor del 20-30% de los animales los cuales permanecen clínicamente sanos y c) Linfoma, la cual representa la forma clínica de la enfermedad. Se observa en 1-5 % de las vacas y se desarrolla después de meses o años de incubación. Esta fase es reconocida como la fase fatal de la enfermedad (Radostits, 2002).

### 5.1 Etiología

La LEB es causada por un oncovirus exógeno, de tipo ARN, del género *Deltaretrovirus* de la familia *Retroviridae*, por lo que comparte características con otros virus leucémicos de diferentes especies (Van Regenmortel *et al.*, 2000). La familia *Retroviridae* se denomina así porque los virus que la integran codifican la enzima transcriptasa inversa (RT, por sus siglas en inglés) la cual es una polimerasa que utiliza el ARN viral para sintetizar ADN complementario de cadena sencilla, que

a su vez, es replicado para formar ADN de cadena doble. La RT también es capaz de degradar el ARN vírico original. Este mecanismo permite a los retrovirus convertir el ARN de banda sencilla lineal en ADN doble circular, para después integrarlo en el ADN cromosómico de la célula huésped. El estado integrado del ADN del virus se denomina provirus, y genera una infección persistente al estar asociado al material genético de la célula huésped ya que se replica cada vez que ésta se divide (Klintevall *et al.*, 1994).

El diámetro del vLEB envuelto es de 90 a 120 nm, el cual contiene un nucleocápside central de 60 a 90 nm. La densidad es 1.16 a 1.17 g/ml y el coeficiente de sedimentación del ARN viral es 60 a 70 S. Los viriones, esquematizados en la Figura 1, poseen RT y maduran por gemación (Pawling, 2002). Las proteínas codificadas por el gen *gag*, forman la estructura del virión (cápside) y desempeñan un papel importante en las etapas iniciales del ciclo de infección. Son designadas por su peso molecular como p24, p15, p12 y p10. De ellas, p24 es el mayor componente de la cápside y tiene varios sitios antigénicos. Las proteínas de la envoltura, codificadas por el gen *env*, son reconocidas por el receptor celular y son responsables del tropismo celular, interferencia viral y fusión celular. Derivan de un precursor común que es modificado por glicosilación y proteólisis, produciendo dos proteínas asociadas: gp51 de superficie y gp30 de transmembrana. La p24 y la gp51 del vLEB son los antígenos más importantes y los anticuerpos contra ellas pueden ser detectados en la mayoría de los animales infectados. La gp51 es responsable de la respuesta humoral principal ya que es un potente antígeno y promueve títulos anticuerpos más altos que los dirigidos hacia la p24 (González *et al.*, 2001). Estas dos proteínas constituyen la base para la detección mediante pruebas serológicas (Felmer *et al.*, 2006). El gen *pol* codifica para la RT de 80 kDa. La RT se activa preferentemente en presencia de Mg<sup>2</sup> (Gillet *et al.*, 2007). El virus se inactiva rápidamente al exponerse a la luz ultravioleta, al calentarse a 56°C por 30 minutos y a la pasteurización por lo que es probable que no permanezca viable en el medio ambiente durante mucho tiempo. Sin embargo, puede permanecer viable en muestras de sangre guardadas a 4° C por lo menos durante dos semanas (Andrews, 2004).



**Figura 1.** Representación esquemática de la partícula viral del vLEB. Dos copias de ARN genómico de cadena sencilla están empaquetadas en una partícula viral. Las proteínas forman una cápside, CA (p24), que contiene el ARN viral en interacción con la nucleocápside, NC (p12). Las dos enzimas que se requieren para la transcripción e integración del genoma viral (RT e IN), respectivamente, también están contenidas dentro de la cápside. La proteína de matriz, MA (p15) interconecta la cápside y la envoltura externa que está formada por una bicapa lipídica de origen celular en la cual están insertada un complejo de proteínas virales (gp51 SU y gp30 TM) (Gillet *et al.*, 2007).

## 5.2 Signos clínicos y lesiones

Antes de revisar las manifestaciones clínicas observadas en las vacas adultas infectadas con tumores clínicos o linfoma, se deben subrayar dos hechos. Menos del 5% de las vacas positivas a vLEB desarrollan tumores o enfermedad asociada con linfoma. La mayoría de las vacas infectadas con LEB son asintomáticas e inmunocompetentes como sus compañeras de rebaño seronegativas. El otro consiste en que debido a que las vacas con linfoma desarrollan varias presentaciones clínicas derivadas de la alteración del órgano blanco afectado, se requiere en la mayoría de los casos una cuidadosa diferenciación de otras enfermedades. Por tal motivo, el linfoma puede mimetizar un gran número de enfermedades inflamatorias o debilitantes de las vacas. Aunque los animales pueden infectarse por el vLEB a cualquier edad, los tumores se observan típicamente en animales de más de 3 años. Los signos clínicos rara vez se manifiestan antes de los 2 años de edad y son más frecuentes en las vacas cuya

edad está comprendida entre 3 y 6 años. A pesar de que el linfoma en la forma adulta de la enfermedad puede producir tumores en diversos órganos y en nodos linfáticos en ganado vacuno de 6 meses de edad, es más probable que los tumores observados en vacas de menos de 2 años de edad no estén relacionados con la infección por vLEB (OIE, 2004; Rebhun, 1999). De este modo, los tumores linfocíticos se clasifican por la edad de aparición, la localización anatómica, el patrón de distribución en la población y la relación etiológica con LEB. El linfoma enzoótico es la forma multicéntrica de la enfermedad que se presenta de forma típica en bóvidos adultos de más de 3 años. No más de un 5% de los animales infectados presentan anualmente linfomas clínicamente aparentes (Kahrs, 2001). Los casos típicos al inicio presentan un aumento de volumen de los nodos linfáticos superficiales (linfadenopatía superficial) en el momento del reconocimiento clínico y presentan una gran variedad de signos clínicos que varían de acuerdo con la localización de las masas tumorales y de la función vital inicialmente afectada (Rebhun, 1999). Los más notables pueden ser los nodos linfáticos prefemorales, supramamarios, preescapulares y maxilares. No siempre los síntomas corresponden con las lesiones (Kahrs, 2001). La mayoría de las vacas con linfoma manifiestan signos inespecíficos de pérdida de peso, apetito disminuido y producción disminuida (Rebhun, 1999). En ocasiones, los primeros síntomas observados son cojera, andar anormal o parálisis. La linfocitosis persistente, cifra anormalmente elevada de linfocitos encontrada en por lo menos dos muestras de sangre en un intervalo de 3 meses, se observa con frecuencia en rebaños con LEB (Kahrs, 2001). Sin embargo, el ganado puede ser infectado con LEB y desarrollar tumores sin la presencia de linfocitosis (Van Der Maaten *et al.*, 1990). Los hallazgos morfológicos de linfoma adulto incluyen agrandamiento de nodos linfáticos y masas tumorales discretas o difusas, las cuales corresponden a infiltración de linfocitos neoplásicos en diferentes órganos. El hígado, bazo, riñones, intestinos, abomaso, columna vertebral, tejido retrobulbar, útero, corazón y tracto urinario son comúnmente afectados. Los pulmones raramente están involucrados (Andrews, 2004; Kahrs, 2001; Gillet *et al.*, 2007).

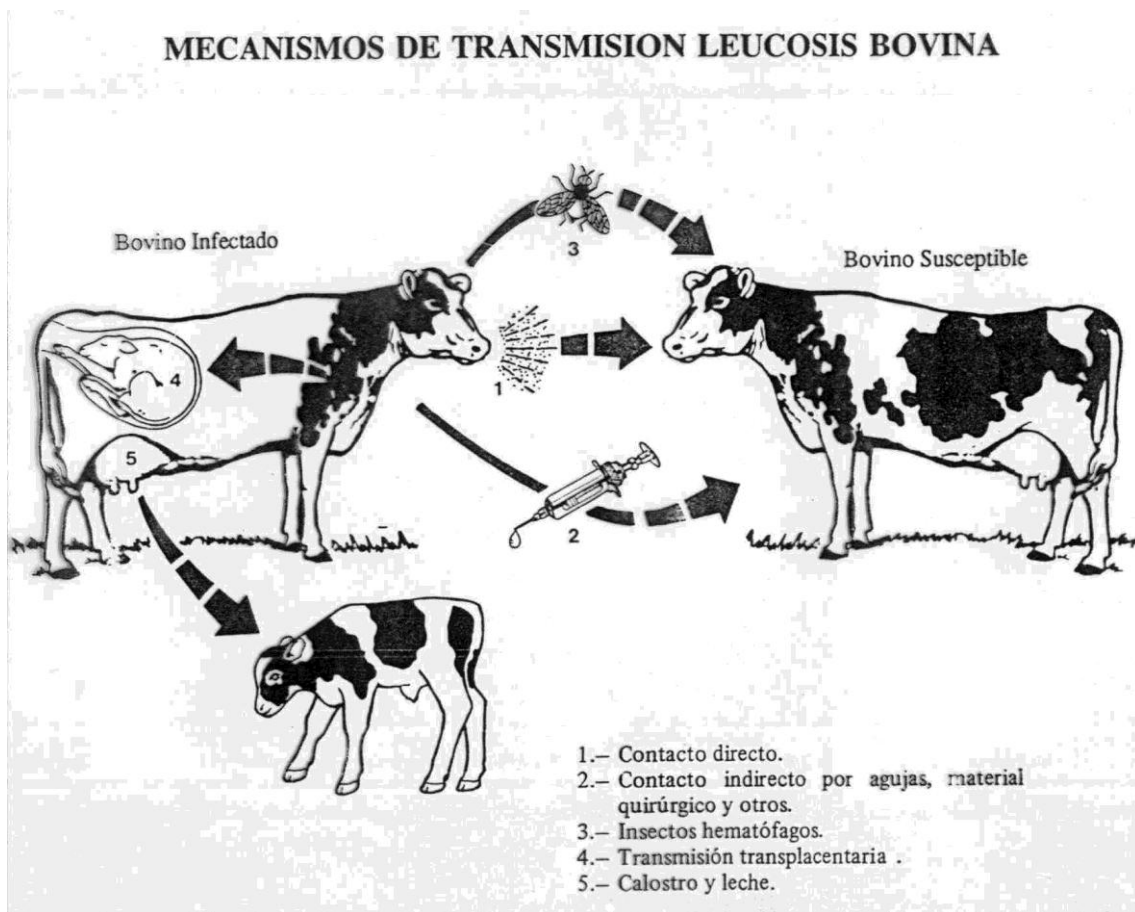
### 5.3 Transmisión

La transmisión de la enfermedad (Figura 2) se lleva a cabo mediante la transferencia de células infectadas de animales portadores y/o enfermos hacia animales sanos, ya sea de manera vertical u horizontal por medio de sangre, exudados vaginales, iatrogénicamente y por insectos hematófagos que sirven como vehículos y vectores (Motton *et al.*, 2003). Una cantidad tan pequeña como 0.1µl de sangre entera de una vaca infectada puede ser contagiosa si se aplica intradérmicamente al ganado (Andrews, 2004). Se han encontrado leucocitos infectados con vLEB en la leche y en el calostro, pero al parecer las madres infectadas no son el medio de transmisión más importante, posiblemente por interferencia por parte de los anticuerpos neutralizantes presentes en el calostro (Kahrs, 2001). Aunque se han identificado antígenos virales y DNA proviral en el semen, la leche y el calostro, la transmisión natural a través de estas secreciones no se ha demostrado (Dus Santos *et al.*, 2007). Numerosas investigaciones previas sugieren que el semen de toros infectados por LEB no es infeccioso para las vacas receptoras (Yeon Choi *et al.*, 2002). Se reporta que la vía transplacentaria puede ser responsable de aproximadamente el 5 % de terneros infectados nacidos de madres portadoras (González *et al.*, 2001). Sin embargo, se describe que el porcentaje de transmisión vertical oscila entre el 3-16% (Pawling, 2002). No todas las vacas infectadas producen fetos infectados e individualmente vacas infectadas pueden dar a luz becerros infectados o no infectados. La transmisión vertical del genoma del virus vía gametos no ocurre (Andrews, 2004).

Cuando el animal se infecta con el vLEB produce anticuerpos (IgG1, IgG2 eIgM) que circulan en la sangre por periodos largos de tiempo (Batmaz *et al.*, 1995). La persistencia de estos anticuerpos en el suero es causada por la presencia continua del vLEB por parte de los linfocitos de la sangre (Klintevall *et al.*, 1994). Se ha comprobado que en terneros los anticuerpos calostrales llegan a durar hasta 71 días (Johnson *et al.*, 1987; Lassauzet *et al.*, 1990). Por otra parte, se menciona que la transferencia de anticuerpos calostrales a terneros receptores confiere un cierto grado de resistencia a la infección (Kahrs, 2001).

Aparentemente en el ganado lechero, la prevalencia de la infección se incrementa con la edad y el contacto con ganado adulto infectado parece ser el factor de mayor influencia. La tasa de infección es mayor en ganado lechero que en ganado de carne (Dargatz *et al.*, 1998; González *et al.*, 2001). Esta mayor incidencia puede ser más

por las oportunidades de exposición que por una susceptibilidad específica de razas (Kahrs, 2001)



**Figura 2.** Mecanismos de transmisión de la LEB (Motton *et al.*, 2003).

El periodo de incubación es de por lo menos 2 semanas antes de que aparezcan títulos de anticuerpos frente al vLEB. En algunos casos este periodo puede ser de varios meses. El vLEB infecta a los LB y mantiene su presencia a lo largo de su maduración (Hernández *et al.*, 2006). Las principales células blanco del vLEB son los linfocitos B(LB) que expresan IgM en su superficie y también con mayor frecuencia los que expresen en su superficie los marcadores CD5 y CD11b(Florins *et al.*, 2008; Lavanya *et al.*, 2008). En animales con LP, la mayoría (> 60%) de los LB CD5<sup>+</sup> circulantes en sangre periférica contienen provirus (Heenemann *et al.*, 2012). De este modo, el virus establece una infección persistente en la subpoblación de LB mediante la integración de su ADN (proviral) al ADN de la célula huésped. Se ha reportado que los sitios de integración son al azar y que las células infectadas llegan a contener de 1 a 4 copias del provirus (Andrews, 2004; Eaves *et al.*, 1994; Kuzmak

*et al.*, 1999). También posee la capacidad de infectar otras células, tales como linfocitos T (LT) CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma/\delta$ , monocitos y granulocitos (Felmer *et al.*, 2006; Klintevall *et al.*, 1997; Panei *et al.*, 2013). La manifestación de enfermedad linfoproliferativa, probablemente se deba a la participación de factores genéticos, inmunológicos y/o ambientales (Hernández *et al.*, 2006).

Cabe señalar que casi todo el hato desarrolla anticuerpos detectables (Andrews, 2004) y que en hatos con alta prevalencia de anticuerpos a menudo se observa disminución de la eficiencia de producción, aumento de las tasas de sacrificio y mayor incidencia de linfoma clínico que en hatos no infectados (Kahrs, 2001). Debido a que el vLEB afecta principalmente a los linfocitos, se ha sugerido que el virus puede disminuir la capacidad de respuesta inmune y por tanto, la infección puede ser inmunosupresora (Doménech *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la infección generalmente es persistente y subclínica y está acompañada de anticuerpos en suero cuya presencia se considera evidencia de la infección. Adicionalmente, ya que los linfocitos son las células huéspedes del vLEB, se señala que se requiere de transferencia de linfocitos para la transmisión de animal a animal (Kahrs, 2001).

#### **5.4 Diagnóstico**

El diagnóstico de la LEB puede realizarse de manera clínica, serológica, identificación del virus y/o proteínas virales y la identificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) o la retrotranscripción de ARN y amplificación de ADN complementario (RT-PCR) en sus diversas modalidades (Kahrs, 2001; Klintevall *et al.*, 1994). La respuesta inmune humoral frente al vLEB principalmente está dirigida a las proteínas gp51 de envoltura y la p24 de la capsida del vLEB. La prueba de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés) es ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra la gp51 de la envoltura (Juliarena *et al.*, 2007, 2008). Se ha sugerido que después de la infección los niveles de anticuerpos se deban a una alta carga viral (Gillet *et al.*, 2007; Juliarena *et al.*, 2009).

Sin embargo, en las infecciones virales, la inmunidad humoral no siempre es suficiente para el control de la infección debido a que los virus son patógenos intracelulares obligados, por lo que se mantienen parcialmente a salvo de los

anticuerpos, siendo la inmunidad celular más eficiente para prevenir la diseminación del virus y finalmente eliminarlo (Sahagún, 2010).

### **5.5 Tipos de respuesta inmune celular.**

Los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) secretan patrones característicos de citocinas los cuales promueven diferentes tipos de respuesta inmune celular (Koch *et al.*, 1996). Las citocinas son polipéptidos biológicamente activos que controlan, entre otras cosas, el crecimiento y la diferenciación de los LT y LB. Los linfocitos Th son los responsables de orquestar una respuesta inmune adecuada a una amplia variedad de patógenos. Los patrones más reconocidos son la respuesta tipo Th1 y la respuesta tipo Th2 (Szabo *et al.*, 2003). La interleucina-12 (IL-12) y el interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) son citocinas encargadas de promover la diferenciación a Th1, a su vez interleucina-13 (IL-13) e interleucina-4 (IL-4) son responsables de promover la diferenciación hacia Th2 (Zhu *et al.*, 2010). Algunas citocinas como la interleucina-10 (IL-10) pueden ser producidas por otros tipos de células como Th2, Th17, pero principalmente T reguladoras (Treg) (Ouyang *et al.*, 2011). Las células Th1 secretan IFN $\gamma$ , IL-2, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), y factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF $\beta$ ), que son fundamentales para la erradicación de patógenos intracelulares.

Las células Th2 producen las citocinas IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13, que son esenciales para la producción óptima de anticuerpos y para la eliminación de organismos extracelulares (Szabo *et al.*, 2003). La IL-4 que es secretada por basófilos y mastocitos en respuesta a eventos de activación mediados por receptores, juega un papel central en la regulación de la diferenciación de las células T vírgenes. También actúa como un co-estimulador para el crecimiento de células B y suprime fuertemente la aparición de células Th1 productoras de IFN $\gamma$  (Nelms *et al.*, 1999).

La IL-12 es un heterodímero que consta de dos cadenas sin relación, p40 y p35 y es producida por diferentes tipos de células que incluye dendríticas, macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, células de Langerhans y LB (Koch *et al.*, 1996; Pyeon *et al.*, 1996). La generación óptima de los LT CD4<sup>+</sup> Th 1 y LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) requiere la expresión de IL-12 (Trinchieri 1995). Se describen 3 formas en que la IL-12 promueve una respuesta de tipo Th1: (a) promueve la diferenciación de LT vírgenes, durante el primer encuentro con un antígeno, en una población de células Th1 capaz de producir grandes cantidades de IFN $\gamma$  después de la activación, (b)



sirve como un co-estímulo necesario para la secreción máxima de IFN $\gamma$  por células Th1 diferenciadas en respuesta a un antígeno específico y (c) que estimula el desarrollo de células Th1 productoras de IFN $\gamma$  a partir de poblaciones de células T de memoria en reposo que interactúan con un antígeno al que han sido expuestas previamente (Gately *et al.*, 1998). Por otro lado, el IFN $\gamma$  inducen la activación de células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en Inglés) mediante la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II, por sus siglas en inglés) (Yakobson *et al.*, 2000) y se ha descrito que *in vitro* induce una actividad antiviral en contra de muchos virus (Usui *et al.*, 2007). Por tal motivo, ambas citocinas desempeñan un papel fundamental en la resolución de infecciones virales. La IL-10 se describió inicialmente como la citocina inhibidora del factor de síntesis (CSIF por sus siglas en inglés) de células Th2 estimuladas con Concanavalina A (ConA), inhibiendo la producción de citocinas como la IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  y GM-CSF por las células Th1, pero no las células Th2, en respuesta a antígenos presentados por APC. Posteriormente, se encontró que tanto células B como células B de linfoma producían IL-10 y a un homólogo de IL-10, BCRFI, que fue descubierto en el genoma del virus Epstein-Barr. Por ello se propuso que la IL-10 y su homólogo viral juegan un papel clave en suprimir el sistema inmune del huésped, lo que permite el crecimiento de linfoma y la supervivencia del virus en el huésped (Pestka *et al.*, 2004). Los hallazgos recientes señalan que la IL-10 requiere combinarse con diferentes moléculas co-estimuladoras para la diferenciación y el mantenimiento de un conjunto de células Treg, y para la inhibición de las respuestas Th17 y Th1. Lo anterior, pone de manifiesto la participación potencial de las células B en el mantenimiento de las células Th y Tregs periféricas (Mauri&Bosma 2012). La inmunidad Th1 es considerada como la respuesta más efectiva en el control de las infecciones causadas por retrovirus (Wang *et al.*, 1995).

### **5.6 Respuesta inmune contra el vLEB.**

La respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral juegan un papel muy importante en la protección del huésped contra la infección natural por el vLEB (Kabeya *et al.*, 2001). Se ha descrito que una baja respuesta inmune celular está asociada a la progresión hacia LP (Pyeon *et al.*, 1996). De hecho se describe que durante la etapa de LP y linfoma, un mal funcionamiento de las células T, que incluye una alteración en la proliferación celular y una baja producción de citocinas

que diferencian a Th1, promueve la aceleración en el progreso de la enfermedad (Ikebuchi *et al.*, 2011). Se ha reportado que el INF- $\gamma$  bovino recombinante suprimió con éxito el crecimiento *in vitro* del vLEB, aunque el mecanismo sigue siendo desconocido (Sentsui *et al.*, 2001).

La expresión de IL-12 e IFN $\gamma$  es mayor en animales infectados que no desarrollan LP y menor en aquéllos con LP (Gillet *et al.*, 2007; Konnai *et al.*, 2003; Pyeon and Splitter 1998; Yakobson *et al.*, 2000). De manera opuesta, bovinos infectados con LP exhiben incrementos en la expresión de ARNm de IL-10 (Amills *et al.*, 2002; Gillet *et al.*, 2007; Yakobson *et al.*, 2000).

También se ha descrito, que en vacas infectadas con el vLEB, la activación de LB y LT se ve aumentada, y que este aumento ha sido determinado por el aumento de la expresión de MHC II y de CD25. Este último corresponde a la cadena alfa del IL-2R (Isaacson *et al.*, 1998; Konnai *et al.*, 2005) y propone que los linfocitos B CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> presentan cierta resistencia a la apoptosis causada por el TNF- $\alpha$ . En el 2006 Konnai *et al.*, sugiere que la regulación de la expresión de TNF- $\alpha$  podría influir en la proliferación de las células B durante la progresión de la enfermedad. También se menciona que las células que más expresan TNF- $\alpha$  son las que presentan CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> en su superficie. El receptor de membrana del TNF- $\alpha$  se considera como un ligando, que induce la activación de células B en la proliferación policlonal de células B inducida por virus (Higuchi *et al.*, 1997).

Por otro lado, en un hato lechero con alta prevalencia de LEB, se determinaron valores significativamente más altos de linfocitosis persistente (LP) en un grupo con alta carga viral de vLEB que los de un grupo infectado que no desarrolló LP con baja carga viral. En este estudio, la carga viral presentó una fuerte correlación con el diagnóstico de LP. Los datos sugieren que los animales que no desarrollaron LP, incluyendo a un grupo que permaneció negativo a lo largo del experimento, poseen ciertos mecanismos de resistencia al no desarrollar LP a pesar de pertenecer a un hato con alta prevalencia de LEB (Zavaleta, 2009).

## **6. HIPÓTESIS**

Si la respuesta inmune limita la carga viral en sangre entonces se disminuyen las probabilidades de desarrollo de LP.

## **7. OBJETIVOS**

- Establecer la relación de la respuesta inmune en el desarrollo de linfocitosis persistente en vacas infectadas por el vLEB.

### **PARTICULARES**

- Evaluar los títulos de anticuerpos asociados al desarrollo de linfocitosis persistente.
- Evaluar la expresión de IL-4, IL-10, IL-12 e INF gamma asociados al desarrollo de linfocitosis persistente.
- Relacionar los títulos de anticuerpos y la expresión de las citosinas asociados con el desarrollo de linfocitosis persistente.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 Diseño Experimental.**

Con el fin de establecer la relación de la respuesta inmune frente al vLEB con el desarrollo de linfocitosis persistente, se utilizaron 34 vacas Holstein de 4 años en adelante procedentes de dos unidades productoras de leche con alta prevalencia de LEB pertenecientes al Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca (CAIT) con un estatus de infección por vLEB por prueba de ELISA indirecta y PCR cuantitativa (qPCR) y valores predeterminados de LP mediante conteos absolutos de linfocitos a través de microscopía óptica (Zavaleta, 2009). Con base a los parámetros descritos, se conformaron tres grupos de animales: vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> (n= 11), vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup> (n= 12) y vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup> (n= 11).

### **8.2 Material Biológico.**

Se utilizó material biológico del archivo de los animales en estudio (suero, ARN y ADNc) procedente de los muestreos mensuales para la titulación de anticuerpos frente a infección por vLEB y la determinación de la expresión de IL-4, IL-10, IL-12 e IFN $\gamma$  por prueba de ELISA indirecta y qPCR, respectivamente.

### **8.3 Titulación de anticuerpos contra el vLEB**

Se realizaron diluciones seriadas (de 1:50 a 1:1600) de suero para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del vLEB mediante una técnica de ELISA indirecta comercial, siguiendo las indicaciones del fabricante (VMRD Inc., Pullman, WA. USA) Primero, se realizó una dilución 1:50 en las muestras de suero con la solución amortiguadora de dilución. Cada placa con antígeno incluyó un suero control positivo, dos sueros controles negativos, incluidos en el paquete de reactivos, y un pozo blanco de reactivos al que no se le agregó suero. Todas las muestras se trabajaron por triplicado de la siguiente manera: Se agregaron 50  $\mu$ l de cada dilución por muestra de suero en los pozos de la placa asegurándose que la muestra cubra la parte inferior de los pozos y la placa se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Se lavaron los pozos tres veces utilizando la solución amortiguada de lavado, eliminando perfectamente el contenido de los pozos sobre una toalla de papel. Posteriormente, se aplicaron 50  $\mu$ l de conjugado (anti-IgG bovina marcada con peroxidasa) a todos los pozos de la placa asegurándose que el conjugado cubriera

la parte inferior de los pozos y la placa se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Acto seguido, se realizó otro lavado para agregar 50 µl de la solución de sustrato e incubar a temperatura ambiente durante 20 min sin vaciar los pozos. Finalmente, se agregaron 50µl de la solución de finalización y se mezcló el contenido de los pozos agitando suavemente en una superficie plana. La lectura y registró de la prueba se realizaron inmediatamente después de la aplicación de la solución de “paro” en un lector de ELISA (Stat Fax 3200 Awareness Technology) a una longitud de onda de 620-650 nm para la lectura de densidad óptica (DO).

#### **8.4 Evaluación y/o obtención de ADN complementario (ADNc)**

Se evaluó la concentración e integridad del total de muestras de ARN y ADNc por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio. En los casos con falta de integridad o baja concentración de ADNc, se realizó retrotranscripción (RT) con el ARN utilizando reacciones de 20 µl. En un microtubo de 0.2 mL, se agregaron 2 µg de ARN y 2.5 µM de iniciador Oligo (dT)<sub>20</sub> (Promega Corp., Madison WI., USA) y se ajustó volumen a 11 µl con agua grado molecular. La mezcla se incubó a 70°C durante 10 min y a 4°C durante 5 minutos en el termociclador MasterCyclerGradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) para añadir 5µl Buffer 5x (Tris HCl250mM, KCl375mM, MgCl<sub>2</sub>15mM), 0.01M de ditioneitol(DTT), 0.25 µM de cada dNTPs y agua grado biología molecular c.b.p. 20 µl. La mezcla se homogeneizó e incubó a 37°C en el termociclador (Mastercyclergradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) para añadir 1 U. de enzima RT (Superscript II, Invitrogen, California, USA) justo en el momento del registro de la temperatura 37°C e incubar por un tiempo total de 60 min. El ADNc se visualizó en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y se congeló a -20°C hasta su uso en protocolos de qPCR.

#### **8.5 Diseño de Iniciadores**

Para los protocolos de qPCR se diseñaron iniciadores específicos con base a secuencias obtenidas del GenBank utilizando el programa IDT'sSciTools PrimerQuest<sup>SM</sup> (Integrated DNA Technologies White head Institute for Biomedical Research) para la amplificación de productos de 100-200 bp de IL-4, IL-10, IL-12p40 e IFN $\gamma$  bovinos. Se valoró que la temperatura de desnaturalización se encontrara cercana a los 60°C y el % de G:C fuera similar en todos los casos.

**Tabla 1.** Secuencias de iniciadores diseñadas para la amplificación de las citocinas en qPCR.

Citocina		Secuencia	pb*
IL-4	Fwd	TGA GGA TGT TCA GCG TTT TG	114
	Rv	CCT ACC AGC TGA TCC CAG TG	
IL-10	Fw	GCT CCA AGA GAG GGG TGT CT	128
	Rv	TCA CCA TCC TGG AGG TCT TC	
IL-12p40	Fw	AGC TTG GAG CAC AGG GAG TA	111
	Rv	GTG CAC AGC TTC TAC CAC GA	
IFN $\gamma$	Fw	GCC ACT ACT TTG ATG GCA TGT	108
	Rv	CTG AAG CGC CAG GTA TAA GG	

\*Producto esperado en pares de bases (pb).

### 8.6 PCR cuantitativa (qPCR)

Previo a la estandarización de la qPCR, la temperatura de alineación y la concentración de MgCl<sub>2</sub> e iniciadores óptimas para la amplificación de cada citocina se determinaron por PCR punto final utilizando las siguientes condiciones de amplificación: un paso de desnaturalización inicial de 94°C durante 300 segundos (s), seguido de 35 ciclos de desnaturalización, 94 °C durante 60 s; alineación, 60 °C por 60 s; elongación 72 °C por 120 s, y un ciclo de elongación final de 72 °C durante 300 s.

El qPCR se realizó en reacciones de 25  $\mu$ l en un equipo LightCycler<sup>®</sup>480 (Roche<sup>™</sup> Diagnostics Indianapolis, IN.USA) usando QuantifastSYBR Green Master Mix (QIAGEN, USA) como sistema de amplificación y detección y 12.5 ng de ADNc. Se realizaron curvas para determinar la concentración óptima de los oligonucleótidos iniciadores. Cada muestra se ejecutó por triplicado y con una reacción control sin template de ADNc (NTC, Non Template Control) en placas ópticas de 96 pozos (LightCycler<sup>®</sup>480 MultiwellPlate 96 of Roche<sup>™</sup>). Posterior a la activación de la enzima a 95°C por 5 min, se siguieron las condiciones estándar de amplificación siguiendo 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10s, alineación y elongación a 61°C por 30s. Posterior a la amplificación, se incrementó la temperatura de 60°C a 95°C para construir una curva de disociación y se determinó la especificidad del producto amplificado.

### 8.7 Cuantificación relativa de la expresión de citocinas por qPCR

Se realizó la comparación del punto de cruce (cross- point/ $C_p$ ) de la muestra desconocida con una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestra proveniente de PBMC de una vaca no infectada). Todas las cuantificaciones de las muestras desconocidas y de la muestra calibradora fueron normalizadas con un control interno. En este estudio se utilizó el gen constitutivo (housekeeping) hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). Primero, el  $C_p$  de la muestra y del  $C_p$  control interno HPRT ( $C_p$  HPRT) fueron determinados para cada muestra para el cálculo de la  $\Delta C_p$  el cual resulta de la diferencia del  $C_p$  de la muestra y  $C_p$  HPRT. Posteriormente, al  $\Delta C_p$  de cada muestra se resta el  $\Delta C_p$  del calibrador. Esta diferencia es llamada  $\Delta\Delta C_p$  y la cantidad relativa se calcula por  $2^{-\Delta\Delta C_p}$ . Así, la diferencia en la expresión de la muestra se expresa como  $n$ -veces relativa al calibrador (AppliedBiosystems).

Las ecuaciones para calcular  $\Delta\Delta C_p$  para el método de cuantificación relativa son:

$$C_p \text{ de la muestra} - C_p \text{ HPRT} = \Delta C_p.$$

$$\Delta C_p \text{ de la muestra} - \Delta C_p \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_p.$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_p}.$$

Los resultados de los triplicados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar.

### 8.8 Análisis Estadístico

La diferencia estadística entre grupos con base al conteo linfocitario se realizó mediante análisis de varianza y comparación de medias por prueba Tukey.

En el análisis del título de anticuerpos relacionándolo con el estatus de LP se realizó la prueba de t-Student para muestras independientes, mediante el paquete estadístico SPSS 16.0. El modelo que se utilizó en el análisis fue:

$$Y_{ij} = T_{ij} + E_{ij}$$

Donde  $Y_{ij}$  es la variable a analizar: Título de anticuerpos.

$T_{ij}$ :

- a) vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> = positivas a la infección (ELISA/qPCR) con LP.
- b) vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup> = positivas a la infección (ELISA/qPCR) sin LP.

$E_{ij}$  = error aleatorio.

El análisis de los datos del título de anticuerpos, perfil de expresión de citosinas y conteos linfocitarios se realizó mediante el procedimiento GLM, acompañado con la prueba de Tukey, para determinar la diferencia entre grupos, usando el paquete estadístico SPSS 16.0. El modelo que se utilizó en el análisis fue:

$$\mu_i = T_{ij} + E_{ij}$$

Donde  $\mu_{ij}$  es la variable a analizar: conteo linfocitario o expresión de interleucinas

$T_{ij}$  para la variable **conteo linfocitario** fueron:

- a) PA = positivas a la infección (ELISA/qPCR) con título de anticuerpos alto\*.
- b) PB = positivas a la infección (ELISA/qPCR) con título de anticuerpos bajo\*\*.
- c) N = negativas a la infección (ELISA/qPCR)

$E_{ij}$  = error aleatorio.

\* Títulos  $\geq 100$

\*\* Títulos  $\leq 50$

$T_{ij}$  para la variable **expresión de citocinas** fueron:

$vLEB^+ / LP^+$  = positivas a la infección (ELISA/qPCR) con LP.

$vLEB^+ / LP^-$  = positivas a la infección (ELISA/qPCR) sin LP.

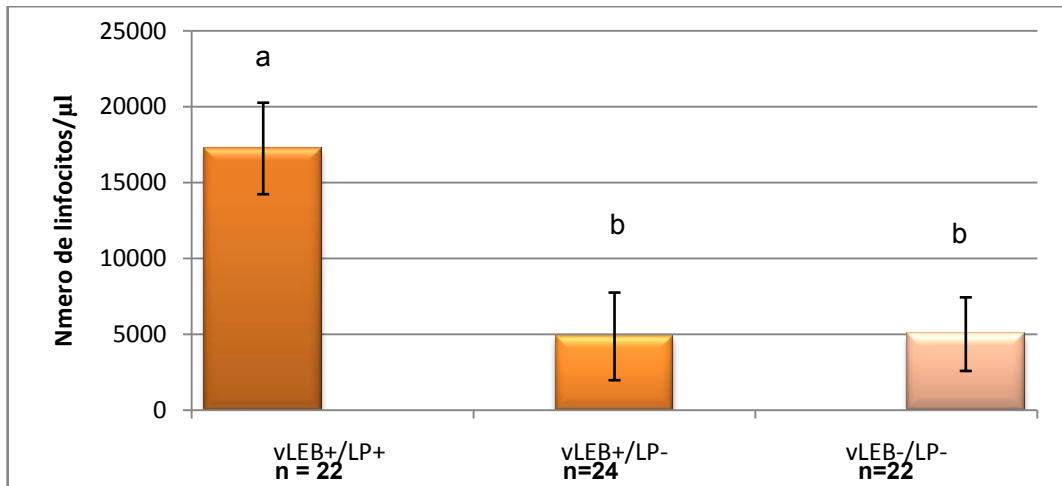
$vLEB^- / LP^-$  = negativas a la infección (ELISA/qPCR) sin LP.

$E_{ij}$  = error aleatorio.

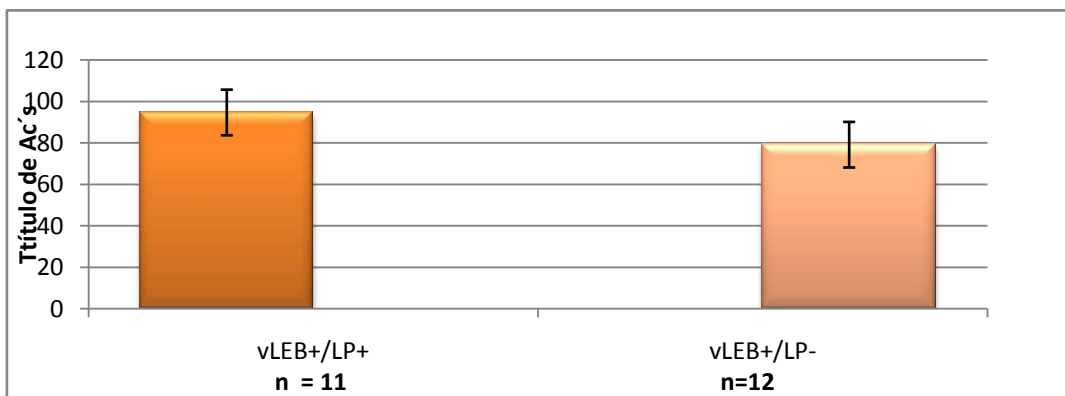


## 9. RESULTADOS

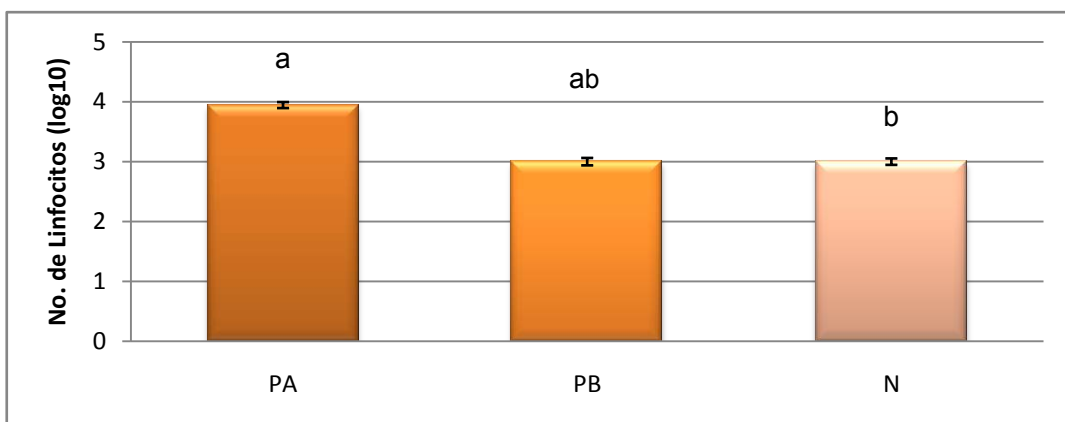
El análisis estadístico de los conteos linfocitarios por grupo experimental se muestra en la figura 3. Se observó una diferencia estadística significativa entre el grupo vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> y los grupos vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup> y vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup> (P=0.004). Se puede apreciar que los grupos negativos a LP fueron estadísticamente similares. Asimismo, los títulos de anticuerpos del grupo de vacas positivas al vLEB con LP fueron más altos que los del grupo infectado sin LP, pero este hallazgo no fue estadísticamente significativo (Figura 4). Sin embargo, los valores normalizados del conteo linfocitario mostraron una relación directamente proporcional con los títulos de anticuerpos. Los valores del conteo linfocitario fueron significativamente mayores en el grupo de vacas con altos títulos de anticuerpos (PA) en comparación con las vacas negativas. Por otro lado, el grupo de vacas con títulos bajos (PB) no fue significativamente diferente de los grupos referidos, mostrando valores intermedios (Figura 5).



**Figura 3.** Diferencia en los conteos linfocitarios entre los grupos, positivo a la infección por el vLEB y con un estatus de LP positivo (**vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup>**), positivo a la infección por el vLEB y con un estatus de LP negativo (**vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>**) y el negativo a la infección por el vLEB y con un estatus de LP negativo (**vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup>**). Literales diferentes entre grupos presentan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

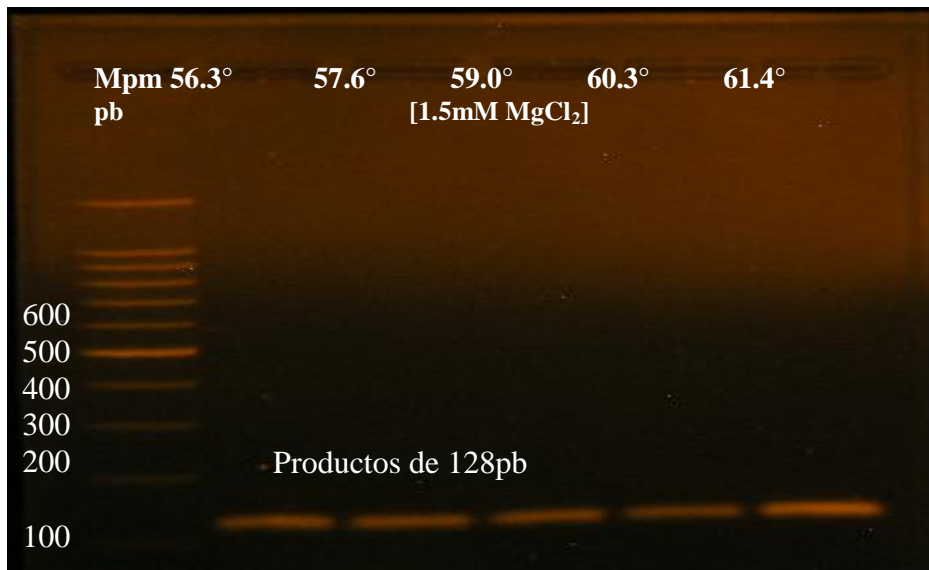


**Figura 4.** Promedios de títulos de anticuerpos frente al vLEB entre los grupos, positivo a la infección por el vLEB y con un estatus de LP positivo (**vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup>**), positivo a la infección por el vLEB y con un estatus de LP negativo (**vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>**).

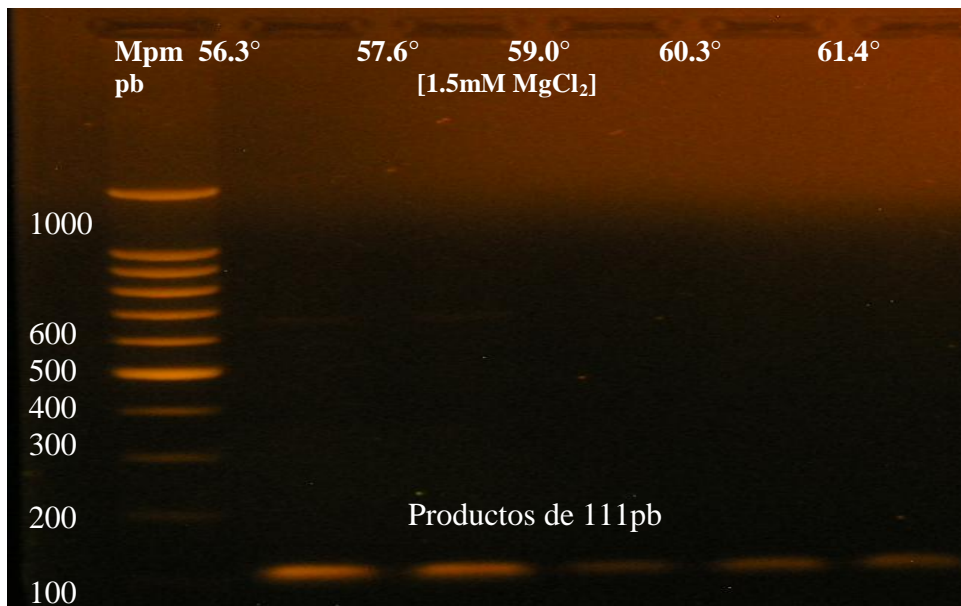


**Figura 5.** Diferencia en el conteo linfocitario entre los grupos, positivos a la infección por vLEB con título de anticuerpos alto (**PA**), positivos a la infección por vLEB con título de anticuerpos bajo (**PB**) y negativos a la infección por vLEB (**N**). Literales diferentes entre grupos presentan diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

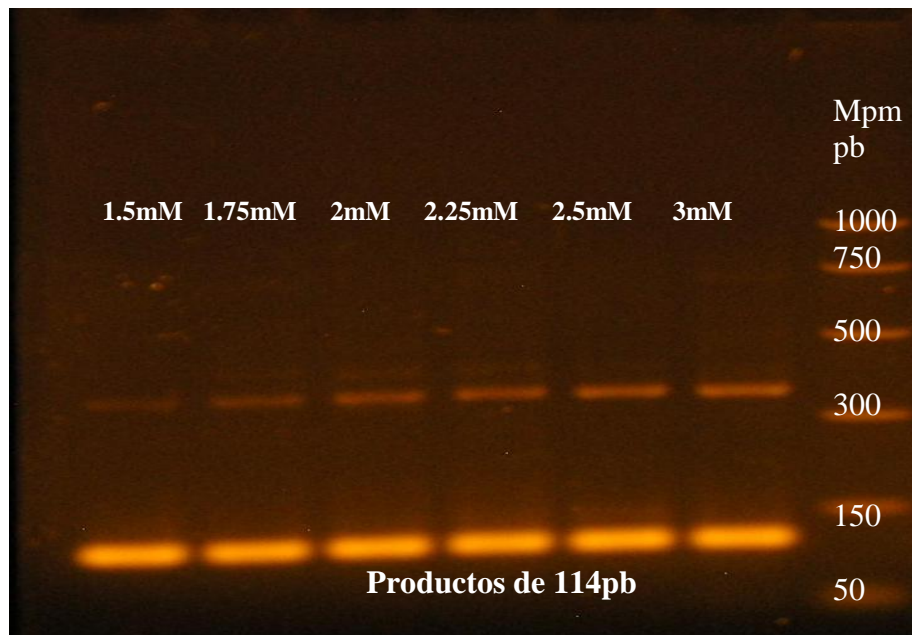
Con respecto a la cuantificación de citocinas, se establecieron la temperatura de alineación y concentración de  $MgCl_2$  e iniciadores por PCR punto final mediante gradiente de temperatura y curvas de concentración, respectivamente. En todas las temperaturas del gradiente, empleando concentración estándar de  $MgCl_2$  (1.5 mM), para la amplificación de IL-4, IL-10, IL-12 e IFN $\gamma$  se obtuvieron productos del tamaño esperado (128pb, 114pb, 111pb y 108pb, respectivamente). Las figuras 6 y 7 muestran el gradiente de temperatura empleado para IL-10 e IL-12 en el cual se aprecia que la temperatura ideal de alineación fue de 61°C y 56°C, respectivamente. Sin embargo, en la amplificación de IL-4 e IFN $\gamma$  se obtuvieron productos inespecíficos (dato no mostrado). Por tal motivo, se realizaron curvas de concentración de  $MgCl_2$ . Para la IL-4, la curva de concentración de  $MgCl_2$  reveló que la amplificación de productos inespecíficos se incrementaron conforme la concentración de  $MgCl_2$  fue mayor (Figura 8). Así mismo, se apreció una relación directamente proporcional en la curva de concentración de  $MgCl_2$  para la amplificación de IFN $\gamma$  (Figura 9). De este modo, en ambas citocinas no se eliminaron los productos inespecíficos en las diferentes concentraciones  $MgCl_2$  empleadas pero se amplificaron eficientemente productos de 114pb y 108pb, respectivamente. Por otro lado, la concentración óptima de iniciadores para las 4 citocinas fue de 25pM. Con base a los resultados de la PCR de punto final, y con el fin de obtener condiciones similares para la optimización de la qPCR, se eligieron los siguientes parámetros: temperatura de alineación de 61°C, concentración de  $MgCl_2$  de 1.5mM y una concentración de iniciadores de 25pM. Con base a las curvas de disociación se determinó que los productos amplificados por qPCR fueron específicos para cada citocina. En las figuras 10 y 11 se muestran la curva de amplificación y de disociación para IFN $\gamma$ , respectivamente, las cuales son representativas de las curvas obtenidas para las diferentes citocinas amplificadas por qPCR. Debido a la presencia de productos inespecíficos en la amplificación de IL-4 e IFN $\gamma$  por PCR punto final, se corroboraron productos amplificados por qPCR en gel de agarosa, observándose productos del tamaño esperado (114pb y 108pb, respectivamente). Con respecto a la expresión de citocinas, los valores de expresión del grupo no infectado ( $vLEB^-/LP^-$ ) fueron mayores en todas las citocinas, comparados con los valores de expresión de los grupos infectados (Figuras 12, 13, 14 y 15). Sin embargo, los valores sólo fueron estadísticamente significativos para IL-10 ( $P=0.042$ ) e IL-12 ( $P=0.011$ ) (Figuras 13 y 14, respectivamente).



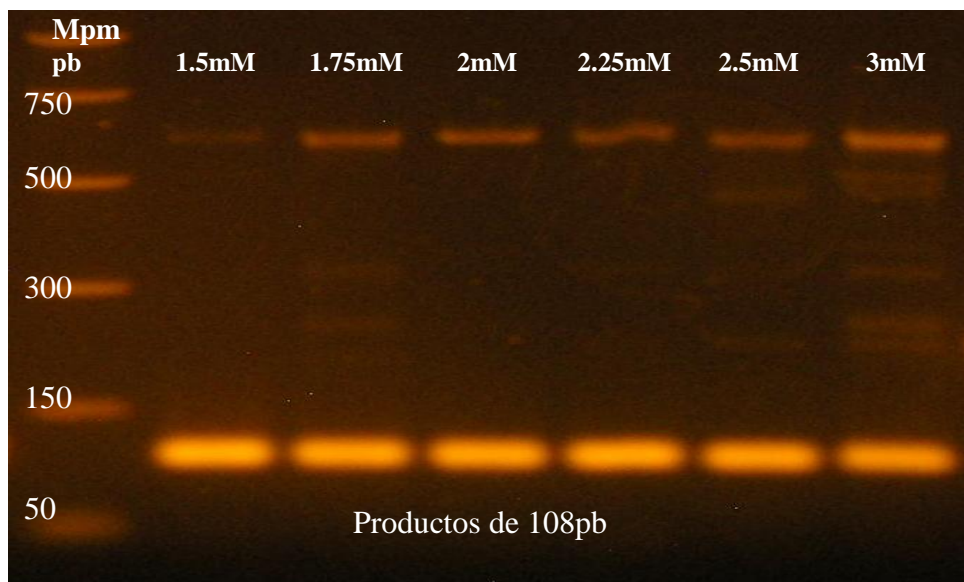
**Figura 6.** Gradientes de temperaturas de alineación para IL-10. Gel de agarosa al 1.5%. Mpm = marcador de peso molecular. pb = pares de bases.



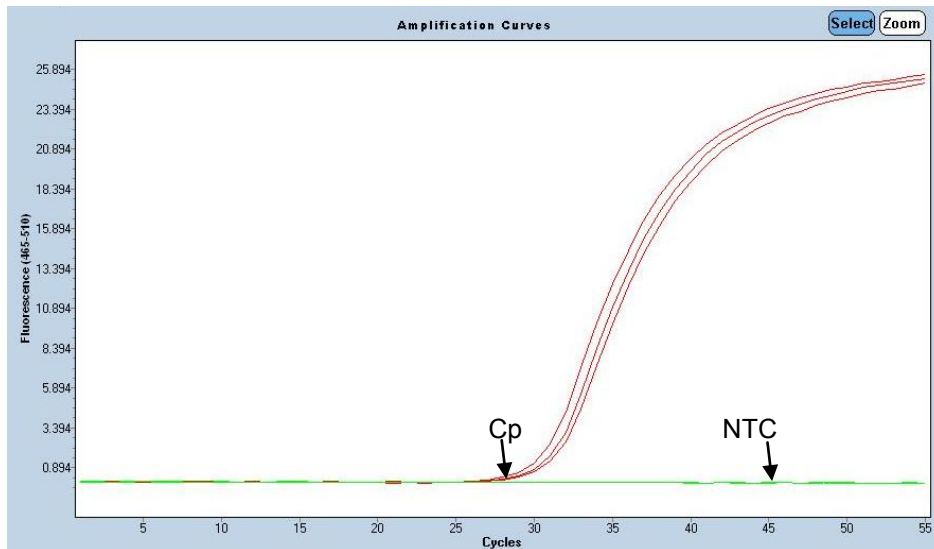
**Figura 7.** Gradientes de temperaturas de alineación para IL-12. Gel de agarosa al 1.5%. Mpm = marcador de peso molecular. pb = pares de bases.



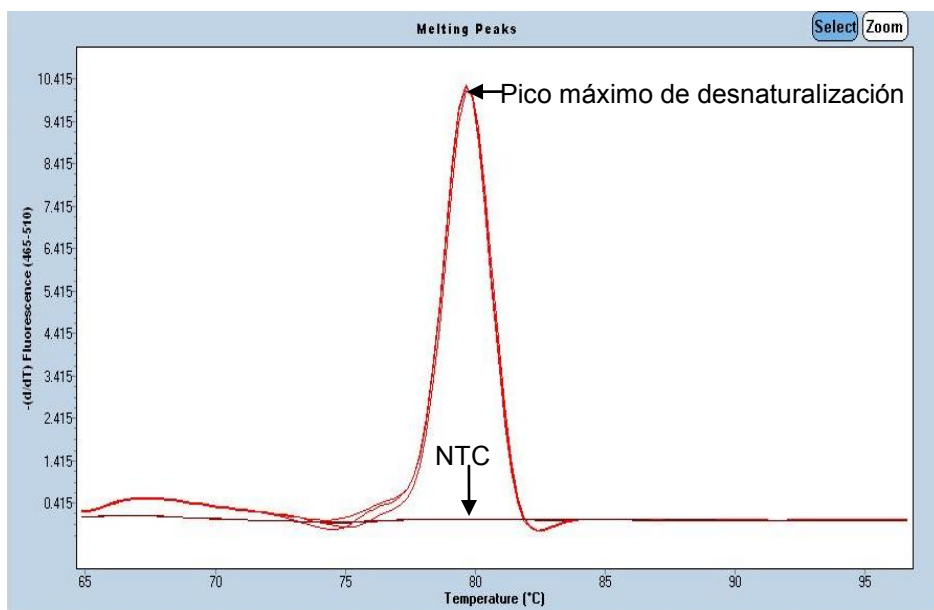
**Figura 8.** Curva de concentraciones de  $MgCl_2$  para IL-4, temperatura de alineación de  $61^\circ C$ . Gel de agarosa al 1.5%. Mpm = marcador de peso molecular. pb = pares de bases.



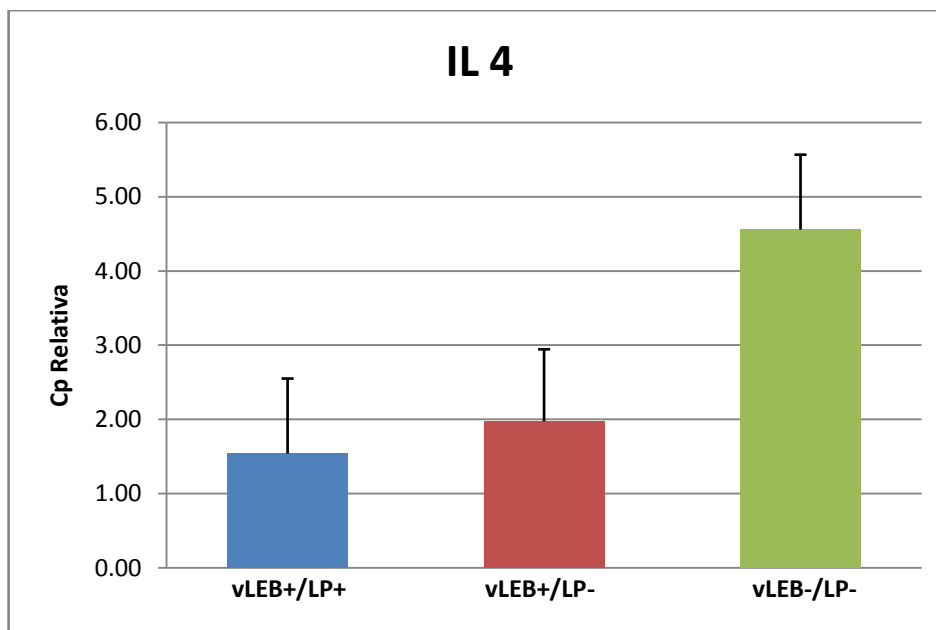
**Figura 9.** Curva de concentraciones de  $MgCl_2$  para INF- $\gamma$ , temperatura de alineación  $61^\circ C$ . Gel de agarosa al 1.5%. Mpm = marcador de peso molecular. pb = pares de bases.



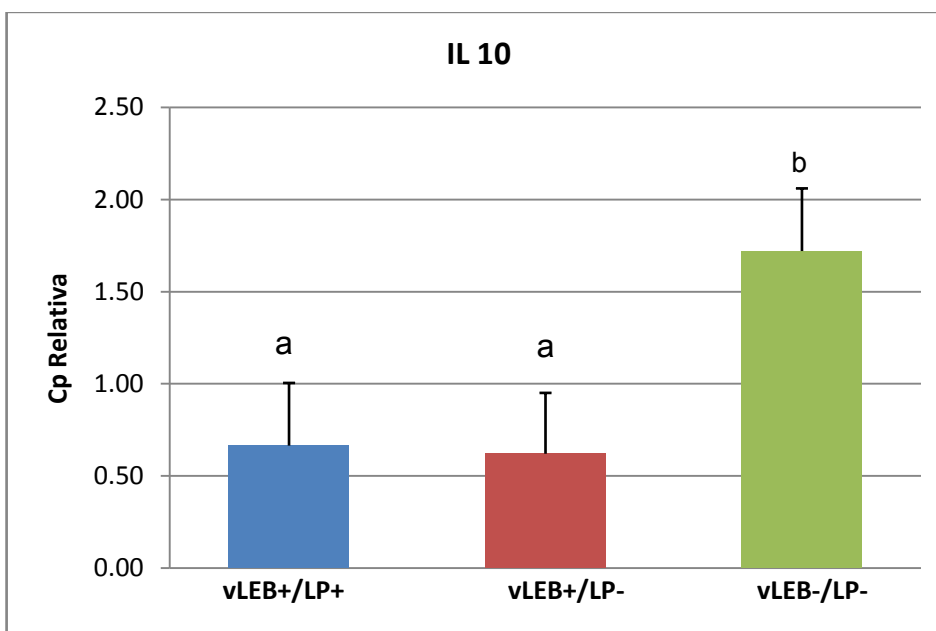
**Figura 10.** Curva de amplificación de INF $\gamma$  por qPCR. Se observan el Cp de la muestra y el NTC.



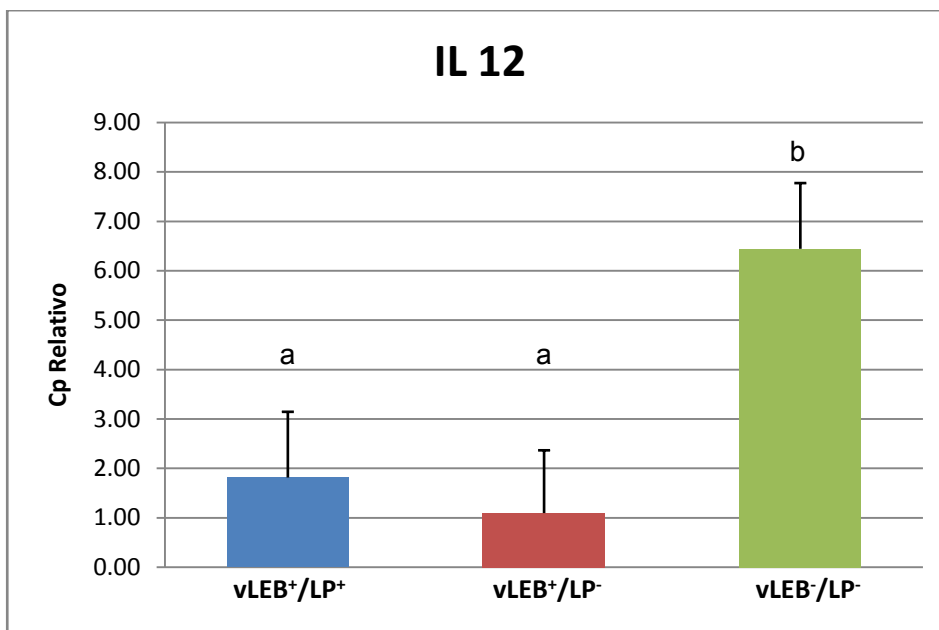
**Figura 11.** Curva de disociación del INF $\gamma$ . Se observa la curva de disociación para la evaluación de la especificidad de productos amplificados por qPCR de INF $\gamma$ .



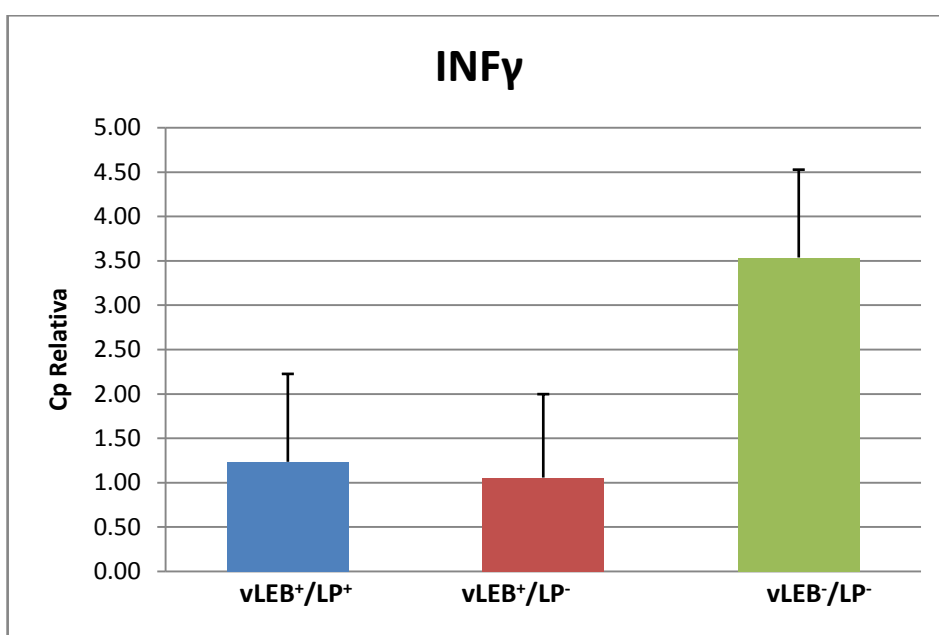
**Figura 12.** Determinación por qPCR de la expresión de la IL-4 con base a los 3 grupos: positivo a la infección por el vLEB y con LP ( $vLEB^+/LP^+/n=22$ ), positivo a la infección por el vLEB y sin LP ( $vLEB^+/LP^-/n=24$ ) y negativo a la infección por el vLEB y sin LP ( $vLEB^-/LP^-/n= 22$ ).



**Figura 13.** Determinación por qPCR de la expresión de IL-10 con base a los 3 grupos: positivo a la infección por el vLEB y con LP ( $vLEB^+/LP^+/n=22$ ), positivo a la infección por el vLEB y sin LP ( $vLEB^+/LP^-/n=24$ ) y negativo a la infección por el vLEB y sin LP ( $vLEB^-/LP^-/n= 22$ ). Literales diferentes señalan diferencia estadística significativa ( $P<0.05$ ).



**Figura 14.** Determinación por qPCR de la expresión de IL-12 con base a los 3 grupos: positivo a la infección por el vLEB y con LP (vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup>/n=22), positivo a la infección por el vLEB y sin LP (vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>/n=24) y negativo a la infección por el vLEB y sin LP (vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup>/n= 22). Literales diferentes señalan diferencia estadística significativa (P<0.05).



**Figura 15.** Determinación por qPCR de la expresión de INFγ con base a los 3 grupos: positiva a la infección por el vLEB y con LP (vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup>/n=22), positivo a la infección por el vLEB y sin LP (vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>/n=24) y negativo a la infección por el vLEB y sin LP (vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup>/n= 22).



## 10. DISCUSIÓN

En el estudio preliminar, la prevalencia de la infección por el vLEB del hato lechero al cual pertenecía el grupo experimental del presente estudio fue de 66%, con concordancia perfecta entre la serología por ELISA indirecta y qPCR. Asimismo, los conteos linfocitarios se realizaron durante 3 meses por lo que se comprobó la presencia de vacas infectadas con LP y de vacas infectadas que no desarrollaron LP a lo largo del experimento. Por otro lado, las vacas negativas a vLEB permanecieron sin infección a todo lo largo del experimento. Lo anterior fue sugestivo de la presencia de factores de resistencia tanto en las vacas infectadas por el vLEB sin LP como de las vacas no infectadas (Zavaleta *et al.*, 2009). De este modo, la conformación de los grupos experimentales con base los valores predeterminados del presente estudio fueron fuertemente representativos para la evaluación de los factores inmunes relacionados con el desarrollo de LP en vacas infectadas por el vLEB.

Con respecto a la inmunidad humoral, los títulos del grupo vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> fueron mayores que los del grupo vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup> pero no significativos estadísticamente. Sin embargo, se pudo establecer una relación estadísticamente significativa entre la respuesta humoral y los conteos linfocitarios misma que fue directamente proporcional (Figura 5). Los conteos linfocitarios significativamente mayores del grupo PA comparados con el de las vacas negativas es indicativo de una fuerte inducción de una respuesta humoral relacionado a la infección por el vLEB que tiene un efecto directo sobre el incremento de linfocitos circulantes. Lo anterior concuerda con los hallazgos de estudios previos. Los títulos altos de anticuerpos se relacionan con una alta carga viral (Jimba *et al.*, 2010) y los animales con una baja carga viral presentan bajo título de anticuerpos y conteo normal de linfocitos (Juliarena *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha determinado que la carga viral del vLEB presenta una fuerte correlación estadística con los conteos linfocitarios con valores de LP considerablemente mayores que los descritos por otros autores. Se postuló que lo anterior esté asociado a una mayor prevalencia de la enfermedad en el hato evaluado (Zavaleta *et al.*, 2009). Adicionalmente, se describe que la carga viral se incrementa significativamente en las vacas con LP<sup>+</sup> a diferencia de aquellas que son LP<sup>-</sup> y que la carga viral es marcadamente mayor en las vacas que desarrollan linfoma. Lo anterior indica que el incremento de la carga viral está asociado con la

severidad de la enfermedad (Aida *et al.*, 2013). Cabe señalar, que un aspecto importante de la población experimental de este estudio es que deriva de un hato de alta prevalencia. Por tal motivo, el hallazgo de que el grupo vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup> permaneciera consistentemente negativo durante el desarrollo del experimento señala que este grupo presenta rasgos de resistencia asociadas posiblemente una adecuada modulación de la respuesta inmune frente a la infección por vLEB.

Las células blanco para la infección por vLEB son los linfocitos B que expresan en su superficie IgM<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> y MHCII<sup>+</sup> (Gillet *et al.*, 2007) y que el desarrollo de LP es promovida por una expansión policlonal de linfocitos B CD5<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup> (Cantor *et al.*, 2001; Florins *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2003; Konnai *et al.*, 2005; Lavanya *et al.*, 2008). En un informe, la proporción de linfocitos B CD5<sup>+</sup> circulantes alcanzó hasta un 69% (Ungar-Waron *et al.*, 1997) y Hamilton *et al.*, (2003) describen un rango de 68-90%. Por otro lado, se ha descrito que la expresión del receptor del vLEB disminuye gradualmente durante la diferenciación de las células B en médula ósea. De este modo, los linfocitos B menos diferenciados son los que presentan más altos niveles de expresión de estos receptores (Lavanya *et al.*, 2008). Sin embargo, también se menciona que los linfocitos B y T necesitan ser estimulados para la expresión del receptor de vLEB (Stone *et al.*, 2000). Por tal motivo, la carga viral y la expansión policlonal de la población de linfocitos B están involucrados en la inducción de la secreción de anticuerpos frente a vLEB y respaldan fuertemente el hallazgo de altos títulos de anticuerpos en el grupo vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> ya que este grupo presentó también una alta carga viral (Zavaleta *et al.*, 2009). Ambos aspectos son fuertes indicadores de susceptibilidad puesto que contribuyen al desarrollo de LP y paradójicamente, reflejan una falla en la restricción de la infección por el vLEB debido a una promoción de la misma por parte del sistema inmune.

Con respecto a la respuesta inmune celular, los LT juegan un papel clave en la activación, proliferación y diferenciación de los LB normales, tanto por el contacto directo de célula a célula, así como por la secreción de citocinas (Trueblood *et al.*, 1998). En el caso de la LEB, se postula que los linfocitos B infectados por el vLEB funcionan como células accesorias y estimulan a los linfocitos T cooperadores (T<sub>h</sub>) para mejorar significativamente su secreción de IL-2 y a su vez, por efecto autocrino, expandir la activación de LT CD4<sup>+</sup> (Stone *et al.*, 2000). Así mismo, se describe que durante la LP, el incremento de la secreción de IL-2 por parte de los T<sub>h</sub> promueve la proliferación de linfocitos B y regula el incremento en la expresión del receptor de IL-

2 (IL-2R) en los linfocitos B, aumentando de este modo la expresión del vLEB en las células infectadas (Trueblood *et al.*, 1998). Por esta razón, la IL-2 a pesar de ser una citocina Th1 desempeña un papel promotor en el desarrollo de la LEB enfermedad pues a pesar de ser originalmente reconocida como un factor de crecimiento de células T, puede promover la proliferación de LB infectados por vLEB (Kabeya *et al.*, 2001). Por consenso, se reportan niveles elevados de secreción de IL-2 en vacas infectadas con o sin la presencia de LP (Gillet *et al.*, 2007; Isaacson *et al.*, 1998; Keefe *et al.*, 1997; Meirum *et al.*, 1997). Así mismo, la estimulación con IL-2 incrementó la proliferación celular, la expresión del IL-2R y la síntesis de la proteína CA del vLEB en LB aislados de vacas infectadas por el vLEB<sup>+</sup> con LP<sup>+</sup> (Gillet *et al.*, 2007). Todo lo anterior enfatiza la relevancia de la inducción de una respuesta inmune con la finalidad de promover la expansión de los LB IgM<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> en el curso de la infección por el vLEB.

La inmunidad mediada por células Th1 se considera que es efectiva en el control de la infección y la replicación de los retrovirus (Yakobson *et al.*, 2000). Sin embargo, durante la progresión de la infección por el vLEB que conduce al estatus de LP, se describe una reducción en la expresión de citocinas de Th1 y de citocina Th2 (Yakobson *et al.*, 2000, Amills *et al.*, 2002) mientras que la respuesta de Treg mediada por la expresión de IL-10 presenta ligeros a moderados incrementos en vacas infectadas (Pyeon *et al.*, 1996, Amills *et al.*, 2002) o se aprecia disminuida en vacas con LP<sup>+</sup> (Amills *et al.*, 2002). La expresión alta de IL-10 ha sido asociada con progresión de la enfermedad, particularmente en etapas avanzadas (Pyeon *et al.*, 1996).

La IL-12 promueve el desarrollo de respuestas Th1 que conducen a la producción de IFN $\gamma$  la cual induce la expresión de MHCII en la vía endocítica y es una de las citocinas clave en la erradicación de infecciones virales (Ploegh, 1998; Wolf *et al.*, 1994). En el presente estudio, se observó una mayor expresión de IL-12 en el grupo no infectado la cual fue estadísticamente diferente a la baja expresión que se apreció en los grupos infectados (vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> y vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>). Del mismo modo, se observó una mayor expresión de IFN $\gamma$ , en el grupo negativo en comparación con los grupos infectados, aunque dicho hallazgo no fue estadísticamente relevante. Ambos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura. Yakobson *et al.*, (1998) encontraron que en las primeras semanas de la enfermedad, la expresión de IL-12 era mayor que la de IL-10 mientras que en animales que desarrollaron LP la

expresión de ambas citocinas fue a la inversa, encontrándose una mayor expresión de IL-10. En otros estudios, también se reportan una menor expresión de IL-12 (Pyeon and Splitter, 1998) y una mayor expresión de IL-10 (Pyeon *et al.*, 1996) en vacas que desarrollan LP. Con respecto a la expresión de INF $\gamma$ , se reporta una menor expresión estadísticamente significativa en vacas infectadas con LP<sup>+</sup> comparado con la mayor expresión observada en vacas no infectadas. En el mismo estudio, las vacas infectadas negativas a LP presentaron valores intermedios los cuales no presentaron diferencia estadística con los otros grupos (Amills *et al.*, 2002). Del mismo modo, (Pyeon *et al.*, 1996) describen que la expresión de INF $\gamma$  fue menor en vacas con LP<sup>+</sup>. Se menciona que en la etapa inicial de la infección por el vLEB, la presencia de INF $\gamma$  contribuye a la disminución de la presencia de LP mientras que en el estadio de LP los valores de INF $\gamma$  declinan (Usui *et al.*, 2007; Yakobson *et al.*, 2000).

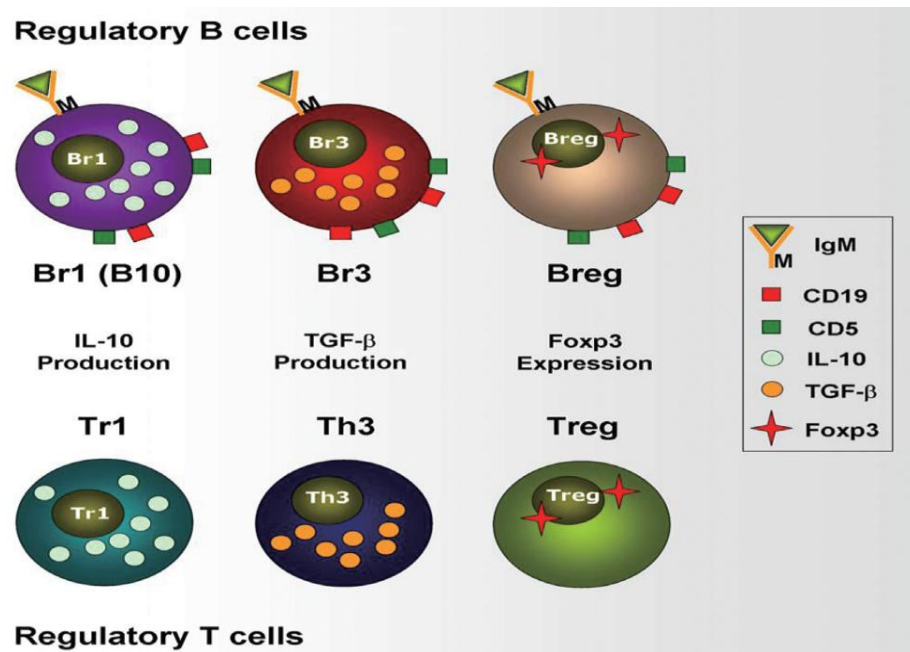
Por otro lado, en este estudio la expresión de IL-4, fue menor en los grupos infectados (vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> y vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>-</sup>) que en el grupo vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup>. A pesar de que este hallazgo no fue estadísticamente significativo concuerda con lo descrito por Amills, *et al.*, (2002) ya que también encontraron una menor expresión de IL-4 en los grupos infectados (ya sea LP<sup>+</sup> o LP<sup>-</sup>) frente a un grupo negativo a la infección por el vLEB. Por otro lado, en otro estudio no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de IL-4 (Konnai *et al.*, 2003).

Cabe señalar, que los resultados del presente estudio que no mostraron diferencias estadísticas significativas (INF $\gamma$  e IL-4) a pesar de estar acorde con la mayoría de estudios podrían corroborarse en experimentos de estimulación con mitógenos o citocinas específicas utilizando técnicas que han demostrado alta sensibilidad como la ELISPOT. En el caso de INF $\gamma$ , la estimulación de PBMC con ConA promovió una mayor expresión de INF $\gamma$  en vacas infectadas con el vLEB que las PBMC de vacas no infectadas (Trueblood *et al.*, 1998).

Con referencia a la IL-10, de manera similar a las demás citocinas, en este trabajo se encontró que la expresión fue mayor en el grupo vLEB<sup>-</sup>/LP<sup>-</sup> que en los grupos infectados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Este hallazgo no concuerda con lo descrito por Pyeon *et al.*, (1996) y Yakobson *et al.*, (2000), ya que ambos estudios reportan un incremento de la IL-10 en el grupo de animales infectados con LP<sup>+</sup>, pero coinciden parcialmente con los resultados de Amills *et al.*, (2002) en los que se reportan valores disminuidos estadísticamente

significativos de IL-10 en vacas infectadas con LP mientras que las vacas sin LP muestran valores elevados de esta citocina. Como se mencionó anteriormente, el incremento en la expresión de IL-10 se ha asociado con estadios tardíos de la infección (Pyeon *et al.*, 1996) por lo que la falta de consenso podría estar relacionada tanto con la progresión de la enfermedad en el momento del muestreo o con la severidad de la infección y/o prevalencia de la enfermedad en el hato afectado.

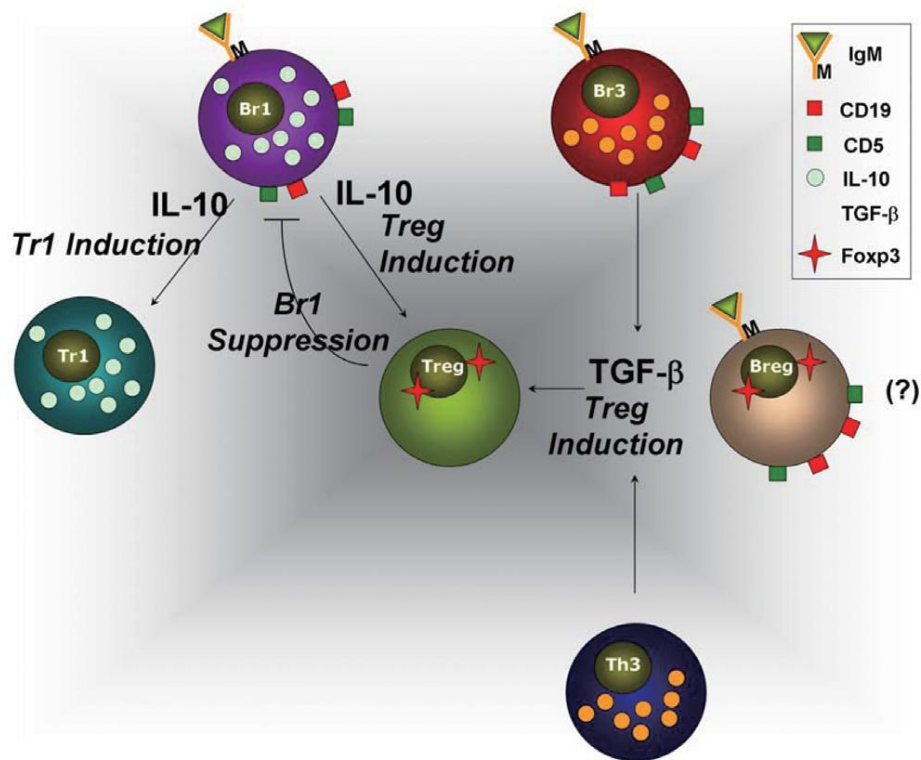
No obstante, los resultados del presente estudio en conjunto con los obtenidos por los diferentes autores son compatibles con una regulación de la respuesta mediada por las células Th que conduce a una inmunosupresión debida a una fuerte inhibición tanto de la respuesta Th1 como de la Th2. Lo anterior puede estar mediado por los LB infectados cuyo fenotipo IgM<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> es similar al descrito para los LB reguladores (Breg) las cuales regulan la diferenciación de LT reguladores (Treg) (Figura 16).



**Figura 16.** Células reguladoras B y T. Células Tr1, Th3, y T reguladoras (Treg) producen IL-10 y / o TGF-β, y expresan Foxp3. Las células B también producen IL-10, TGF-β, y Foxp3; éstas se denominan células Br1, Br3, y B reguladoras (Breg). Así, el sistema de células B parece ser una imagen de espejo del sistema de células T (Noh& Lee 2011).

Bajo este nuevo concepto, considerando la información recabada hasta el momento acerca de los efectos de la infección por el vLEB sobre el sistema inmune y que

conducen al desarrollo de linfoma, se propone que la expansión policlonal de LB  $IgM^+ CD5^+$  promueva un enriquecimiento de células Breg, potencialmente Br1 las cuales al secretar IL-10 inducen la diferenciación de Tr1 secretoras de IL-10, explicando los incrementos de esta citocina descritos en vacas infectadas con LP<sup>+</sup>. Probablemente, durante la progresión de la LEB y/o en enfermedad severa, las células Br1 inducen la diferenciación de Treg, retroalimentando negativamente la secreción de IL-10 (Noh& Lee 2011). Lo anterior conduce a la disminución de la IL-10 lo cual está acorde con los resultados del presente estudio y los decrementos descritos por Amills, *et al.*, (2002) en vacas con LP<sup>+</sup>. Por otro lado, la inducción de Treg puede estar mediada por TGF- $\beta$ , secretada a partir de células Br3 presentes por la expansión policlonal inducida por la infección por vLEB (Figura 17).



**Figura 17.** Papeles recíprocos de células B y T reguladoras. La IL-10 proveniente de células BR1 y Tr1 induce a las células Tr1 y Treg. TGF- $\beta$  producido por las células Th3 y Br3 induce a las células Treg, que luego actúan para suprimir células BR1 (Noh& Lee 2011)

Dicha hipótesis puede ser comprobada mediante estudios posteriores de marcaje y selección de LB y LT por citometría de flujo con la finalidad de determinar las subpoblaciones de Breg y Treg presentes en la infección por el vLEB.

Por otro lado, los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que las vacas del grupo no infectado presentan una inmunidad superior puesto que la expresión de las citocinas evaluadas fue mayor. Debido a que la IL-12 es primordial en la promoción de respuestas Th1 y el principal inductor de secreción de IFN $\gamma$  por células Th1 (Gately *et al.*, 1998) y que la presencia de IFN $\gamma$  es relevante en la resolución de la infección (Yakobson *et al.*, 2000), la alta expresión estadísticamente significativa de IL-12 observada en este grupo es compatible con la inducción de una considerable secreción de IFN $\gamma$ , a pesar de que en este estudio el alto nivel de expresión de esta citocina no haya sido significativo.

Uno de los principales factores de resistencia a la LEB descritos es la presencia de alelos del Complejo Principal de Histocompatibilidad bovino también conocido como BoLA (del inglés bovine leucocyte antigens), tomando como base la ausencia de LP (van Eijk, *et al.*, 1992; Xu, *et al.*, 1993, Gilliespie, 1999). Entre los genes más estudiados del BoLA se encuentra el gen BoLA-DRB3 para el que se han descrito alrededor de 100 alelos. La caracterización de los alelos del BoLA-DRB3 se basa en el análisis de la región de reconocimiento del antígeno, mostrando una correlación entre la presencia de ciertos alelos con resistencia a la LEB (Zanotti *et al.*, 1996). Forletti *et al.*, (2013) describe que animales infectados por el vELB con una baja carga viral y que presentan el alelo BoLA-DRB3.0902 no transmitieron la enfermedad de manera natural a animales libres de ella. El alto grado de polimorfismo observado en el locus del BoLA-DRB3.2 puede ayudar a la identificación de haplotipos de resistencia a LEB en la población experimental del presente estudio, ya que las moléculas del MHC clase II son responsables de las diferencias entre los individuos en la respuesta inmune a los agentes infecciosos (Behl *et al.*, 2007).

## 11. CONCLUSIONES

- La presencia de LP tiene una relación directamente proporcional con la presencia de títulos altos de anticuerpos en las vacas infectadas por vLEB.
- El grupo vLEB<sup>+</sup>/LP<sup>+</sup> presentó hallazgos sugestivos de una proliferación policlonal de LB ya que se observaron altos títulos de anticuerpos.
- Los grupos de vacas infectadas mostraron cambios compatibles con inmunosupresión debido a una baja expresión de citocinas.
- En conjunto, los resultados sugieren que la expansión policlonal de LB promuevan una supresión de la respuesta inmune, posiblemente por la presencia de células Breg.
- El grupo de vacas no infectadas presentó una mayor respuesta inmune con base a la expresión de citocinas, indicativo de una competencia inmune superior. En este grupo, los rasgos sugestivos de resistencia a la LEB pueden estar relacionados a una inducción de secreción de IFN $\gamma$  mediada por IL-12.
- El desarrollo de estudios posteriores de qPCR para la detección de alelos de resistencia en las vacas negativas del presente estudio pueden ser de gran utilidad.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima S. 2013. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology.Virol.* November, Volume4, Article 32.
- Andrews AH. 2004. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle.* 2º edi. Blackwell Science.
- Amills M, Ramiya V, Norimine J, Olmstead CA, Lewin HA. 2002. Reduced IL-2 and IL-4 mRNA Expression in CD4\_ T Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected Cows with Persistent Lymphocytosis. *Virology* 304, 1–9.
- Behl JD, Verma, NK, Behl R, Mukesh M, Ahlawat SPS. 2006. Characterization of genetic polymorphism of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (*Bosindicus*). *J. Dairy Sci.* 90:2997-3001.
- Batmaz H, Carli K. T, Kahraman M, Cetin C, Kennerman E. 1995. Serological and hematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey. *Vet Rec.* 136 (1): 42 – 44 p.
- Cantor GH, Pritchard SM, Dequiedt F, Willems L, Kettmann R, Davis WC. 2001. CD5 Is Dissociated from the B-Cell Receptor in B Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected, Persistently Lymphocytotic Cattle: Consequences to B-Cell Receptor-Mediated Apoptosis. *J. Virol.* Feb., p. 1689–1696 Vol. 75 No. 4
- Dargatz DA, Johnson R, Wells SJ, Koprak CA. 1998. Descriptive epidemiology of bovine leukosis virus in U.S. beef and dairy Cattle. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.* 102:120-123.
- Doménech A, Viana M, Gomez-Lucia E. 1999. Nuevas aportaciones al conocimiento de la patogenia por el virus de la leucosis enzoótica bovina. (BLV). *Vet Med;* 16 (1): 10-20 p.
- Dus Santos MJ, Trono K, Lager I, Wigdorovitz A. 2007. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet Microbiol.* 119; 10–18.
- Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. 1994. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *J VetMicrobiol;* 39: 313-321
- Felmer R, Zuñiga J, Recabal M. 2006. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.,* Vol. XXXVIII N° 2, pp. 137-141.

Florins A, Boxus M, Vandermeers F, Verlaeten O, Bouzar A, Defoiche J, Hubaux R, Burny A, Kettmann R, Willems L. 2008. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. *Vet. Immunol. and Immunopath.* 125: 1–7.

Forletti A, Juliarena MA, Ceriani C, Amadio AF, Esteban E, Gutiérrez SE. 2013. Identification of cattle carrying alleles associated with resistance and susceptibility to the Bovine Leukemia Virus progression by real-time PCR. *Research in Veterinary Science.* 95: 991–995.

Gately MK, Renzetti LM, Magramv J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. 1998. THE INTERLEUKIN-12/ INTERLEUKIN-12-RECEPTOR SYSTEM: Role in Normal and Pathologic Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:495–521.

Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar A, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 16 March; 4:18.

Gilliespie BE, Jayarao BM, Dowlen, HH, Oliver SP. 1999. Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Jersey Cows. *J Dairy Sci* 82:2049–2053.

González ET, Oliva GA, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray ME. 2001. Leucosis Enzoótica Bovina: Evaluación de Técnicas de Diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *ANALECTA VETERINARIA;* 21, 2: 12-20.

Gorodezky LC, Vázquez AA, Pérez VMF, García SD, Rodríguez UD, Lligüín LIG, Vega RM. 2008. Manual de procedimientos serológicos y celulares de inmunogenética, Departamento de inmunología e inmunogenética del InDRE, Secretaría de Salud.

Hamilton VT, Stone DM, Cantor GH. 2003. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology.* 315: 135–147.

Hernández BJ, López PR, Zavaleta HJN, Fausto RE, García OC. 2006. Leucosis enzoótica bovina: diagnóstico de laboratorio y su repercusión reproductiva en vacas Holstein–Friesian. *Memorias del 30 ° Congreso Nacional de Buiatría, organizado por la AMMVEB del 10 al 12 de Agosto de 2006 en Acapulco Guerrero, México.*

Heenemann K, Lapp S, Teifke JP, Fichtner D, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW.

2012. Development of a *Bovine leukemia virus* polymerase gene–based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene–based assay. J VET Diagn Invest 23 May.

Higuchi M, Nagasawa K, Horiuchi T, Oike M, Ito Y, Yasukawa M, Niho Y. 1997. Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation--characterization of membrane TNF-alpha. Clin. Immunol. Immunopathol. Feb;82(2):133-40.

Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K. 2011. Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses in vitro via PD-L1. Veterinary Research.42:103.

Isaacson JA, Flaming KP, Roth JA. 1998. Increased MHC Class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus. Vet. Immunology and Immunopathology. 64: 235±248.

Jimba M, Takeshima S, Matoba K, Endoh D, Aida Y. 2010. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. Retrovirology, 7:91.

Johnson R, Kaneene JB, Anderson S M. 1987. Bovine leukemia virus: duration of BLV calostrical antibodies in calves from commercial dairy herds. PrevVetMed. 4: 371 – 376 p.

Juliarena MA, Gutierrez SE, Ceriani C. 2007. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. Am J Vet Res 68:1220-1225.

Juliarena MA, Poli M, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodríguez EM, Mariño B, Rodríguez-Dubra C, Esteban EN. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. J Animal Genetics 39:432-438.

Juliarena MA, Poli M, Ceriani C, Sala L, Rodríguez E, Gutierrez S, Dolcini G, Odeon A, Esteban EN. 2009. Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. J Dairy Sci. 92:375-381.

Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. 2001. Host immune response in the course of bovine leukemia virus infection. J. Vet. Med. Sci. 63(7):703-708.

Kahrs RF. 2001. Viral Diseases of Cattle. Iowa State University Press. 2a. Edition.

Keefe RG, Choi Y, Ferrick DA, Stott JL. 1997. Bovine cytokine expression during different phases of bovine leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* May;56(1-2):39-51.

Klintevall K, Ballagi-PordS A, Näslund K, Belák S. 1994. Bovine leukaemia virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 42: 191-204.

Klintevall K, Fuxler L, Fossum C. 1997. Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves. *ComplimmunMicrobiolInfectDis.* 20 (2): 119 – 130 p.

Koch F, Stanzi U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Shuler G. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: Upregulation via MHC class II and CD40 molecules and down regulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184, 741±746.

Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. 2003. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet. Micro.* 94; 283-294.

Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M. 2005. Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. *Virology* 339: 239 – 248.

Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M. 2006. Tumor necrosis factor-alpha up-regulation in spontaneously proliferating cells derived from bovine leukemia virus-infected cattle. *Arch Virol.* 151: 347–360.

Kuzmak J, Kozaczynska B, Bicka L. 1999. Diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in newborn calves by use of PCR. *Bull Vet Inst Pulawy* 43: 125.

Lassauzet ML, Johnson WO, Thurmond MC, Picanso JP. 1990. Factors associated with decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus. *Prev Vet Med.* 9: 45 – 58 p.

Lavanya M, Kinet S, Montel-Hagen A, Mongellaz C, Battini JL, Sitbon M, Taylor N. 2008. Cell Surface Expression of the Bovine Leukemia Virus-Binding receptor on B and T Lymphocytes Is Induced by Receptor Engagement. *J Immunol.* 181:891-898.

Mateos, PA. 2005. Nueva lista de enfermedades de la OIE y Sistema Internacional de Notificación de Enfermedades. *Memorias de las 1as Jornadas Bovinas.* Noviembre 24 y 25; México, D.F. DUADDEC. FMVZ.UNAM.129-133.

Mauri C, Bosma A. 2012. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 30: 221-241.

Meirom R, Moss S, Brenner J, Heller D, Trainin Z. 1997. Levels and role of cytokines in bovine leukemia virus (BLV) infection. *Leukemia*. Apr;11 Suppl 3:219-20.

Motton DD, Buehring GC. 2003. Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. *Journal Dairy Science* 86:2826-2838.

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. 1999. The IL-4 receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annu. Rev. Immunol.* 17:701–38.

Noh G & Lee JH. 2011. Regulatory B Cells and Allergic Diseases. *Allergy Asthma Immunol Res.* 3(3):168-177.

OIE 2004. *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. Capítulo 2.3.4. – Leucosis bovina enzoótica.  
[http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.3.04\\_Leucosis\\_bovina.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.04_Leucosis_bovina.pdf)

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. 2011. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29:71–109.

Panei CJ, Takeshima SN, Omori T, Nunoya T, Davis WC, Ishizaki H. 2013. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Vet. Res.* 9:95.

Pawling BR. Revisión bibliográfica, de la red y recopilación de imágenes en video de la enfermedad “Leucosis Enzoótica Bovina”. Tesis de Licenciatura. 2002 UNAM, FESC.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22:929–79.

Ploegh HL. 1998. Viral strategies of immune invasion. *Science.* 280:248±53.

Pyeon D, O'Reilly K, Splitter GA. 1996. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *J. Virol.* 70, 5706±5710.

Pyeon D & Splitter GA. 1998. Interleukin-12 p40 mRNA Expression in Bovine Leukemia Virus-Infected Animals: Increase in A lymphocytosis but Decrease in Persistent Lymphocytosis. *J. OF VIRO.* Aug. p. 6917–6921 Vol. 72, No. 8.

Promega™. 2006. Improm-II Reverse Transcriptase. Promega Corporation. WI USA.

Radostits, OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. *Medicina Veterinaria. Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.* Vol. I. 9ª ed. Ed. McGraw Hill.

- Rebhun WC. 1999. Enfermedades del ganado vacuno lechero. 1ª edición. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp 626-635.
- Ross, RF. 2003. Producción Pecuaria en Confinamiento y la Salud de los Animales, el Consumidor y el Ambiente. Resúmenes del Simposio Internacional "Fronteras de la Medicina Veterinaria". FMVZ. UNAM. Impartido en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del 14 al 16 de Agosto de 2003; pp 44–59.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. 2003. Molecular Mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21:713–58.
- Sahagún RA. 2010. Inmunología Veterinaria. Ed. Manual Moderno Capítulo 12; p.p. 134-135.
- Sentsui H, Murakami K, Inoshima Y, Yokoyama T, Inumaru S. 2001. Anti-viral effect of recombinant bovine interferon  $\gamma$  on bovine leukaemia virus. *Cytokine* 16, 227–231.
- Stone DM, Norton LK, Chambers JC, Meek WJ. 2000. CD4 T Lymphocyte Activation in BLV-Induced Persistent B Lymphocytosis in Cattle. *Clinical Immunology*. Vol. 96, No. 3, September, pp. 280–288.
- Trinchieri G. 1995. Interleukin-12: A pro-inflammatory cytokine with immune regulatory functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity. *Ann. Rev. Immunol.* 13, 251±276.
- Ungar-Waron H, Paz R, Brenner J, Trainin Z. 1997. Effect of permeabilization on peripheral blood lymphocytes of bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* May;56(3-4):339-43.
- Usui T, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2007. Interferon-g expression associated with suppression of bovine leukemia virus at the early phase of infection in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115. 17–23.
- Van Der Maaten MJ, Miller JM. 1990. Bovine leukosis virus. In *Infectious Diseases of Ruminants*, edited by Z Dinter, B Morein. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers; pp. 419-429.
- Van Eijk, MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin A. 1992. Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.* 23:483-496.
- Van Regenmortel V, Fauquet CM, Carstens E, Estes M, Pringle C, Wickner R. 2000. Virus taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Academic Press, E.U. App 369-380.
- VMRD 2009. BOVINE LEUKEMIA VIRUS ANTIBODY TEST KIT Assay instructions for catalog numbers.

- Wang J, Boyer D, Ugen K, Srikantan V, Ayyavoo V, Agadjanyan M, Williams W, Newman M, Coney L, Carrano R, Weiner DB. 1995. Nucleic-acid based immunization against HIV-1: induction of protective in vivo immune responses. *AIDS*; 9 (Suppl. AI 5159).
- Wolf SF, Sieburth D, Sypek J. 1994. Interleukin 12: A key modulator of immune function. *Stem Cells*.12: 154- 168.
- Xu A, van Eijk, MJT, Park C, Lewin HA. 1993. Polymorphism in *BOLA-DRB3* Exon 2 Correlates with Resistance to Persistent Lymphocytosis Caused by Bovine Leukemia Virus. *J Immunol*. 153(12):6977-6985.
- Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z. 2000. Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*. 23; 197±208.
- YeonChoi K, Monke D, Stott JL. 2002. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *J Vet Diagn Invest* 2002 14:403–406.
- Zavaleta JNH. 2009. “Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB). FES-Cuautitlán, UNAM.
- Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, Russo S, Lewin HA, van Eijk MJ. 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet*; 27 (5): 337-34.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE. 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol*. 28:445–89.