



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Evaluación de la respuesta inmune celular y su relación con el desarrollo de linfocitosis persistente en vacas infectadas por el virus de la leucosis bovina (BLV).”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA
DIANA MICHELE ARAIZA HERNÁNDEZ

Directora de tesis:
Dr. Lucía Angélica García Camacho
FES Cuautitlán

Comité tutor:
Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira
FES Cuautitlán
Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva
Facultad de medicina verinaria y zootecnia



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.

RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un *Deltaretrovirus* que infecta naturalmente ganado bovino, promoviendo linfocitosis persistente (LP) la que se considera un rasgo de susceptibilidad a la leucosis enzoótica bovina (LEB). La LP presenta correlación positiva con la carga proviral del BLV. Con el fin de determinar la relación de la respuesta inmune celular con la presencia de LP y la carga proviral de BLV, se tomaron muestras de sangre de vacas procedentes de un complejo de producción láctea con alta prevalencia de BLV para seleccionar 30 animales BLV⁻ y 31 BLV⁺ y realizar 3 muestreos mensuales de sangre en las vacas seleccionadas. Las muestras se utilizaron para la determinación del leucograma, la carga proviral de BLV y la expresión de IL-12, IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10, y TGF- β mediante procedimientos de hematología convencional y PCR cuantitativa. Se observó que hubo un incremento en la prevalencia del BLV y una relación positiva entre la carga proviral y el conteo linfocitario. Así mismo, se apreció una disminución significativa en la expresión de IL-12, IFN- γ , IL-2 e IL-4 así como un incremento significativo de IL-10 en vacas infectadas con LP y alta carga proviral mientras que las vacas infectadas con baja carga proviral y negativas a LP y BLV, presentaron un perfil inverso de dichas citocinas. Los hallazgos indican una marcada inhibición de las respuestas T_{H1} y T_{H2} mediada por incremento de IL-10 probablemente por parte de células reguladoras secretoras de IL-10 (Tr1 o Br1), indicativo de inmunosupresión en vacas LP⁺ y con alta carga proviral y una adecuada respuesta inmune en animales infectados sin LP y baja carga proviral, así como negativos a BLV lo que puede representar rasgos de resistencia a la enfermedad. Debido a que la LP constituye una expansión policlonal de linfocitos B IgM⁺ CD5⁺ cuyo fenotipo es similar al de las células B reguladoras, se propone que la LP promueve un enriquecimiento de células Br1 secretoras de IL-10 lo que contribuye a la inhibición de las respuestas T_{H1} y T_{H2}, conduciendo a inmunosupresión.

Palabras clave: BLV, linfocitosis persistente, carga viral, citocinas.

ABSTRACT

Bovine leukosis virus (BLV) is a *Deltaretrovirus* that naturally infects cattle, promoting persistent lymphocytosis (PL) which is considered a susceptibility trait to bovine enzootic leukosis. LP has positive correlation to viral load of BLV. In order to determine the relationship of the cellular immune response with the observation of PL and proviral BLV load, blood samples of cows from a high BLV prevalence dairy farm in order to select 30 BLV- and 31 BLV+ animals and to perform 3 monthly blood samplings in selected animals. The samples were used in the determination of the leukogram, the BLV proviral load and the expression of IL-12, IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-10, and TGF- β through conventional hematologic procedures and quantitative PCR. It was found an increase of BLV prevalence and a positive relationship of the proviral load and the lymphocyte count were found. Moreover, it was observed a significant decrease in the expression of IL-12, IFN- γ , IL-2, and IL-4 as well as a significant increase of IL-10 in the infected cows with PL and high proviral load while the infected cows with low proviral load and negative to LP and BLV showed an opposite cytokine profile. These findings indicate a marked IL-10-mediated inhibition of the T_H1 and T_H2 responses by IL-10 probably through secreting regulatory cells (Tr1 and Br1), causing immune suppression in cows with PL and high proviral load and an appropriate immune response in infected animals with low proviral load and negative to PL which can portray a resistant trait to the disease. Since PL is a polyclonal expansion of IgM+ CD5+ B lymphocytes whose phenotype is similar to regulation cells, it is proposed that PL promotes an enrichment of Br1 IL-10 secreting Br1 cells that contributes to inhibition of T_H1 and T_H2 , leading to immune suppression.

Key words: BLV, persistent lymphocytosis, viral load, cytokines

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	1
Abstract	2
Lista de figuras y tablas	4
Abreviaturas	5
Introducción	
1. Antecedentes históricos	7
2. Leucosis enzoótica bovina	7
2.1 Etiología	10
2.2 Ciclo replicativo	12
2.3 Prevalencia	13
2.4 Diagnóstico	13
3. Aspectos inmunológicos generales	14
3.1 Respuesta T _H 1	15
3.2 Respuesta T _H 2	16
3.3 Respuesta Treg	17
3.4 Respuesta Breg	18
4. Aspectos inmunológicos de la LEB	19
5. Impacto económico	20
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	22
Metodología	
1. Diseño experimental	23
2. PCR punto final	23
3. Hematología	24
4. Separación de PBMC y estimulación de células	24
5. Extracción de ADN	25
6. Extracción de ARN	25
7. Retrotranscripción	26
8. Iniciadores	26
9. PCR cuantitativa (qPCR)	27
10. Método de cuantificación	27
11. Análisis estadístico	28
Resultados	30
Discusión	46
Conclusiones	52
Referencias	53

LISTA FIGURAS Y TABLAS

Figura	Página
1. Representación de la partícula de BLV.	13
2. Estatus de BLV por PCR.	31
3. Estandarización de qPCR. A. Curva de templados TGF- β , TNF- α e IL-2. B. Curva de disociación de IL-2.	32
4. Carga proviral. A. Relación con el estatus de LP. B. Conteo linfocitario con relación a la carga proviral.	34
5. Expresión de IL-12. A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral.	36
6. Expresión de IFN- γ . A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral.	37
7. Expresión de IL-2. A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral.	39
8. Expresión de TNF- α . A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral.	40
9. Expresión de IL-4. A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral.	42
10. Expresión de IL-10. A. Relación con LP. B. Relación con la carga proviral.	43
11. Expresión de TGF- β . A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral.	44

Tabla	Página
1. Iniciadores de nuevo diseño.	31

ABREVIATURAS

°C Grados centígrados.	LP Linfocitosis persistente.
µl Microlitros.	LPS Lipopolisacáridos.
ADN Ácido desoxirribonucleico.	LT Linfocito T.
ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario.	LT _{H1} Linfocito T _{H1} .
AGID Inmunodifusión en gel de agar.	LT _{H2} Linfocito T _{H2} .
APC Células presentadoras de antígeno profesionales.	LTreg Linfocito T regulador.
ARN Ácido ribonucleico.	MA Matriz.
BLV Virus de la leucosis bovina.	MgCl ₂ Cloruro de magnesio.
CA Cápside.	MHC-II Complejo mayor de histocompatibilidad dos.
CAIT Centro agropecuario e industrial de Tizayuca.	min Minuto.
cbp Cuanto baste para.	ml Mililitros.
dNTP Deoxinucleótidos.	mM Milimolar.
<i>E.coli. Escherichia coli.</i>	NC Nucleocápside.
ELISA Inmunoensayo ligado a enzimas.	NK Célula asesina natural.
env Envoltura.	nm Nanómetros.
HPRT Hipoxantín-guanín-fosforiltransferasa.	pb Pares de bases.
HTLVs Virus T-linfotrópico humano.	PBMC Células mononucleares de sangre periférica.
IFN-γ Interferón gamma.	PBS Buffer fosfato salino.
IL- Interleucina	PCR Reacción en cadena de la polimerasa.
IN Integrasa.	pm Peso molecular.
LB Linfocito B.	pmol Picomolar
LBreg Linfocito B regulador.	qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
LEB Leucosis enzoótica bovina.	rpm Revoluciones por minuto.
	RT Transcriptasa reversa.

seg Segundos.

STLVs Virus T-linfotrópico del simio.

SU Superficie.

TGF- β Factor de crecimiento
transformante beta.

TNF- α Factor de necrosis tumoral
alfa.

U Unidades.

ug Microgramos.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes históricos

La definición primaria de “Leucosis” se refiere a una proliferación maligna del tejido linfoide o productor de linfocitos (Gatti, 2007). El primer caso notificado de leucemia bovina se describió en 1871 en Lituania, en el área de Klaipeda, se observó a un bovino con hiperplasia superficial de linfonodo y esplenomegalia, la enfermedad se propagó hacia el oeste y finalmente llegó a los EE. UU (Burny *et al.*, 1980), los demás países de América probablemente la han adquirido a través de importaciones para la mejora de rebaños (Johnson *et al.*, 1992). En 1976 Kettmann *et. al.*, mostraron que las partículas del virus de leucosis bovina (BLV, por sus siglas en inglés) son virus exógenos de ARN que portan un complejo de ARN con transcriptasa reversa. Este hallazgo permitió la clasificación de BLV entre los retrovirus oncogénicos. Hoy en día, el BLV, es miembro de la familia *Retroviridae* (Cotmore *et al.*, 2019).

2. Leucosis enzoótica bovina

El BLV infecta naturalmente al ganado bovino, pero, también puede transmitirse experimentalmente a ovejas, cabras o alpacas (Rodríguez *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2012). *In vitro*, es posible infectar experimentalmente cultivos celulares en monocapa provenientes de diversas especies: humano, mono, rhesus, chimpancé, canino, murciélagos, conejos y pollos (Graves *et al.*, 1976, Gillet *et al.*, 2007). En los bovinos, se reconocen tres formas clínicas de la leucosis enzoótica bovina (LEB): a) Asintomática, b) Linfocitosis persistente (LP), caracterizada por una expansión policlonal no maligna de células B CD5+ y c) Linfoma (Kettmann *et al.*, 1994, Llames *et al.*, 2001).

La manifestación clínica más frecuente es la LP, que se presenta en aproximadamente un tercio de los animales afectados (Gillet *et al.*, 2007, Lairmore,

2014). En una minoría de casos (alrededor de 5-10%), la infección por el BLV puede progresar a linfoma. Es importante destacar que para el progreso hacia linfoma no es indispensable presentar previamente una etapa de LP (Burny *et al.*, 1988, Kettmann *et al.*, 1994, Llamas *et al.*, 2001); sin embargo, en la mayoría de los casos el desarrollo de LP está presente por lo que es considerado un rasgo de susceptibilidad a la LEB. El desarrollo de signos clínicos en el ganado bovino depende de los órganos afectados por el linfoma y la muerte es casi siempre súbita o a las pocas semanas o meses después de la aparición de los signos clínicos (OIE, 2012, Bartlett *et al.*, 2013). El BLV típicamente persiste en menos del 1% de las células sanguíneas periféricas, dando lugar a una infección asintomática en la mayoría de los animales infectados.

La LP ha sido definida como un incremento en el número absoluto de linfocitos circulantes de tres o más desviaciones estándar sobre la media normal (1,700 a 7,500/ μ l) mismos que deben persistir por más de tres meses (ISCAH, 1985). Se estima que la proporción de animales infectados que desarrolla LP es del 30% (Ferrer *et al.*, 1978, Hamilton *et al.*, 2003). El incremento en el conteo de linfocitos corresponde a un aumento en los linfocitos B que expresan en su superficie CD5+, IgM+, CD11b+ y MHCII+ (Beyer *et al.*, 2002, Gillet *et al.*, 2007). Se describe que aproximadamente un cuarto a un tercio de estos linfocitos se encuentra infectado por el BLV (Ferrer *et al.*, 1978). La mayor parte de las células involucradas son morfológicamente linfocitos normales, aunque el hallazgo de células atípicas es frecuente y por tal motivo se ha considerado como indicativo de un estado pre-leucémico. Por otro lado, los bovinos que presentan LP se consideran más eficientes en la transmisión del BLV ya que tienen un alto porcentaje de linfocitos infectados en sangre periférica, de igual manera tiene mayor número de copias províricas (Esteban *et al.*, 1985, Mirsky *et al.*, 1998).

En el comienzo del período de cronicidad de la enfermedad el genoma de la célula huésped presenta modificaciones genéticas: hiperdiploidía, pequeños cromosomas adicionales, trisomías, traslocaciones y reacomodamientos isocromáticos (Kettmann *et al.*, 1982, Dequiedt *et al.*, 1997). El perfil genético del genoma del huésped predispone el desarrollo de los tumores mismos que se producen a causa de la infiltración de linfocitos B transformados que se acumulan en tejidos tales como hígado, corazón, ojos, piel, pulmones y linfonodos (Gillet *et al.*, 2007).

El contagio se da por traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano. La transmisión puede ser horizontal (de animal a animal) o vertical (de madre a hijo). En las secreciones y fluidos biológicos como leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen y orina se pueden llegar a encontrar linfocitos infectados, siendo estos fluidos una fuente de contagio. No obstante, la mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran en la sangre, por lo tanto, cualquier medida de manejo o práctica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, tatuaje; etc, que se practique sin tomar medidas higiénicas correspondientes, son una importante forma de diseminación iatrogénica de la enfermedad. Los artrópodos hematófagos como tábanos y mosquitos podrían ser otra vía de transmisión (Gatti, 2007, Gillet *et al.*, 2007).

Los signos de la enfermedad pueden incluir tumores en los tejidos linfoides, aumento en los linfonodos, pérdida de peso, disminución de la producción de leche, fiebre, pérdida de apetito, miembros traseros con debilidad o parálisis, globos oculares sobresalientes, obstrucciones gastrointestinales y aumento de recuentos de linfocitos sanguíneos (CDC, 2008).

Por otro lado, la infección por el BLV presenta una correlación positiva con la incidencia de mastitis, gastroenteritis y bronquitis (Emanuelson *et al.*, 1992). Así mismo, se ha observado que vacas positivas al virus exhiben un retraso en la eliminación de la infección por dermatofitos (Trainin *et al.*, 1996) y una reducción en

los títulos de anticuerpos IgG2 en respuesta a la vacuna J5 contra la mastitis producida por *E.coli* en vacas infectadas por el BLV (Erskine *et al.*, 2011).

Se han realizado diversos estudios para determinar si el BLV causa enfermedades en los humanos, sobre todo por el consumo de leche de vacas infectadas, y se ha observado una correlación positiva (Perzova *et al.*, 2000, Burmeister *et al.*, 2007). Sin embargo, aún se desconoce como el BLV infecta a los humanos. En Estados Unidos, en la región del este se ha encontrado el ADN del BLV en el 44% (97/218) del tejido mamario de mujeres (Buehring *et al.*, 2014), en Texas 34% (73/214) (Baltzell *et al.*, 2018). La detección del BLV en tejidos mamarios fue significativamente más frecuente en pacientes con cáncer de mama que en mujeres sin antecedentes de este mismo cáncer por lo que se estableció una relación con la presentación de esta neoplasia (Buehring *et al.*, 2015). En Australia, el BLV fue detectado en células epiteliales mamarias mediante hibridación *in situ* en 61.5% (56/96) de mujeres con cáncer. Así mismo, 14 mujeres fueron positivas al BLV mediante extracción y secuenciación de ADN a partir de biopsias quirúrgicas fijadas en formalina e incluidas en parafina (Buehring *et al.*, 2017). En Colombia, se han detectado segmentos del genoma de BLV en 41% (43/195) del tejido mamario en mujeres (Giovanna *et al.*, 2013). Estos resultados abren de nuevo el debate sobre la posible relación de BLV y el cáncer de mama. Por otro lado, BLV también se ha detectado en 80% (8/10) de los casos de carcinoma de células escamosas pulmonar, basado en una prueba de microarreglo (Robinson *et al.*, 2016).

2.1 Etiología. Los retrovirus están asociados con una variedad de enfermedades, éstas incluyen: malignidades (ciertas leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas; mamarios, hígado, pulmón y riñón y otros tumores de origen mesodérmico); inmunodeficiencias (SIDA), enfermedades autoinmunes y enfermedades de las neuronas motoras inferiores. Algunos retrovirus parecen no ser patogénicos (Cotmore *et al.*, 2019). Actualmente el BLV pertenece al orden

Ortervirales, familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Deltaretrovirus*.

El género *Deltaretrovirus* incluye al virus T-linfotrópico humano (HTLVs), al virus T-linfotrópico del simio (STLVs) y al virus de la leucemia bovina (BLV). Estos virus inducen una infección persistente de por vida que generalmente es asintomática (Gillet *et al.*, 2007, Peeters *et al.*, 2012, Cook *et al.*, 2013). HTLV-1 y BLV causan leucemia o linfoma en una minoría de los huéspedes infectados después de un largo período de latencia (Gillet *et al.*, 2007, Matsouka *et al.*, 2011).

En general, los *Deltaretrovirus* tienen una menor variación genética entre las cepas en comparación con otros géneros de retrovirus. Las secuencias genómicas de aislados de BLV de Europa, Japón y Australia comparten aproximadamente el 97% de su secuencia de nucleótidos (Juliarena *et al.*, 2013).

La partícula viral del BLV tiene un diámetro de entre 60 y 125 nm y presenta un núcleo central rodeado por una envoltura viral externa (Fig. 1) por microscopía electrónica (Gillet *et al.*, 2007). El virión presenta en su interior dos copias de ARN genómico simple de polaridad positiva compuesto por 8700 nucleótidos aproximadamente. Las proteínas CA (p24) forman la cápside e interaccionan con las proteínas de la nucleocápside (NC/p12). La retrotranscriptasa (RT) y la integrasa (IN) también se ubican empaquetadas dentro de la cápside. Estas enzimas se requieren para la transcripción reversa y la integración del genoma viral. La proteína de la matriz (MA/p15) interconecta la cápside con la envoltura externa. La envoltura está formada por una bicapa lipídica de origen celular junto con un complejo de glicoproteínas virales de superficie insertadas en ella (SU/gp51 y TM/gp30) mismas que intervienen en el reconocimiento, adsorción y penetración al linfocito B, blanco de la infección (Gillet *et al.*, 2007). Aparte de las proteínas estructurales, el virus codifica proteínas reguladoras tales como Tax, Rex, G4 y G3 y expresa micro RNAs reguladores (Aida *et al.*, 2013). El virus es poco resistente a las influencias

exteriores por lo que tiene escasa viabilidad persistiendo menos de cuatro horas fuera del animal. Los rayos ultravioletas, la congelación-descongelación repetida y la pasteurización inactivan al virus, al igual que los desinfectantes utilizados habitualmente (Orloff *et al.*, 1993).

2.2 Ciclo replicativo. El BLV infecta a las células de la serie mononuclear, preferentemente a los linfocitos B maduros que expresan en su superficie CD5+ IgM+, CD11b+ y MHCII+ (fenotipo relacionado con la subpoblación de linfocitos B reguladores) (Gillet *et al.*, 2007, Dai *et al.*, 2017) aunque la presencia de ARN mensajero viral se ha detectado en menor proporción en células del linaje monocito/macrófago. Como es común en familia *Retroviridae*, el BLV presenta una estrategia replicativa que involucra dos etapas; una temprana, dependiente de proteínas virales y una tardía, dependiente de enzimas del hospedero y los productos de los genes virales (Schwartz *et al.*, 1994a). En la etapa temprana, después del reconocimiento viral a través de un receptor de membrana (estos receptores siguen siendo desconocidos) (Lavanya *et al.*, 2008), se produce la fusión con la membrana celular, lo que permite la liberación de la cápside en el citoplasma de la célula huésped. La retrotranscriptasa (RT) viral sintetiza un ADN de doble cadena utilizando como molde el ARN viral. Posteriormente, la molécula de ADN se incorpora al genoma del huésped por medio de la integrasa, generando un provirus. En la etapa tardía, el provirus codifica para ácido nucleico y proteínas para ensamblar nuevas partículas virales, estas partículas se liberan por exocitosis para producir nuevos viriones infecciosos. Debido a la integración viral en el genoma del huésped, cada división celular origina una nueva célula infectada (Lewinsky *et al.*, 2006).

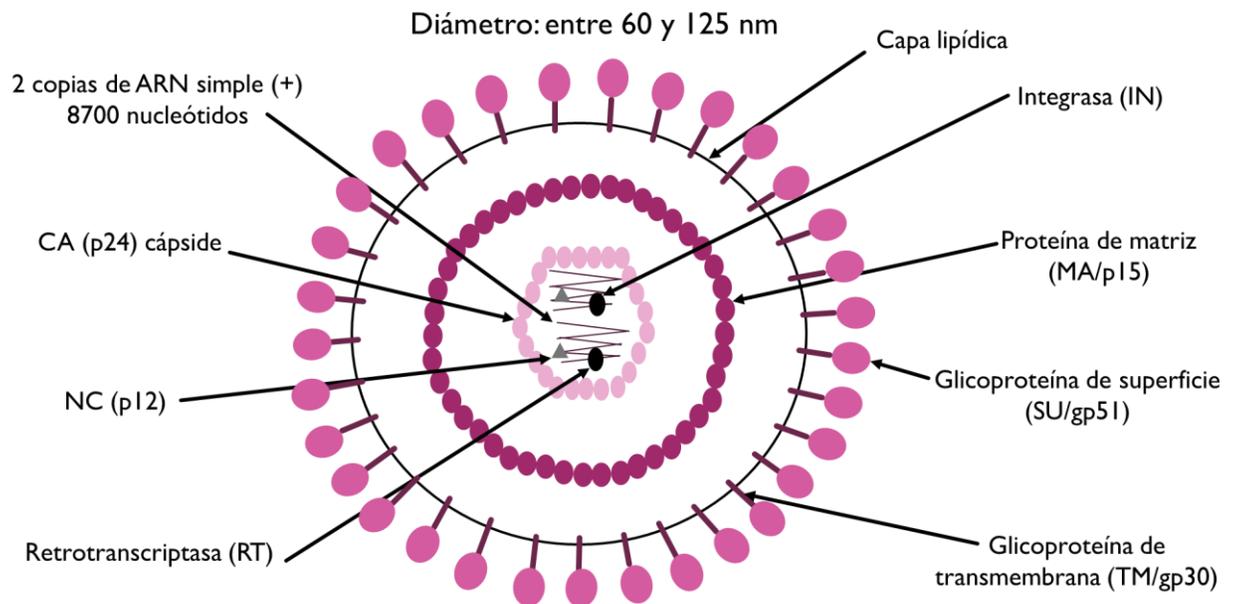


Figura 1. Representación esquemática de la partícula viral de BLV. Basado en Gilliet *et al.*, 2007.

2.3 Prevalencia. La infección por el BLV presentó una alta prevalencia en 2007, estimándose que el 83% del total del ganado lechero de los Estados Unidos estaban infectados y que la prevalencia dentro del rebaño oscila entre 23%-46% (USDA-NAHMS, 2007) pero la prevalencia actual puede ser incluso mayor; sin embargo, la prevalencia exacta en nuestro país se desconoce ya que en la mayoría de las explotaciones no se realiza el diagnóstico rutinario. En estudios realizados en el complejo agropecuario e industrial de Tizayuca (CAIT) se determinó una prevalencia del 66% (Zavaleta, 2009, Favila, 2014).

2.4 Diagnóstico. El BLV se puede detectar en el sobrenadante del cultivo *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en

inglés) de los animales infectados, mediante pruebas de detección del antígeno, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por microscopia electrónica. Los métodos de detección de los anticuerpos más utilizados son la inmunodifusión en gel de agar (AGID) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (OIE, 2012).

En la actualidad no existe ningún tratamiento para la LEB, sólo es posible la prevención y/o control de la enfermedad (Radostits *et al.*, 2002). El principio fundamental para la prevención de esta enfermedad es la correcta identificación de los animales infectados y su eliminación o aislamiento (Barros *et al.*, 1998).

3. Aspectos Inmunológicos generales

Los linfocitos representan la subpoblación necesaria para desarrollar una respuesta inmune durante el contacto con el antígeno (Berndt *et al.*, 2001). En el caso de los linfocitos T (LT), estos interactúan con las células presentadoras de antígeno (APCs) y después de esta interacción, los linfocitos expresan citocinas que modulan y diferencian la respuesta inmune (Matulova *et al.*, 2012).

Las citocinas son proteínas secretadas que tienen funciones diversas que incluyen el crecimiento, reclutamiento, activación, diferenciación de células inmunitarias, así como la regulación de la fuerza y la duración de la respuesta inmune. Estas citocinas tienen participación en la modulación de la respuesta tanto innata como adaptativa. Inicialmente, la producción de estas citocinas está a cargo de las células de la inmunidad innata (Abbas *et al.*, 2018, Frie *et al.*, 2014, Storan *et al.*, 2015).

Dependiendo del perfil de citocinas presentes en el microambiente, los LT CD4+ se pueden diferenciar en subpoblaciones de células efectoras que sintetizan diferentes tipos de citocinas y, por lo tanto, realizan distintas funciones efectoras. Los subconjuntos mejor definidos de LT efectoras de la estirpe cooperadora CD4+ (LT_H) son los linfocitos T_H1 (LT_H1) y T_H2 (LT_H2). El interferón gamma (IFN- γ) es la principal

citocina que caracteriza a los LT_{H1} , mientras que la IL-4, IL-13 e IL-5 son las que definen a los LT_{H2} (Abbas *et al.*, 2018).

3.1 Respuesta T_{H1} . El subgrupo T_{H1} lo inducen los microorganismos intracelulares que ingieren los fagocitos y a los que activan, y es la principal población efectora de LT en la defensa del huésped mediada por los fagocitos, la reacción central de la inmunidad celular. La respuesta T_{H1} se considera que es eficaz en el control de la infección por retrovirus. La diferenciación T_{H1} está dirigida sobre todo por la IL-12 e IFN- γ , y tiene lugar en respuesta a los microorganismos que activan a las células dendríticas, los macrófagos y las células NK (Wang *et al.*, 1995).

3.1.1. Citocinas características de T_{H1} :

IL-12. Está citocina desempeña un papel central en la generación de LT_{H1} los cuales sintetizan IL-12 adicional e IFN- γ , retroalimentando positivamente la respuesta; por lo tanto, es un mediador fundamental en la respuesta inmunitaria innata inicial a los microorganismos intracelulares y es un inductor clave de la inmunidad celular. Las APCs, tales como los macrófagos y LB; entre otras, sintetizan IL-12 (Trinchieri *et al.*, 2019).

IFN- γ . Es sintetizado por las células NK, LT_{H1} , LT citotóxicos $CD8^+$ (LT_c), macrófagos y células dendríticas (Carnaud *et al.*, 1999, Harris *et al.*, 2000, Frucht *et al.*, 2001). Entre las funciones biológicas más importantes está la activación de las células NK y macrófagos (Boehm *et al.*, 1997). También induce la expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II (MHC-I y MHC-II, del inglés major histocompatibility complex). La producción de IFN- γ inhibe la proliferación de la respuesta T_{H2} y de la síntesis de IL-10 y TGF- β (Fukao *et al.*, 2000, Sen, 2001) e induce una retroalimentación positiva para amplificar la respuesta T_{H1} en conjunto

con la IL-12 (Ploegh, 1998, Abbas *et al.*, 2018). En el caso de las APC la acción local es importante ya que las células cercanas se activan (Gessani *et al.*, 1998).

TNF- α . La principal fuente celular de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son los fagocitos mononucleares activados, aunque los LT estimulados por antígenos, las células NK y los mastocitos también pueden secretar esta citocina. El IFN- γ , sintetizado por los LT_{H1} aumenta la síntesis de TNF- α en los macrófagos activados. Probablemente el papel más importante de esta citocina es la activación de células endoteliales que conduce a la expresión de moléculas de adhesión y a la subsecuente activación y reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos en sitios de daño e infección en el inicio de la respuesta inflamatoria que forma parte de la inmunidad innata, (Locksley *et al.*, 2001, Abbas *et al.*, 2018, Akira *et al.*, 2004). Las citocinas inflamatorias como la TNF- α son relevantes en las respuestas inmunes antivíricas y antiparasitarias (Freund *et al.*, 1992, Butera *et al.*, 1993).

IL-2. La IL-2 es una citocina de respuesta celular producida por los LT CD4+ y, en menor grado, por los LT CD8+. Las actividades biológicas de la IL-2 son: estimular la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células T activadas por antígeno, controlar la magnitud y duración de la respuesta inmune de LT y aumentar la actividad citolítica de las células NK. Así mismo, la estimulación sostenida por IL-2 sensibiliza a los LT CD4+ al desarrollo de apoptosis (Taniguchi *et al.*, 1993, Abbas *et al.*, 2018).

3.2 Respuesta T_{H2}. La función efectora más importante de los LT_{H2} es la secreción de IL-4, IL-5, IL-13, e IL-6 que inducen reacciones inmunitarias mediadas por IgE, eosinófilos y mastocitos (Lucey, 1999). Otra de las funciones de la respuesta T_{H2} es la inhibición de la respuesta T_{H1}, particularmente vía IL-4 e IL-13 las cuales antagonizan las acciones de IFN- γ e inhiben la activación de macrófagos lo que resulta en respuestas protectoras independientes de fagocitos (Romagnani, 1999). Estas reacciones son importantes para la erradicación de las infecciones por

helmintos, para la eliminación de otros microbios en los tejidos mucosos y son fundamentales para el desarrollo de enfermedades alérgicas (Abbas *et al.*, 2018).

3.2.1. Citocinas características de T_H2:

IL-4. Las principales fuentes celulares de IL-4 son los LT CD4⁺ de la subpoblación T_H2, así como los mastocitos y los basófilos activados (Abbas *et al.*, 2018). Entre sus funciones biológicas está la estimulación en el cambio de clase en la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig) M en el LB al isotipo IgE (producción de IgE de alta afinidad), generación de macrófagos activados por la ruta alternativa, estimula el peristaltismo en el tracto gastrointestinal, diferenciación y proliferación de LT_H2, (Van Dyken *et al.*, 2013).

IL-13. Las principales funciones biológicas de esta citocina incluyen la regulación en la expulsión de parásitos gastrointestinales, hiperreactividad de las vías respiratorias, inflamación en procesos alérgicos, eosinofilia tisular, mastocitosis y producción de IgE. También participa en la remodelación tisular y fibrosis (Wynn, 2003).

IL-5. Las principales acciones de la IL-5 son activar eosinófilos maduros, estimular el crecimiento y diferenciación de estos, además, induce la producción de IgA (Beagley *et al.*, 1988, Hiroi *et al.*, 1999, Abbas *et al.*, 2018).

3.3 Respuesta Treg. Las células Treg CD4⁺ Foxp3⁺ son una población especializada que mantiene la autotolerancia y la homeostasis inmunológica. Además, suprime a los LT autorreactivos y ayuda a regular la magnitud de las respuestas inmunes frente a los agentes infecciosos. El regulador transcripcional Foxp3 es reconocido como el marcador de linfocitos Treg (LTreg). En ratones y humanos, se ha observado que este marcador es crítico para el desarrollo y funcionamiento de esta población de linfocitos T (Hori *et al.*, 2003, Fontenot *et al.*,

2005a, Fontenot *et al.*, 2005b). Existen al menos dos poblaciones de LTreg inducibles y definidas con base a su perfil de citocinas: Tr1 la cual secreta grandes cantidades de IL-10 y las Tr3 caracterizadas por la secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Yuan *et al.*, 2012).

3.3.1. Citocinas características LTreg:

IL-10. Los Tr1 y algunos linfocitos B reguladores (LBreg) son la principal fuente de IL-10. Así mismo, macrófagos y células dendríticas activadas producen esta citocina, generando un mecanismo de retroalimentación negativa. (Abbas *et al.*, 2018). Entre sus funciones biológicas se encuentra la inhibición de las respuestas T_{H1} y T_{H2}, principalmente mediante mecanismos que suprimen la producción de citocinas proinflamatorias y disminuyen la expresión de moléculas co-estimuladoras en APCs (Asadullah *et al.*, 2003, Roncarolo *et al.*, 2006).

TGF- β . Esta citocina induce apoptosis en LT CD4+ (Tian *et al.*, 2001) y anergia en LT CD8+ activados con lipolisacáridos (LPS) (Parekh *et al.*, 2003). En los macrófagos limita la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (Bogdan *et al.*, 1993), inhibe la citotoxicidad de las células NK activadas por IL-2, IL-15, IL-21 e IFN de tipo 1 (Chen *et al.*, 2003, Zwirner *et al.*, 2010) y limita la producción de IFN- γ (Fargeas *et al.*, 1992). Por otro lado, induce e incrementa la expresión de Foxp3 en LT CD4+ convencionales (Josefowicz *et al.*, 2009).

3.4 Respuesta Breg. La población de LBreg suprimen las respuestas inmunitarias, en contraste con los LB no reguladores, que tienen la función de aumentar las respuestas inmunitarias. Se reconocen al menos dos poblaciones, Br1 productoras de IL-10 y Br3 productoras de TGF- β (Noh *et al.*, 2011). Esta población de LBreg también expresa el marcador transcripcional Foxp3 lo que hace a estos linfocitos comparables con los LTreg (Noh *et al.*, 2010a). Los componentes del

sistema Breg es similar a los Treg, incluidas las células Br1 (productoras de IL-10) así como Br3 (productoras de TGF) (Noh *et al.*, 2010b). La IL-10 producida por la población Br1 está involucrada en el crecimiento autocrino de LBreg CD5+, incluyendo Br1 y Br3 (Watanabe *et al.*, 2007).

4. Aspectos inmunológicos de la LEB.

Una característica común de los trastornos inmunes retrovirales se atribuye en parte a una respuesta T_H1 / T_H2 inapropiada (Bracha *et al.*, 2000). Inmediatamente después de la infección, se activa la expresión génica y la traducción de las proteínas necesarias para la producción de viriones maduros en la célula hospedera. Se puede identificar una viremia que dura de 10 a 12 días post-infección (Schwartz *et al.*, 1994b), después de la cual se genera una respuesta inmune persistente, aunque ya no se pueden detectar viriones en los órganos de los animales infectados.

El ganado desarrolla una respuesta serológica entre 2 a 8 semanas post-infección (Burny *et al.*, 1980). Se sugiere que después de la infección, los niveles de anticuerpos son en respuesta a una alta carga proviral (Gillet *et al.*, 2007, Juliarena *et al.*, 2009). La mayoría de estos anticuerpos reconocen epítomos de gp51 y p24 y son líticos para las células productoras del virus. Paralelamente a la seroconversión temprana, aparecen linfocitos T citotóxicos en sangre periférica para los epítomos tax y env. Esta respuesta persiste y se amplifica durante la vida del animal, indicando que el sistema inmune es estimulado permanentemente por el BLV (Gillet *et al.*, 2007). En terneros, existen anticuerpos derivados de la madre que tardan de 6 a 7 meses en desaparecer. No hay modo de distinguir entre los anticuerpos adquiridos por transferencia pasiva y los que se generan como consecuencia de una infección activa (OIE, 2012).

Por otro lado, se ha observado que una baja respuesta inmune celular está asociada a la progresión hacia LP (Pyeon *et al.*, 1996). El desarrollo de LP es promovida por una expansión policlonal de linfocitos B CD5+, IgM+ (Cantor *et al.*, 2000, Konnai *et al.*, 2005, Florins *et al.*, 2008, Lavanya *et al.*, 2008). En el ganado infectado con BLV, una fuerte respuesta humoral es caracterizada por un aumento de la expresión de ARNm de IL-10 y una respuesta de corta duración de IL-12 (Pyeon *et al.*, 1996), estos resultados sugieren que el desequilibrio en las citocinas puede contribuir a la progresión de la enfermedad en vacas LP+ (Bracha *et al.*, 2000). Se describe que, en etapas iniciales de la infección, la pérdida predominante de expresión de citocinas T_H1 (IL-12, IFN- γ , IL-2) y un cambio rápido de expresión de IL-10, es un factor determinante para el desarrollo de LP (Yakobson *et al.*, 2000). Se ha observado que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién aisladas de bovinos infectados con LP+ expresan menos IL-2, IL-4, e IFN- γ y exhiben incrementos en la expresión de IL-10 cuando se compara con el ganado infectado sin LP, así como el no infectado (Yakobson *et al.*, 2000, Amills *et al.*, 2002). Por otro lado, la expresión de IL-12 e IFN- γ ha sido mayor en animales que no desarrollan LP (Pyeon *et al.*, 1996, Yakobson *et al.*, 2000, Konnai *et al.*, 2003).

5. Impacto económico

La línea de demarcación entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa es difícil de precisar debido a que están íntimamente ligadas y comparten muchos mecanismos efectores (Rainard *et al.*, 2006). Este fenómeno en la infección por BLV puede predisponer a los animales a desarrollar co-infecciones múltiples que incrementan la gravedad de la enfermedad, reducen la longevidad de la vaca y aumentan las tasas de sacrificio (Emanuelson *et al.*, 1992, Rusov *et al.*, 1994, Wellenberg *et al.*, 2002, Sandev *et al.*, 2004, Sledge *et al.*, 2009, Vanleeuwen *et al.*, 2010, Erskine *et al.*, 2012, Bartlett *et al.*, 2014, Norby *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2016).

Aunque la infección por BLV ha sido reportada en varias especies de rumiantes en todo el mundo, las tasas de infección son más prevalentes en ganado lechero. Por lo que los productores tienen pérdidas económicas significativas debido a la eliminación selectiva del ganado lechero de alta producción (Rodríguez *et al.*, 2011), muerte del ganado vacuno, la reducción de la eficiencia reproductiva, el aumento de los costos de reemplazo, veterinarios y la imposibilidad de exportar ganado vivo, semen y óvulos a países donde hay medidas para combatir el BLV. Un programa de certificación de BLV realizado en Nueva York indicó que la enfermedad tiene un impacto económico significativo ya que las tasas de morbilidad y mortalidad fueron altas debido a linfoma maligno (BLV on U.S., 2007). La pérdida anual estimada es de \$500 millones de dólares a nivel nacional en los Estados Unidos (Ott *et al.*, 2003).

JUSTIFICACIÓN

En estudios preliminares, se determinó que la carga proviral del BLV presenta una correlación estadísticamente significativa con LP y que las vacas BLV- permanecieron sin infección durante 3 meses, sugiriendo la presencia de factores de resistencia (Zavaleta, 2009). También se encontró que las vacas BLV+/LP+ mostraron títulos de anticuerpos más altos que las BLV+/LP-, exhibiendo una relación estadísticamente significativa con los conteos linfocitarios. Así mismo, la expresión de citocinas (IL-12, IFN- γ , IL-4 e IL-10) fue más alta en el grupo BLV- comparadas con los grupos BLV+/LP+ y BLV+/LP-, siendo estadísticamente significativa para la IL-10 y la IL-12. Los resultados sugieren que una expansión policlonal de células B IgM+, CD5+ promueve altos títulos de anticuerpos frente al BLV en vacas afectadas por LP+ y una severa supresión inmune en animales BLV+ ya que es el fenotipo que se describe para las células B reguladoras (Breg) (Fabila, 2015). Dicha hipótesis puede ser validada mediante la evaluación del perfil completo de las citocinas involucradas lo cual constituye el objetivo central del presente estudio.

HIPÓTESIS

- 1) La expresión alta de citocinas T_H1 (IL-12, IL-2, TNF- α e IFN- γ) mostrará relación significativa con ausencia de infección por BLV y/o LP negativa o con baja carga de BLV.
- 2) La expresión alta de TGF- β e IL-10 mostrará relación significativa con baja expresión de IL-12, IL-2, TNF- α , IL-4 e IFN- γ y/o presencia de LP o con alta carga de BLV, indicativos de inmunosupresión severa.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluación de la respuesta inmune celular y su relación con el desarrollo de linfocitosis persistente en vacas infectadas por el virus de la leucosis bovina (BLV).

Objetivos particulares

- Determinar el estatus de infección por BLV mediante PCR punto final.
- Determinar el estatus de linfocitosis persistente (LP) en animales seleccionados.
- Determinar la carga proviral en vacas BLV+ seleccionadas para determinar su relación con la presencia de LP.
- Determinar la expresión de IL-4, IL-10, TGF- β , IL-12, IL-2, TNF- α e IFN- γ en la población experimental de vacas BLV- y BLV+ seleccionadas.
- Determinar la relación de la expresión de IL-4, IL-10, TGF- β , IL-12, IL-2 y TNF- α e IFN- γ con la presencia de LP.
- Determinar la relación de la expresión de IL-4, IL-10, TGF- β , IL-12, IL-2 y TNF- α e IFN- γ con la carga de BLV.

METODOLOGÍA

1. Diseño experimental

Las muestras se obtuvieron de un complejo de producción láctea ubicada en Tizayuca, Hidalgo que presenta una alta seroprevalencia de BLV (Zavaleta, 2009, Favila, 2014). Se tomaron muestras aleatorias de sangre completa de 155 vacas entre 2do y 3er parto con el fin de obtener 30 animales BLV- y 31 BLV+ para determinar la prevalencia en la zona. En la población seleccionada, se realizaron 3 muestreos mensuales de sangre para la determinación del leucograma, así como la carga de BLV y la expresión de citocinas (IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-2 y TGF- β) mediante qPCR. Con los resultados de los leucogramas mensuales, se determinó la presencia de LP y se conformaron los grupos; BLV-, BLV+ / LP- y BLV+ / LP+, para evaluar las variables de carga proviral y expresión de citocinas con respecto a la presencia de LP. Así mismo, para la carga proviral se estableció un punto de corte con base al promedio. De este modo, los resultados por encima del promedio se consideraron de alta carga proviral y los resultados por debajo del promedio se valoraron como baja carga proviral, obteniéndose los siguientes grupos: alta carga proviral, baja carga proviral y negativos al BLV. Con estos grupos, las variables de conteo linfocitario y la expresión de citocinas se evaluaron frente a la carga proviral.

2. PCR punto final

La determinación del estatus de infección por BLV se realizó por PCR punto final, utilizando ADN genómico. Los iniciadores empleados amplifican la región env (gp30) con un producto de 674 pb (Heinecke, 2016). La amplificación se realizó en reacciones de 50 μ l en tubos de 0.2 ml, conteniendo 2.5 U de Taq ADN polimerasa (ADN polimerasa FlexiGoTaq, Promega Corp. Madison, WI), PCR buffer 1x, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, 100 pm de cada iniciador y el templado. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: posterior a una desnaturalización inicial (95°C durante 5 minutos), se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por

30 segundos, alineación a 52°C por 40 segundos, elongación a 72°C durante 50 segundos. Posteriormente, se realizó una elongación final de 72°C durante 7 minutos.

3. Hematología

El conteo total de leucocitos se realizó con métodos automáticos (Abacus Junior Vet) y el conteo diferencial se realizó con frotis de sangre teñidos con Wright para calcular el número absoluto de linfocitos siguiendo metodología rutinaria (Stoddart, 2011).

4. Separación de PBMC y estimulación de células

De la población experimental, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por diferencia de gradientes. Las muestras de sangre completa se diluyeron de la siguiente manera: 500 µl de sangre con 500 µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en un microtubo de 1.5 mL estéril. Posteriormente, la mezcla se depositó suavemente sobre 500 µl de solución con densidad de 1.077 ± 0.001 (HISTOPAQUE 1077, Sigma, Saint Louis Missouri, USA) en un microtubo de 1.5 mL estéril. Los tubos se centrifugaron a 400 g durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se extrajo la interfase correspondiente a las células mononucleares y se realizaron 3 lavados con solución PBS durante 10 min a 400 g. Una parte de las PBMC fueron conservadas a -60°C mientras que otra parte fueron estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) en microplacas de 96 pozos, depositando 50 µl de las células en suspensión, 50 µl del mitógeno (LPS) y 100 µl de medio mínimo esencial (MEM) (Advanced MEM, Thermo Fisher scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) en cada pozo, la placa fue incubada a 37°C en ambiente con 5% de CO₂ durante 48 horas. Las PBMC estimuladas fueron destinadas para la extracción de ARN.

5. Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de PBMC no estimuladas se realizó por medio de reactivos comerciales (One-4-All Genomic DNA Mini-Preps Kit Bio basic, Canada Inc). Las PBMC contenidas en tubos de 1.5 ml fueron incubadas en un Thermomixer (Eppendor Hamburg, Germany) a 56°C por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 200 µl de etanol al 100%, homogenizando la mezcla con un agitador tipo vortex (Scientific industries, New York, EUA). El lisado obtenido (620 µl aproximadamente) se transfirió a la columna, se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto y se decantó el líquido colector. Se adicionaron 500 µl de buffer CW1 para centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto y descartar el líquido del tubo colector. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de buffer CW2, se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto y se descartó el líquido del tubo colector. Una vez centrifugado, se secó la columna a 12,000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el tubo colector y se colocó un tubo en la columna para agregar 100 µl de buffer CE (pre-calentado a 60°C por 2 minutos) y el líquido con el ADN colectado, el ADN se incubó a temperatura ambiente por dos minutos. La concentración del ADN obtenido se determinó mediante espectrofotometría (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) y la concentración de ADN se ajustó en alícuotas de 100 ng/µl que se conservaron a -70°C.

6. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó en PBMC no estimuladas y estimuladas con LPS utilizando reactivo de Trizol (Invitrogen™ Reactivo TRIzol™). Se adicionaron 800 µl de trizol refrigerado a tubos de 1.5 ml con PBMC (200 µl). La mezcla se homogenizó e incubó 5 minutos a temperatura ambiente para agregar 200 µl de cloroformo y se mezcló en un agitador tipo vortex (Scientific industries, New York, EUA) durante 1 minuto, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y la fase acuosa resultante (700 µl aproximadamente) se transfirió a un tubo de 1.5 ml, posteriormente se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico frío, se mezcló e incubó a temperatura ambiente

durante 10 minutos. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se decantó para agregar 500 µl de etanol al 75% frío y mezclar por inversión por un minuto. Finalmente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C para eliminar el exceso de etanol y el pelet se resuspendió en 200 µl de agua inyectable. La concentración del ARN obtenido se determinó mediante espectrofotometría (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA), y la concentración de ARN se ajustó en alícuotas de 100 ng/µl que se conservaron a -70°C.

7. Retrotranscripción

La obtención de ADN complementario (ADNc) se realizó en reacciones de 20 µl, iniciando con la incubación previa de 50 µg ARN con 20 pmol (0.5 µg) de iniciador Oligo (dT) (Promega Corp., Madison WI., USA) y agua grado biología molecular cbp 5 µl. La mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos seguido de una incubación a 4°C por 5 minutos en termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). A la mezcla inicial (5 µl), se agregaron buffer 1x, 1.6 mM de MgCl₂, 0.03 mM de dNTP, 20 U de inhibidor, 1 U de enzima RT (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, USA) y agua grado molecular cbp 15 µl. Se homogenizó e incubó a 37°C en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) durante 60 minutos. La concentración de ADNc se ajustó en alícuotas de 50 ng que se congelaron a -20°C hasta su uso en protocolos de qPCR.

8. Iniciadores

Se utilizaron iniciadores para la expresión de IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ previamente descritos (Fabila, 2015). Para las citocinas IL-2, TNF-α y TGF-β, se diseñaron iniciadores específicos con base a secuencias publicadas en el GenBank (IL-2 NM 180997, TNF-α NM 173966 y TGF-β NM 001166068) utilizando el programa Primer3

(Untergrasser, 2012) y se alinearon con el software BioEdit (BioEdit V7.2.5, Ibis Bioscience, Carlsbad, CA).

9. PCR cuantitativa (qPCR)

Previo a la estandarización de la qPCR, los iniciadores diseñados se utilizaron en la estandarización de la PCR de punto final para la amplificación de cada citocina. La temperatura de alineación se determinó mediante gradientes de temperatura (56 a 60°C), empleando concentración estándar de MgCl₂ (1.5 mM). Así mismo, se realizaron curvas de concentración para establecer la concentración óptima de templado (25, 12.5 y 6.25 ng) tanto para la PCR punto final como para el qPCR.

Por qPCR, se realizó una curva de concentración de templado para determinar la eficiencia de los iniciadores diseñados. La qPCR se realizó en reacciones de 20 µl, utilizando 50 ng de ADNc y un equipo de reactivos comercial (Sensi Fast SYBR Master Mix, Bioline, London, UK) como sistema de amplificación y detección en un equipo Agilent technologies Mx3005P (Stratagene Mx3000P, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). Cada muestra se ejecutó por triplicado y con una reacción control, usando el gen constitutivo Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) en placas ópticas de 96 pozos. Posterior a la activación de la enzima a 95°C por 2 min, se siguieron las condiciones estándar de amplificación (Desnaturalización 5 seg. a 95°C, alineación 10 seg. a 60°C, elongación 10 seg. a 72°C, durante 40 ciclos). Las condiciones para la amplificación de HPRT fueron las mismas con excepción de la alineación que fue a 50°C por 10 segundos. Posterior a la amplificación, se incrementó la temperatura a 95°C para construir una curva de disociación y determinar la especificidad del producto amplificado.

10. Método de cuantificación

Los resultados de los triplicados se expresaron como la media \pm el error estándar. Se utilizó el método de cuantificación relativa mediante la comparación del punto de cruce (cross-point/ C_P) de la muestra desconocida con una muestra calibradora (muestras provenientes de PBMC no estimuladas de una vaca no infectada). Todas

las cuantificaciones de las muestras desconocidas y de la muestra calibradora fueron normalizadas con un control interno (gen constitutivo HPRT)

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

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

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

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

11. Análisis Estadístico

El análisis de la carga proviral con relación al estatus de LP se realizó con la prueba t-Student para muestras independientes, mediante el paquete estadístico SPSS 16.0. El modelo que se utilizará en el análisis será: $Y_i = T_{ij} + E_{ij}$.

Donde Y_{ij} es la variable a analizar: **Carga proviral**.

T_{ij} :

- a) BLV⁺/LP⁺ = positivas a la infección con LP.
- b) BLV⁺/LP⁻ = positivas a la infección sin LP.

E_{ij} = error aleatorio.

El análisis de los datos de los conteos linfocitarios y expresión de citocinas 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:

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

Donde Y_{ij} es la variable a analizar (conteo linfocitario o expresión de citocinas)

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

- a) VA = BLV⁺ con carga proviral alta.
- b) VB = BLV⁺ con carga proviral baja
- c) N = BLV⁻

E_{ij} = error aleatorio.

T_{ij} para la variable **expresión de citocinas** con relación a la LP fueron:

- a) BLV⁺ /LP⁺ = positivas a la infección con LP.

b) BLV^+/LP^- = positivas a la infección sin LP.

c) BLV^-/LP^- = negativas a la infección sin LP.

E_{ij} = error aleatorio.

T_{ij} para la variable **expresión de citocinas** con relación a la carga proviral fueron:

a) $VA = BLV^+$ con carga proviral alta.

b) $VB = BLV^+$ con carga proviral baja

c) $N = BLV^-$

E_{ij} = error aleatorio.

RESULTADOS

Selección de población y conformación de grupos

En el tamizaje inicial, para establecer el estatus de BLV mediante PCR punto final (Fig. 2) se muestrearon 155 vacas. Se determinó que la prevalencia del BLV en la cuenca lechera fue de 73% (116/155), se seleccionaron un total de 61 animales (28/BLV- y 33/BLV+). Posteriormente, se determinó el estatus de LP de las vacas BLV+ seleccionadas en las que se observó un incremento progresivo en el conteo linfocitario durante el transcurso del experimento. Al final del tercer muestreo, se apreció que 16 animales presentaron LP con un intervalo entre 8528 y 29, 241 linfocitos/ μ l de sangre. De este modo, se conformaron los siguientes grupos: BLV- (n=28 animales), BLV+ / LP- (n=17 animales) y BLV+ / LP+ (n=16 animales).

Estandarización de citocinas

Los iniciadores diseñados y utilizados se muestran en la tabla 1, mismos que amplifican los siguientes productos: 133 pb, 146 pb y 104 pb para TNF- α , TGF- β e IL-2, respectivamente. Para las tres citocinas, la temperatura óptima de alineación fue de 60°C, empleando una concentración estándar de MgCl₂ (1.5 mM). Posteriormente se realizaron curvas de concentración de templado para determinar la concentración mínima de detección y la concentración óptima las cuales fueron de 12.5 ng y 50 ng, respectivamente.

Del mismo modo, se realizaron curvas de concentración de templado para evaluar la amplificación por qPCR de cada citocina. Con base a las curvas de amplificación se determinó que la concentración óptima fue de 50 ng (Fig. 3A). Así mismo, las curvas de disociación confirmaron la amplificación de productos específicos. La figura 3B muestra la curva de disociación de la IL-2 la cual es representativa para las tres citocinas. Con respecto al resto de las citocinas descritas previamente, se obtuvieron los productos del tamaño esperado de 114 pb, 128 pb, 111 pb y 108 pb para IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ , respectivamente, y curvas de amplificación por qPCR correspondientes.

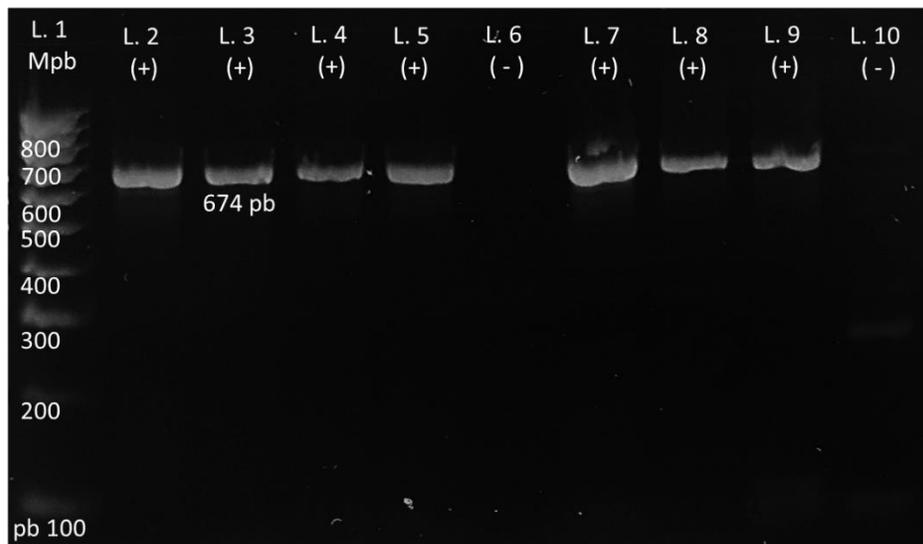


Figura 2. Estatus de BLV por PCR. Amplificación del gen Env de BLV en bovinos. Marcador de pares de bases (100 pb) en la línea 1. Casos BLV+ con productos de 674 pb en las líneas 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9, casos BLV- en líneas 6 y 10. PCR punto final en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 1. Iniciadores utilizados. Iniciadores utilizados para la amplificación de TNF- α , TGF- β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ .

Citocina	Iniciadores	Tamaño del producto
TNF- α	Fw TGACGGGCTTTACCTCATCT Rv GGCAGACAGGATGTTGACCT	133
TGF- β	Fw TGCTTCAGCTCCACAGAAAA Rv TCCAGGCTCCAGATGTAAGG	146
IL-2	Fw GCCCAAGGTTAACGCTACAG Rv GGTTTCAGGTTTTTGTCTGGA	104
IL-4	Fw TGAGGATGTTTCAGCGTTTTG Rv CCTACCAGCTGATCCCAGTG	114
IL-10	Fw GCTCCAAGAGAGGGGTGTCT Rv TCACCATCCTGGAGGTCTTC	128
IL-12	Fw AGCTTGGAGCACAGGGAGTA Rv GTGCACAGCTTCTACCACGA	111
IFN- γ	Fw GCCACTACTTTGATGGCATGT Rv CTGAAGCGCCAGGTATAAGG	108

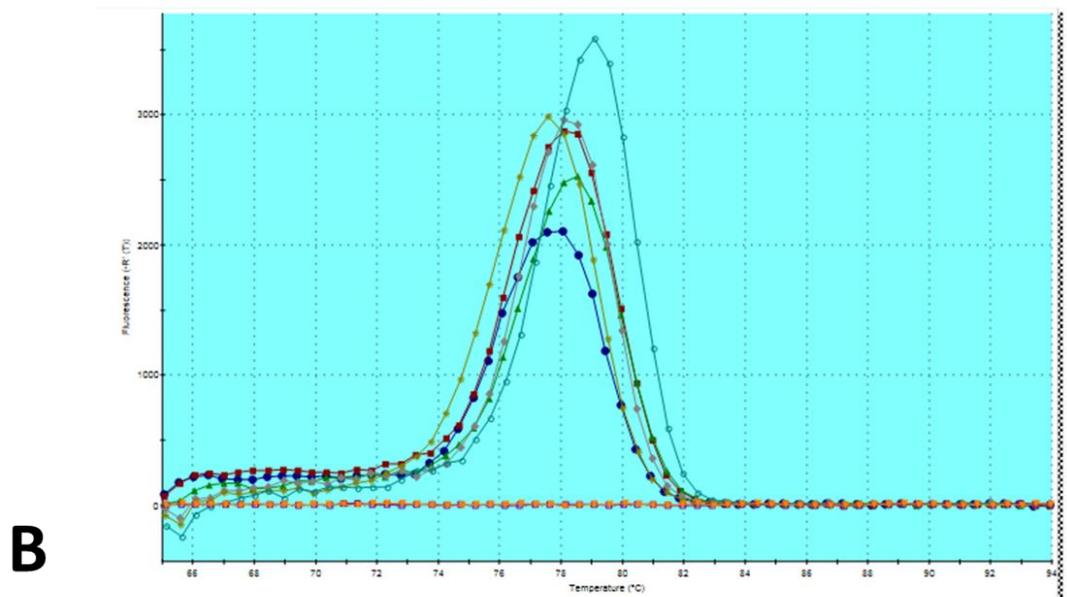
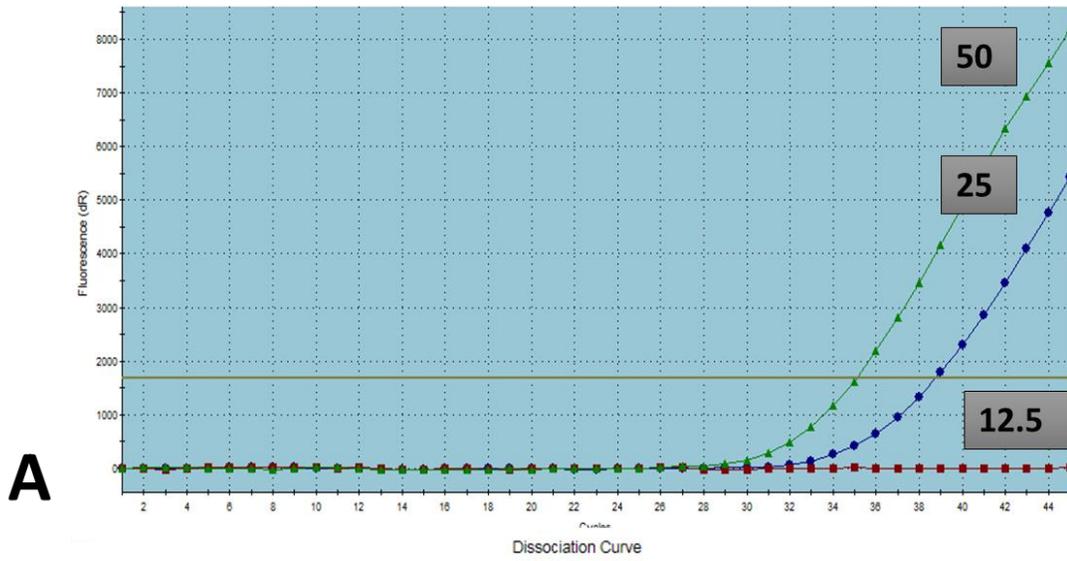


Figura 3. Estandarización de qPCR. A. Curva de templados TGF- β , TNF- α e IL-2. **B.** Curva de disociación de IL-2.

Carga proviral

En cuanto a la relación de carga proviral con la presencia de LP (Fig. 4A) se observa que el grupo BLV+/LP+ presenta un mayor conteo linfocitario, observándose diferencia estadística significativa, así como carga proviral más alta en comparación con el grupo BLV+/LP- que tiene menor carga proviral y menor conteo linfocitario. También se observa que conforme transcurrieron los muestreos en ambos grupos se incrementó la carga proviral. En la relación del conteo linfocitario con la carga proviral se observa que la carga proviral presenta una relación directamente proporcional al conteo linfocitario (Fig. 4B) puesto que en todos los muestreos el grupo de alta carga proviral presenta mayor conteo linfocitario, presentando diferencia estadística significativa en al menos dos muestreos en comparación con el grupo de baja carga, así como con el grupo negativo. Por otro lado, se puede observar en el tercer muestreo que en el grupo de baja carga proviral aumentó el conteo linfocitario, observándose similitud estadística con el grupo de alta carga proviral, así como con el grupo negativo a BLV.

Expresión de citocinas

- Expresión de IL-12 con relación a la LP

La expresión de IL-12 sólo presentó diferencia estadística significativa en el muestreo 3 (Fig. 5A). Se apreció que los grupos BLV+/LP+ y el negativo a BLV son estadísticamente diferentes, siendo el primero el de menor expresión mientras que el grupo BLV+/LP- es similar a estos dos grupos. Sin embargo, en el muestreo 1 la expresión menor de IL12 se observó en el grupo BLV+/LP+ mientras que en el mismo grupo se presentó la mayor expresión en el muestreo 2.

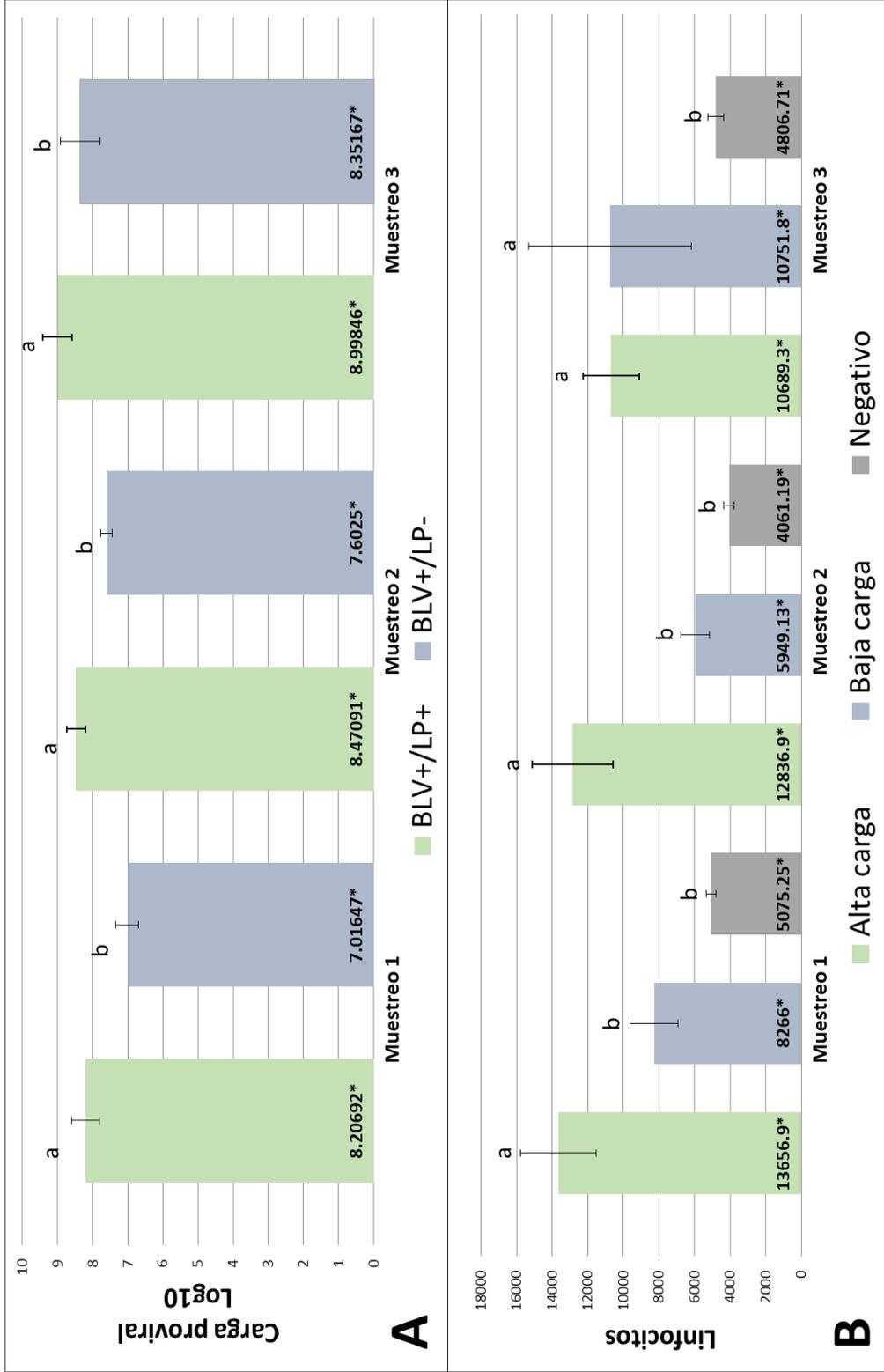


Figura 4. Carga proviral. A. Relación con el estatus de LP. **B.** Conteo linfocitario con relación a la carga proviral. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo ($P < 0.05$).

- Expresión de IL-12 con relación a la carga proviral

Únicamente en muestreo 3, el grupo de baja carga proviral (Fig. 5B) exhibió valores significativamente menores con respecto a los de alta carga proviral y negativo a la infección por BLV los cuales presentaron expresión similar. Del mismo modo, se observó la menor expresión de IL-12 en el grupo de baja carga proviral a pesar de no diferencia significativa.

- Expresión de IFN- γ con relación a la LP

Los resultados se muestran en la figura 6A. En los muestreos 1 y 3, el grupo BLV+/LP+ presentó expresión significativamente menor en comparación con los otros dos grupos los cuales no son significativamente diferentes entre sí. Del mismo modo, el grupo BLV+/LP+ exhibe la menor expresión en el muestreo 2 pero sin presentar diferencia estadística frente al grupo BLV+/LP-. En los tres muestreos, la mayor expresión de IFN- γ se apreció en el grupo negativo a la infección.

- Expresión de IFN- γ con relación a la carga proviral

En el muestreo 1 y 2 (Fig. 6B), el grupo de baja carga proviral es significativamente mayor al grupo de alta carga. El grupo negativo a BLV también presenta alta expresión con respecto al grupo de alta carga, observándose diferencia estadística significativa en el muestreo 2. En el muestreo 3 no se observa diferencia estadística significativa entre los tres grupos.

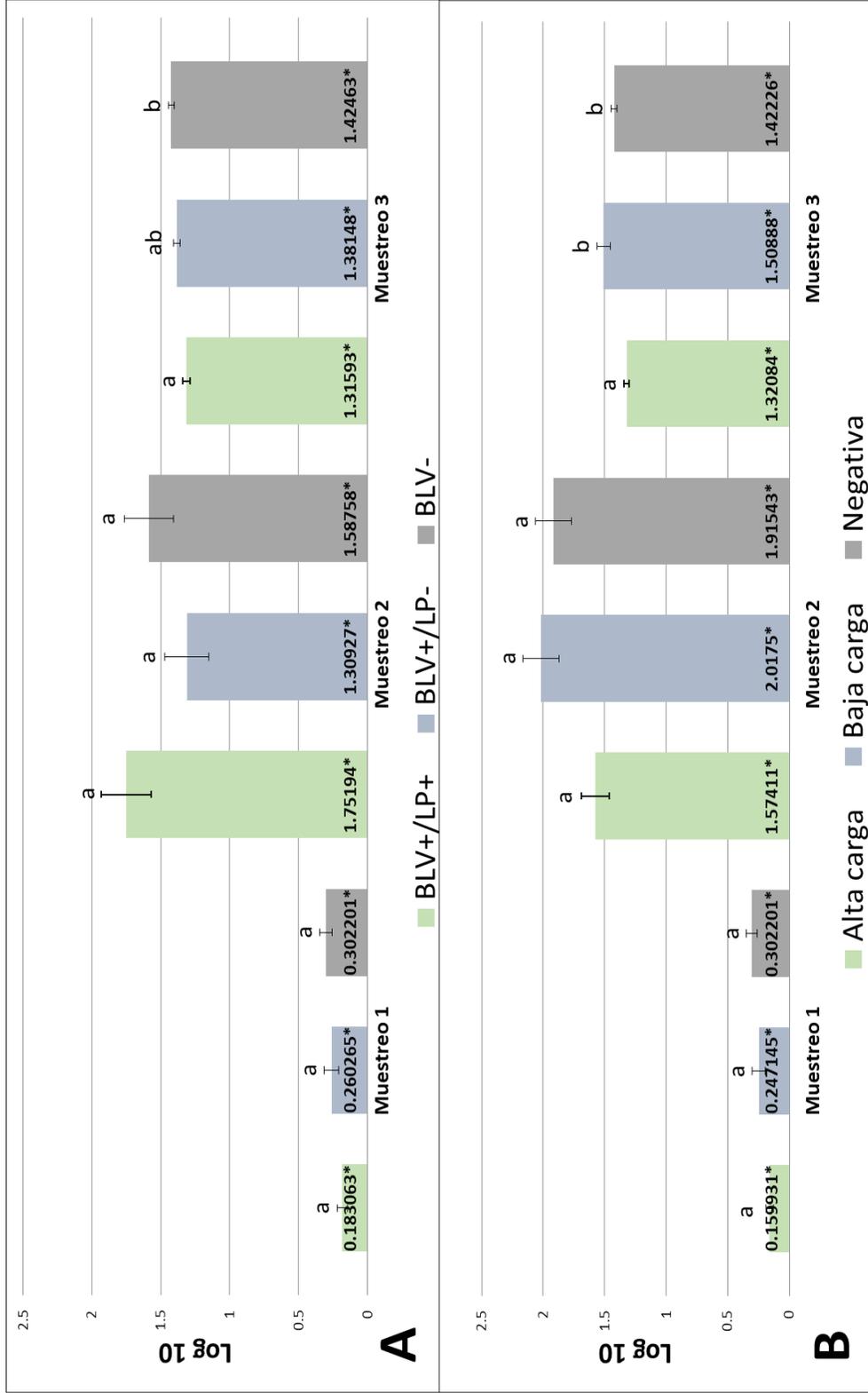


Figura 5. Expresión de IL-12. A. Relación con la LP. **B.** Relación con la carga proviral. Determinación por qPCR. Representación de la media de expresión de IL-12 en Log₁₀ +/- el error estándar. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo ($P < 0.05$).

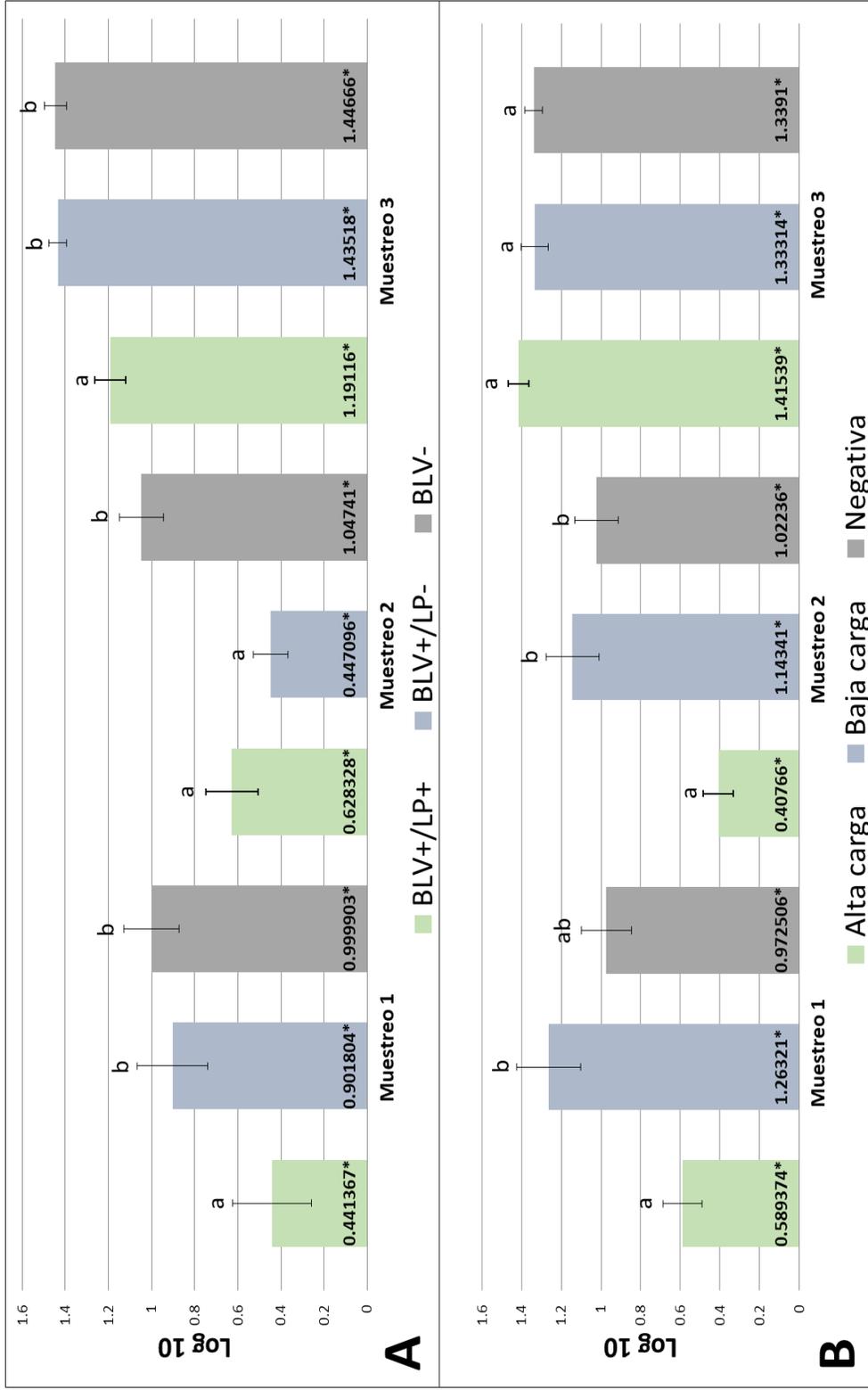


Figura 6. Expresión de IFN- γ . A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral. Determinación por qPCR. Representación de la media de expresión de IFN- γ en Log₁₀ +/- el error estándar. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo ($P < 0.05$).

- Expresión de IL-2 con relación a la LP

En la figura Fig. 7A se observa que, en los 3 muestreos, la expresión de IL-2 es significativamente mayor en el grupo BLV- en comparación con los otros dos grupos que no presentan diferencia estadística significativa. Sin embargo, la menor expresión se observa en el grupo BLV+/LP-.

- Expresión de IL-2 con relación a la carga proviral

En el muestreo 1 y 3 (Fig. 7B), el grupo BLV- presenta el mayor promedio de expresión, siendo significativamente diferente frente a los otros dos grupos en los que no se aprecia diferencia significativa entre sí. En el muestreo 2, el mayor promedio de expresión se observa en el grupo de baja carga proviral mismo que presenta diferencia estadísticamente significativa con el grupo de alta carga sin ser significativamente diferente al grupo negativo.

- Expresión de TNF- α con relación a la LP

En la figura 8A se observa que en el muestreo 1 y 3 no hay diferencia estadística entre los tres grupos. Sin embargo, el mayor promedio lo presenta grupo BLV- y el menor promedio de expresión se obtuvo en el grupo BLV+/LP+. En el muestreo 2, la expresión de TNF- α en el grupo BLV- que la del grupo BLV+/LP- mientras que el grupo BLV+/LP+ no presenta diferencia estadísticamente significativa frente a los otros dos grupos.

- Expresión de TNF- α con relación a la carga proviral

En los muestreos 1 y 3 (Fig. 8B) no se observa diferencia estadística significativa entre los tres grupos. Sin embargo, el menor promedio lo presenta el grupo de alta carga mientras que el mayor promedio de expresión lo presenta el grupo de baja

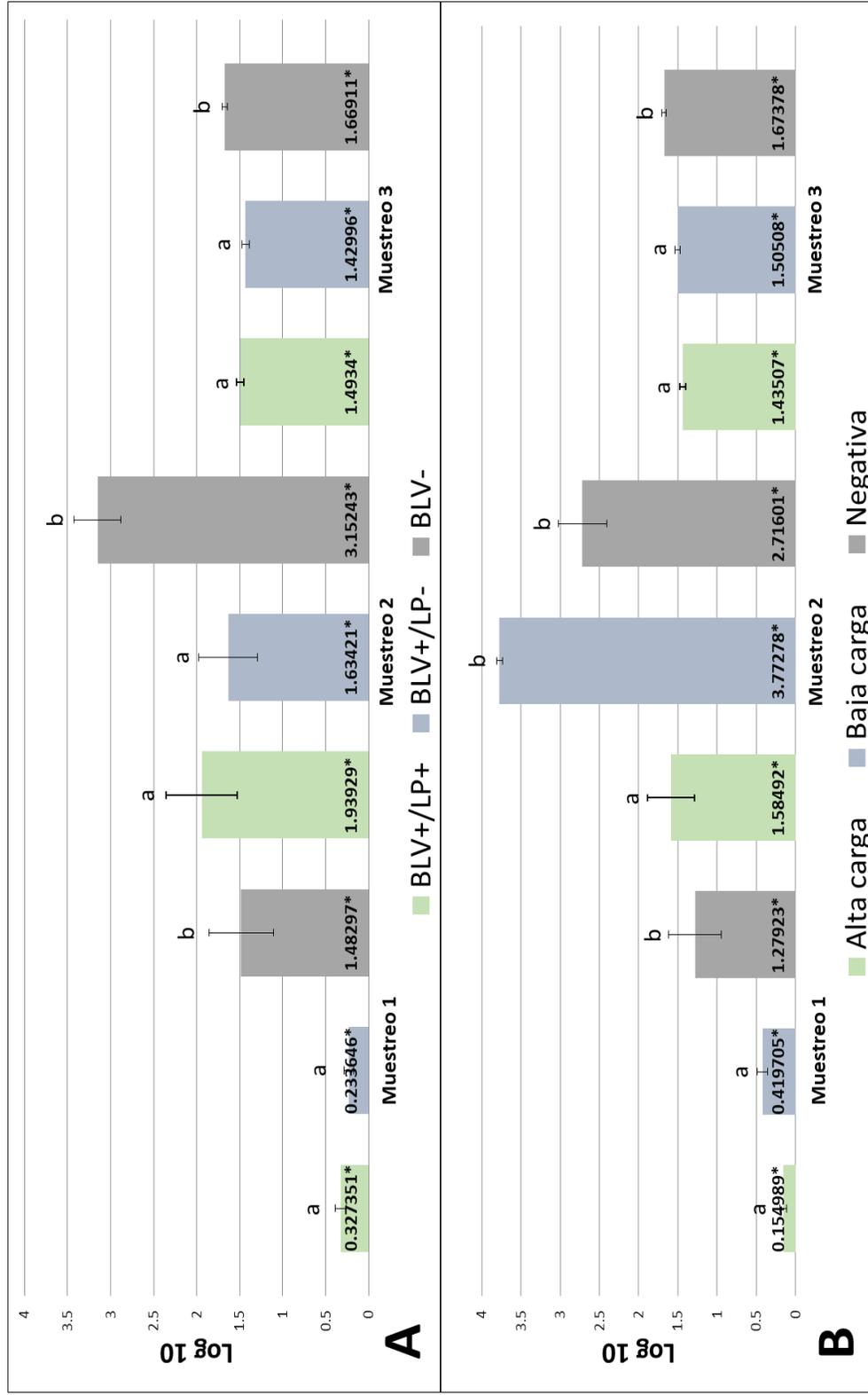


Figura 7. Expresión de IL-2. **A.** Relación con la LP. **B.** Relación con la carga proviral. Determinación por qPCR. Representación de la media de expresión de IL-2 en Log₁₀ +/- el error estándar. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo (P<0.05).

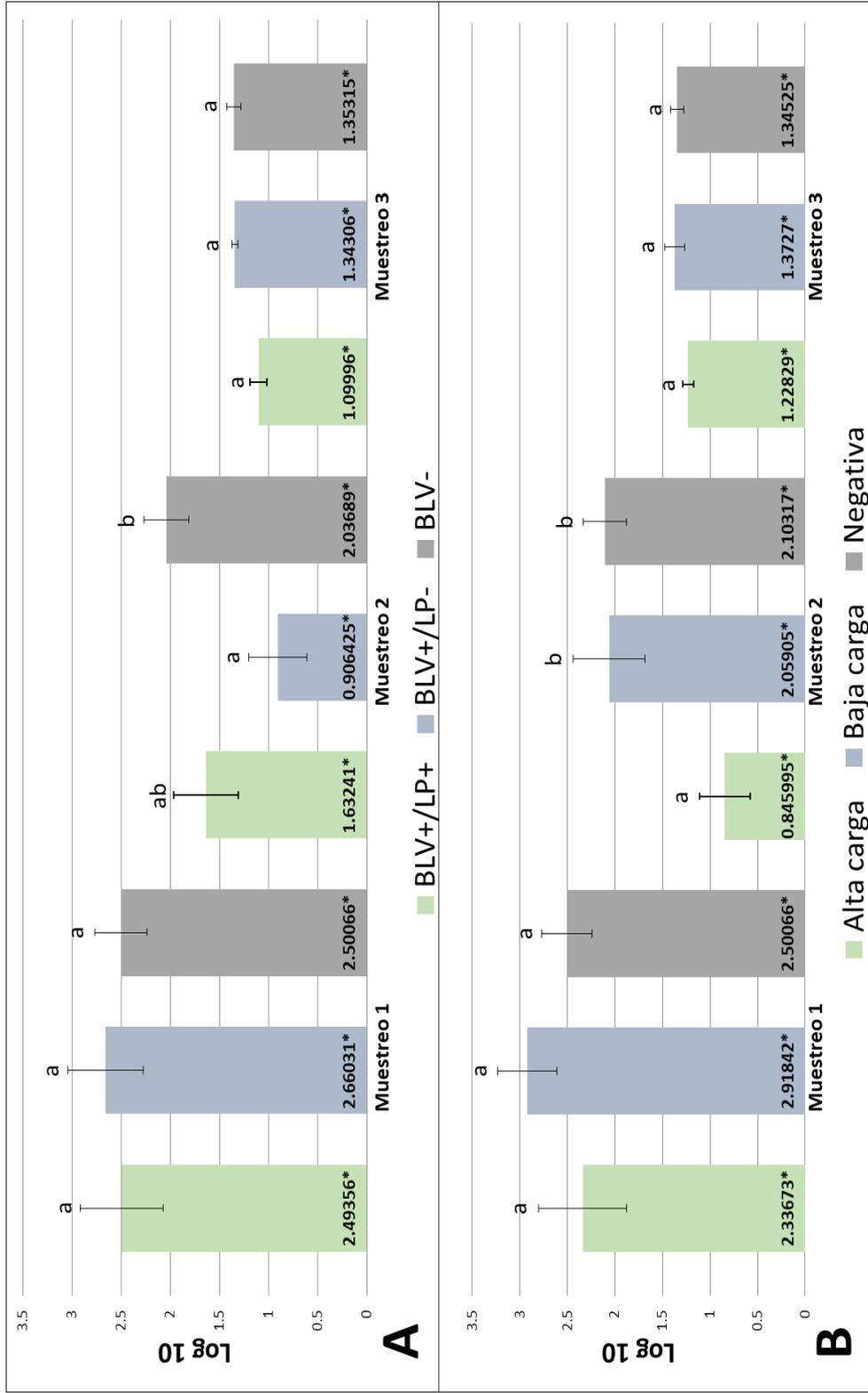


Figura 8. Expresión de TNF- α . **A.** Relación con la LP. **B.** Relación con la carga proviral. Determinación por qPCR. Representación de la media de expresión de TNF- α en Log10 +/- el error estándar. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo ($P < 0.05$).

carga. En el muestreo 2 la expresión de TNF- α es significativamente menor en el grupo de alta carga proviral, entre los grupos de baja carga proviral y negativo a BLV no se observa diferencia estadísticamente significativa entre sí.

- Expresión de IL-4 con relación a la LP

En el muestreo 1 (Fig. 9A), la expresión de IL-4 fue significativamente mayor en el grupo BLV- en comparación con el grupo BLV+/LP+, mientras que no se observó diferencia significativa entre los grupos BLV- y BLV+/LP-. En el muestreo 2 se observa que la expresión es significativamente mayor en el grupo BLV- en comparación con la de los otros dos grupos los cuales no presentan diferencia estadística entre sí. Sin embargo, el grupo BLV+/LP+ presenta el menor promedio de expresión. En el muestreo 3, la expresión fue significativamente menor en el grupo BLV+/LP+ con relación a la que se obtuvo en los otros dos grupos los cuales no presentan diferencia estadística entre sí. No obstante, la mayor expresión se observa que el grupo BLV-.

- Expresión de IL-4 con relación a carga proviral

En la figura 9B se aprecia que en los tres muestreos la expresión de IL-4 fue significativamente mayor en el grupo de baja carga proviral con respecto a la expresión del grupo de alta carga mientras que el grupo negativo no presenta diferencia estadística frente a los otros dos grupos.

- Expresión de IL-10 con relación a la LP

En la figura 10A se aprecia que la expresión de IL-10 significativamente mayor en el grupo de alta carga proviral que la de baja carga en el muestreo 1. En los muestreos 2 y 3 no se observa diferencia estadísticamente significativa entre los

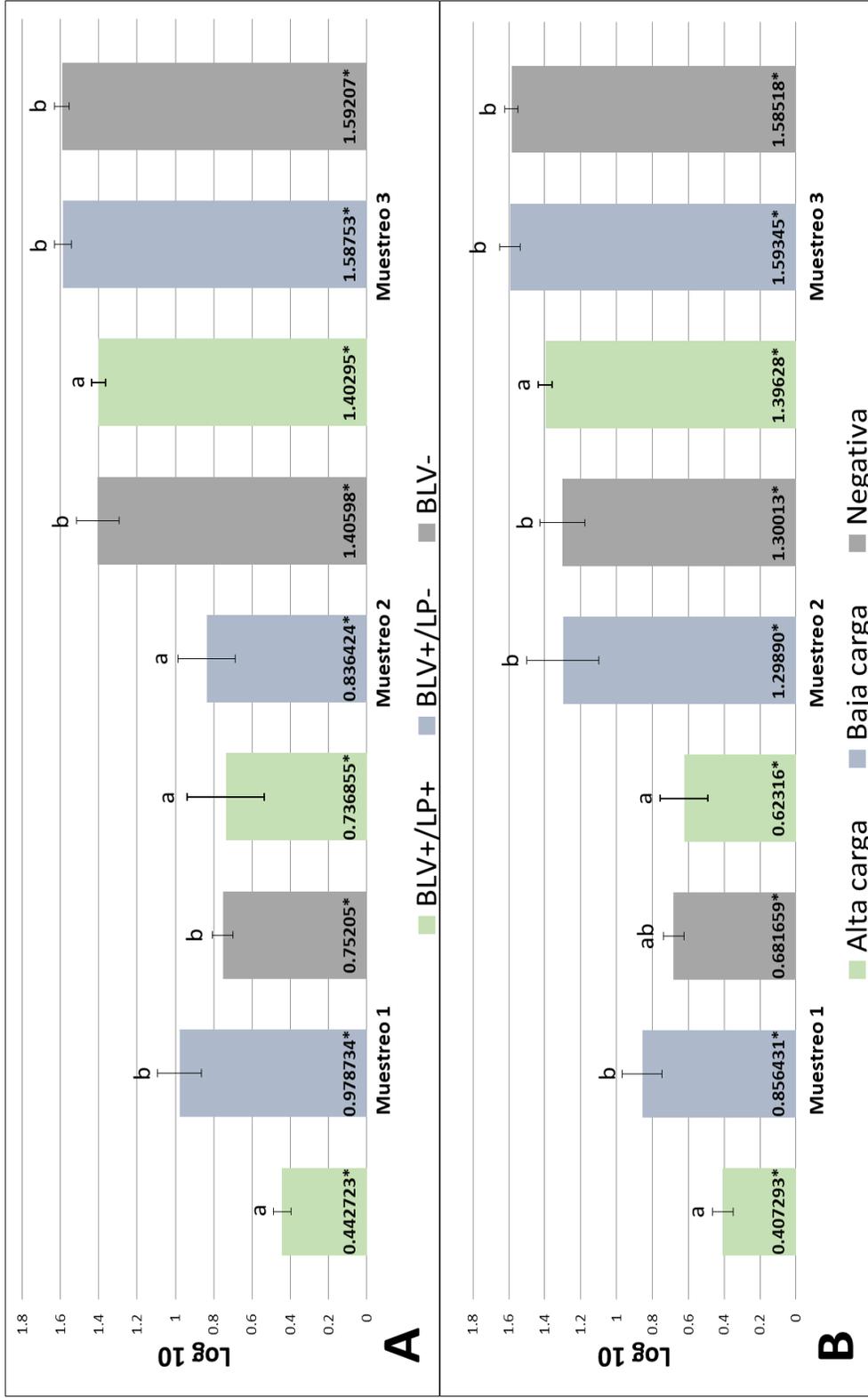


Figura 9. Expresión de IL-4. A. Relación con la carga proviral. B. Relación con la carga proviral. Determinación por qPCR. Representación de la media de expresión de IL-4, en Log₁₀ +/- el error estándar. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo (P<0.05).

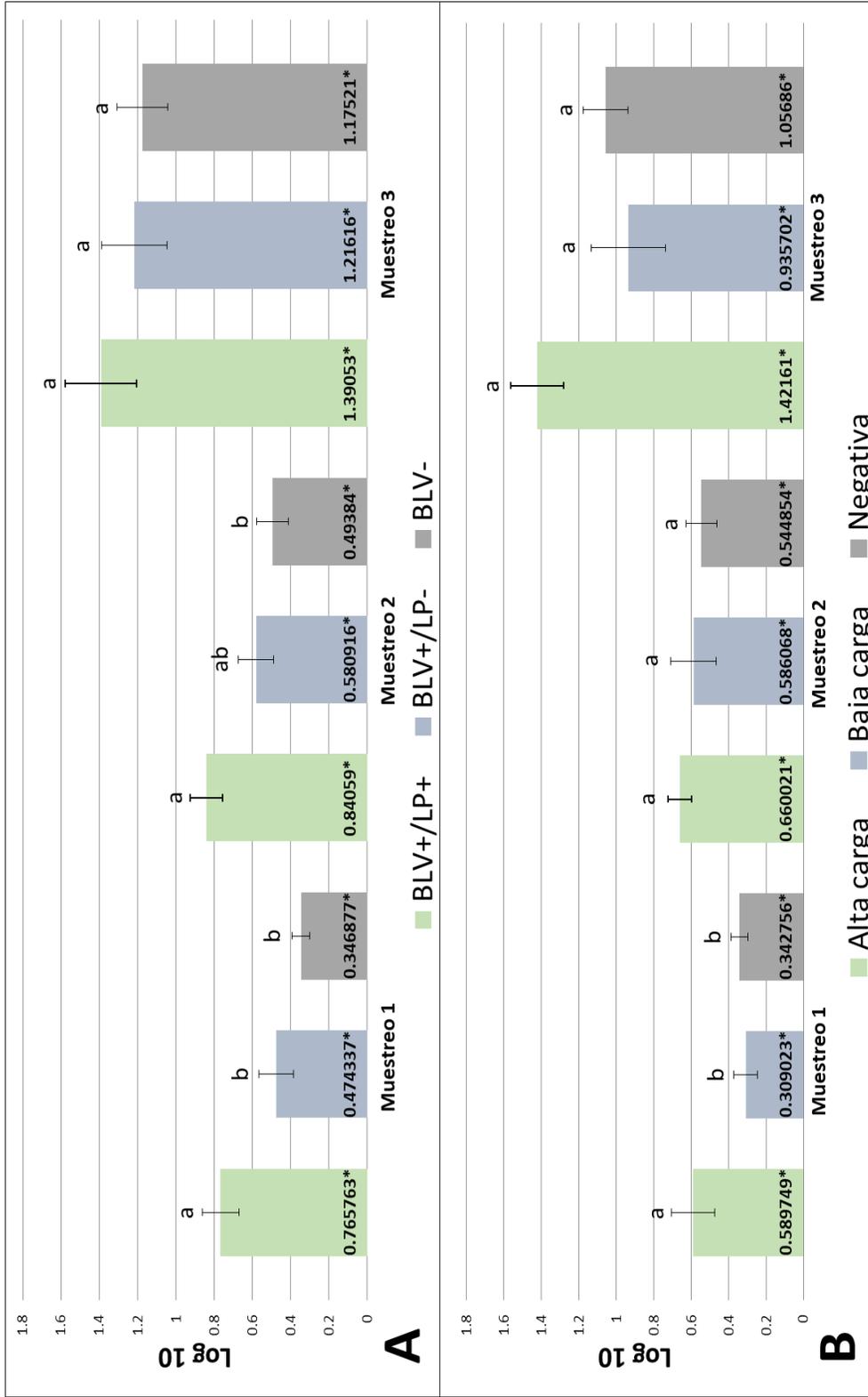


Figura 10. Expresión de IL-10. A. Relación con la carga proviral. **B.** Relación con la carga proviral. Determinación por qPCR. Representación de la media de expresión de IL-10. en Log10 +/- el error estándar. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo ($P < 0.05$).

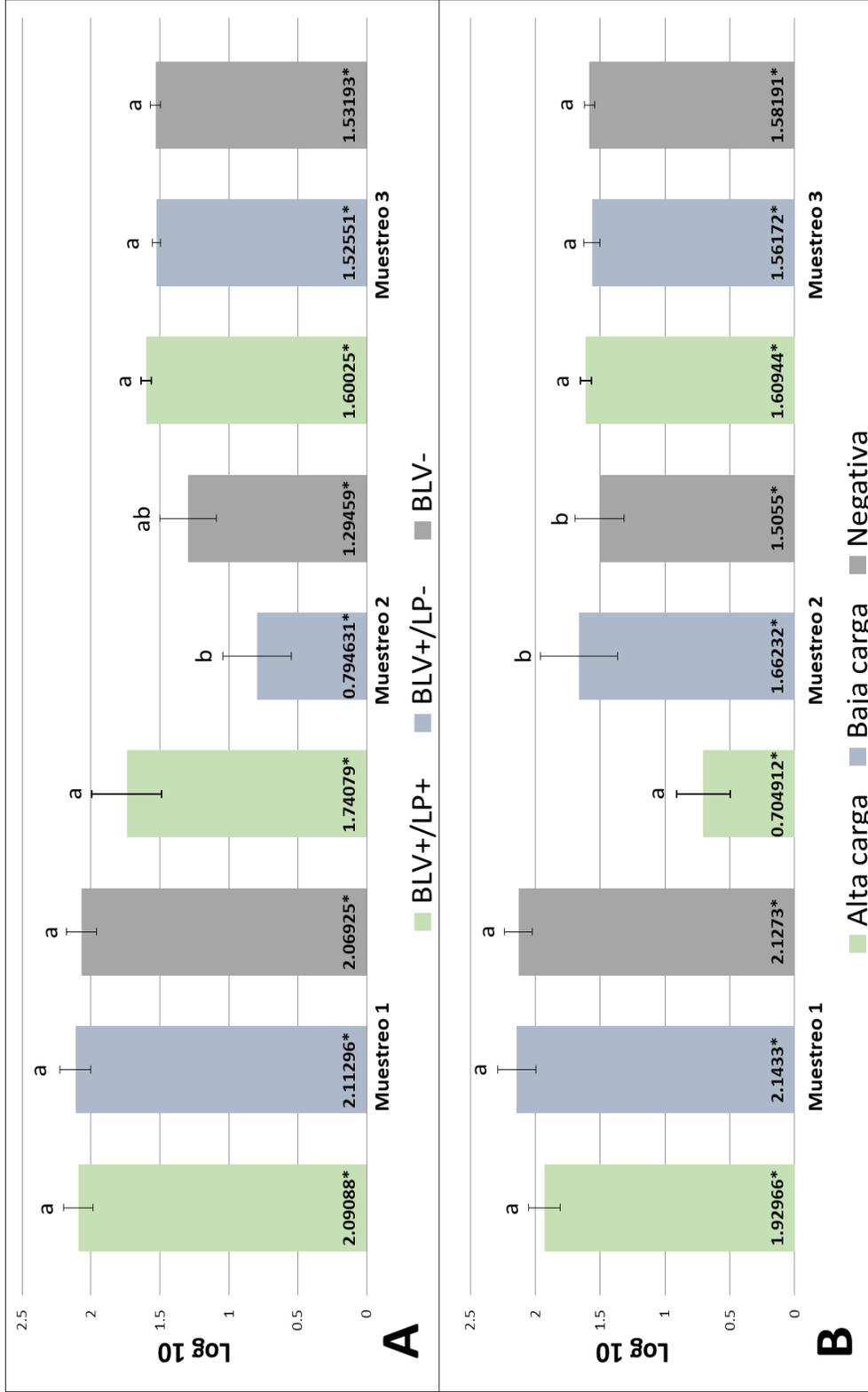


Figura 11. Expresión de TGF- β . A. Relación con la LP. B. Relación con la carga proviral. Determinación por qPCR. Representación de la media de expresión de TGF- β . en Log₁₀ +/- el error estándar. Promedio de cada grupo*. Literales diferentes entre grupos indican diferencia estadística significativa por muestreo (P<0.05).

res grupos. Sin embargo, el mayor promedio de expresión lo presenta el grupo de alta carga.

- Expresión de IL-10 con relación a la carga proviral

En la figura 10B se aprecia que la expresión de IL-10 significativamente mayor en el grupo de alta carga proviral que la de baja carga en el muestreo 1. En los muestreos 2 y 3 no se observa diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos. Sin embargo, el mayor promedio de expresión lo presenta el grupo de alta carga.

- TGF- β con relación a la LP

En el muestreo 1 y 3, (Fig. 11A) no se observa diferencia estadística significativa entre los tres grupos. Sin embargo, en el primer muestreo el grupo BLV+/LP- presenta la mayor expresión mientras que en el tercero la expresión es mayor en grupo BLV+/LP+. En el muestreo 2, el grupo BLV+/LP+ exhibe mayor expresión que el grupo BLV+/LP- la cual es estadísticamente significativa. El grupo BLV- no presenta diferencia estadística significativa en comparación con los otros dos grupos en el muestreo 2 y 3 pero presenta menor expresión en comparación del grupo BLV+/LP+.

- TGF- β con relación a la carga proviral

En el muestreo 1 y 3 (Fig. 11B) no se observa diferencia estadística significativa entre los tres grupos, pero la mayor expresión se aprecia en los grupos de baja carga proviral y negativo al BLV. En el muestreo 2 sólo se observa diferencia estadística significativa entre los grupos de baja carga proviral y alta carga, presentándose mayor expresión en el de baja carga.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó la respuesta inmune celular en vacas infectadas con el BLV mediante la determinación de la expresión de las citocinas seleccionadas para establecer su relación con el desarrollo de LP y la carga proviral. Mundialmente, la prevalencia es variable y exhibe diferencias regionales (Andrews, 2004) ya que puede ser alta en países como Estados Unidos (EU) y Chile, siendo de 83% (USDA-NAHMS, 2007) y entre 57 a 63% (Fermer *et al.*, 2009); respectivamente, mientras que suele ser baja en otros países tales como Camboya y Taiwán (5%), Turquía (17%) y Canadá (25.7%) (Burgu *et al.*, 2005, Meas *et al.*, 2000, Jacobs *et al.*, 1995). Con respecto a la prevalencia de BLV en el complejo ganadero de Tizayuca Hidalgo, esta fue del 73% lo que representa un incremento del 7% con relación a la previamente descrita (66%) en el mismo complejo (Zavaleta, 2009). En este sentido, el incremento de la prevalencia obtenido en nuestro país es similar al observado en EU ya que previamente la prevalencia de LEB se ubicaba en el 66% del total de ganado lechero en los Estados Unidos (Motton y Buehring, 2003).

La presencia de LP+ en el ganado representa un elevado factor de riesgo en la transmisión de la LEB ya que existe un alto porcentaje de linfocitos infectados en sangre periférica (Esteban *et al.*, 1985); sin embargo, los animales que no presentan LP también pueden jugar un papel importante en la transmisión dependiendo de su carga proviral. Aproximadamente el 60% de los animales LP- presentan baja carga proviral, mientras que el 40% restante serán animales con alta carga proviral (Juliarena *et al.*, 2007). En el presente trabajo, a pesar de que se observa que los animales BLV+/LP+ presentan una carga proviral estadísticamente significativa mayor comparado con el grupo BLV+/LP- en los tres muestreos; lo cual concuerda con lo reportado en estudios previos en los que se observó que la carga proviral aumenta en bovinos LP+(Ohnno *et al.*, 2015, Juliarena *et al.*, 2007, Mirsky *et al.*, 1998), en el grupo BLV+/LP- la carga proviral también se incrementó

progresivamente a lo largo de los muestreos. Dicho hallazgo apoya el concepto de que una considerable proporción de ganado negativo a LP puede presentar carga proviral alta como ha sido descrito (Juliarena *et al.*, 2007).

Por otro lado, en los dos primeros muestreos los animales del grupo de alta carga proviral presentaron conteo linfocitarios significativamente mayores que el de los grupos de baja carga proviral y negativos a BLV; indicando una relación directamente proporcional entre la carga proviral y el conteo linfocitario. Sin embargo, en el tercer muestreo las vacas del grupo de baja carga proviral mostraron conteos linfocitarios estadísticamente similares al del grupo de alta carga lo que sugiere un incremento en la carga proviral y una progresión de la enfermedad en el grupo de baja carga lo cual concuerda con lo reportado por Zabaleta (2009) en donde se demostró una correlación estadística entre la presencia de LP y la carga proviral. Los hallazgos obtenidos en el presente estudio son relevantes dado que el desarrollo de LP y una carga proviral alta se consideran indicadores de progresión hacia linfoma ya que los animales que desarrollan LP presentan mayores cargas virales que aquellos negativos a LP (Jimba *et al.*, 2012, Jimba *et al.*, 2010, Juliarena *et al.*, 2007, Ferrer *et al.*, 1979,), indicando que el incremento de la carga proviral está asociado con la severidad de la enfermedad como ha sido descrito (Aida *et al.*, 2013).

Por otro lado, la expresión de citocinas en animales infectados con el BLV también está asociada a la etapa de la enfermedad y la carga proviral. Las citocinas T_H1 presentan menor expresión en animales LP+ mientras que la expresión de IL-10 es mayor (Pyeon *et al.*, 1996, Pyeon *et al.*, 1998). En los resultados del presente trabajo se observa que los animales BLV- presentaban mayor expresión de citocinas T_H1 (IL-12, IFN- γ) y T_H2 (IL-4) en comparación con los animales BLV+/LP+. En el caso de las citocinas Treg (IL-10 y TGF- β) la mayor expresión se observó en el grupo BLV+/LP+ en comparación con los animales BLV-. Yakobson *et al.*, (1998) mencionan que se observa una pérdida predominante en la expresión de citocinas

de respuesta celular (IL-12, IFN- γ e IL-2) y reporta un cambio rápido a la expresión de citocinas de tipo humoral (IL-10) en animales que desarrollaron LP después de la infección por BLV, lo cual coincide con los datos aquí mostrados.

Con respecto a la IL-12, los datos del presente trabajo reflejan que en el tercer muestreo, la relación de la expresión con la carga proviral presentó una expresión significativamente mayor en el grupo negativo a BLV en comparación con el grupo de alta carga proviral mientras que, en el mismo muestreo, con relación a la LP, solo el grupo BLV negativo presentó diferencia con el grupo BLV+/LP+, el grupo BLV+/LP- es similar en la expresión tanto con el grupo BLV+/LP+ como con el negativo a BLV. Lo anterior posiblemente represente que existe relación de la expresión de IL-12 con la progresión de la enfermedad y concuerda con lo reportado en estudios previos en los que se reporta que las vacas negativas exhiben mayor expresión comparado con las vacas infectadas con el BLV (Konnai *et al.*, 2003, Amills *et al.*, 2002, Bracha *et al.*, 1999). Por otro lado, en la IL-12 tiene un papel crítico durante diferentes infecciones y puede regular la eliminación de virus, esto se ha visto en la coriomeningitis linfocítica viral (LCMV) y en citomegalovirus murino (MCMV) en fase aguda (Biron *et al.*, 1995, Trinchieri, 1995), lo cual podría explicar que las vacas con alta carga proviral presentaron menor expresión de IL-12.

La expresión de IFN- γ ; la cual representa la citocina que induce en conjunto con la IL-12 la respuesta T_H1 y mantiene fuertemente dicha respuesta (Abbas, 2004), los datos del presente trabajo muestran que la presencia de LP está significativamente relacionada con una menor expresión de IFN- γ ; posiblemente asociada a la fase temprana de la infección y por parte de la respuesta innata vía células NK (Abbas, 2004), dado que se aprecia desde el inicio del experimento. Lo anterior también coincide con la relación de la alta carga proviral con la disminución en la expresión de IFN- γ y el posterior viraje de la expresión en el tercer muestreo en el que el grupo de alta carga proviral alcanza niveles similares a los otros grupos, sugiriendo que, en la progresión de la enfermedad, el control de la carga proviral se promueve por

medio de la secreción de IFN- γ . En trabajos anteriores, se reporta que el grupo BLV+/LP+ presenta menor expresión de IFN- γ en comparación con animales negativos a BLV (Amills *et al.*, 2002, Konnai *et al.*, 2003, Bracha *et al.*, 1999), concordando con los hallazgos del presente estudio. Además, en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se han informado diferencias en la producción de citocinas asociadas con la progresión de la enfermedad (Clerici *et al.*, 1993) e incremento en la expresión de IFN- γ en personas que no progresaron a SIDA (Benveniste *et al.*, 1996a, 1996b).

Con respecto a la IL-2, se observó una expresión significativamente menor en vacas infectadas tanto positivas o negativas a LP como con alta y baja carga proviral en comparación con las no infectadas. Lo anterior es indicativo de que es el efecto de la infección viral la que regula una menor expresión de esta citocina. Tanto en estudios *in vitro*, como en infecciones naturales lo más común es observar bajos niveles de IL-2 en animales BLV+/LP+ (Amills *et al.*, 2002, Bracha *et al.*, 1999, Yakobson *et al.*, 1998, Pyeon *et al.*, 1996). Aunque la IL-2 originalmente se conoce como un factor de crecimiento de células T también puede promover la proliferación de células B infectadas con BLV (Trueblood *et al.*, 1998) y se han observado niveles elevados tanto de la IL-2 como de sus receptores en cultivos de linfocitos positivos a BLV (Sordillo *et al.*, 1994, Stone *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos en este trabajo contradicen dicha aseveración dado que las vacas sin LP no presentaron incrementos de IL-2.

En la expresión de la IL-4, se observó una expresión significativamente menor tanto en el grupo BLV+/LP+ como en el grupo de alta carga proviral (en los dos últimos muestreos) en comparación con el grupo negativo a BLV; coincidiendo con los resultados que han sido reportado anteriormente (Amills *et al.*, 2002, Fabila, 2012). Este hallazgo indica que la respuesta T_{H2} se encuentra suprimida de mismo modo que la T_{H1} lo cual se describe como una característica común de los trastornos inmunes retrovirales (Clerici *et al.*, 1996, Kelleher *et al.*, 1999).

La inhibición de ambas respuestas (T_H1 y T_H2) es característico del efecto de la presencia de células Treg (Rocanrolo *et al.*, 2006) de las cuales se han identificado al menos dos subpoblaciones de células T con capacidades inmunosupresoras: Tr1 que secretan grandes cantidades de IL-10 y Tr3 caracterizadas por la secreción de TGF- β . Por otro lado, existe una población de células B reguladoras que suprimen las respuestas inmunitarias, se reconocen dos poblaciones, Br1 productoras de IL-10 y Br3 productoras de TGF- β (Matsushita *et al.*, 2010, Groux *et al.*, 1997). Con base a los resultados de este trabajo, dicho efecto inmunosupresor relacionado con la baja expresión de IFN- γ , IL-12 e IL-4 en vacas BLV+/LP+ probablemente está mediado por IL-10 dado que se observó una expresión mayor en el grupo BLV+/LP+ en comparación con el grupo negativo a BLV, siendo estadísticamente significativo en los dos primeros muestreos. Por otro lado, la expresión de IL-10 con relación a la carga proviral también fue mayor en el grupo de alta carga proviral, pero ésta no fue estadísticamente significativa. Existen varios reportes que respaldan que la mayor expresión de IL-10 está relacionada con la progresión hacia a la etapa de LP+ (Amills *et al.*, 2002, Bracha *et al.*, 1999, Yakobson *et al.*, 1998, Pyeon *et al.*, 1996). Por otro lado, en pacientes infectados con VIH, la disminución de IL-10 se ha observado en personas que no progresan hacia SIDA (Benveniste *et al.*, 1996a, 1996b). Posiblemente, la IL-10 puede contribuir a la LP en el ganado BLV+ puesto que esta citocina estimula la replicación del ADN de las células B en humanos (Burdin *et al.*, 1995) y el desarrollo de LP constituye una expansión policlonal de LB (Gillet *et al.*, 2007) que son fenotípicamente similares a las células Breg.

A pesar de que se describe que el aumento en la expresión del factor de transcripción Foxp3 conduce a una función Treg exacerbada que resulta en un incremento en la producción de IL-10 y TGF- β , desencadenando inmunosupresión en pacientes con HTLV (Yamano *et al.*, 2009, Satou *et al.*, 2010, Toulza *et al.*, 2008), los resultados de la expresión de TGF- β en el presente estudio no mostraron cambios significativos entre los grupos tanto con relación a la presencia de LP como con relación a la carga proviral. Únicamente en el segundo muestreo, el grupo

BLV+/LP+ reveló diferencia significativa frente al grupo BLV+/LP- pero fue estadísticamente similar al grupo no infectado y el grupo de alta carga proviral exhibió una expresión significativamente menor con respecto a los otros grupos, siendo estos resultados discordantes ya que como se discutió anteriormente, una alta carga proviral está asociada con altos conteos linfocitarios y, por ende, a la presencia de LP. Dada la relevancia del TGF- β en la respuesta Treg y Breg, el efecto de la expresión de esta citocina debe de establecerse en estudios posteriores, preferentemente con subpoblaciones linfocitarias definidas.

En general, la expresión de TNF- α no presentó cambios significativos entre los grupos, pero se observó una menor expresión tanto en el grupo BLV+/LP+ como en el grupo de alta carga proviral en comparación con los otros grupos. Resultados similares se han reportado anteriormente, se observó que la expresión de TNF- α estaba significativamente aumentada en ovinos negativos a BLV (Kabeya *et al.*, 1999) y, por otro lado, en ovinos susceptibles, se presentó una disminución. Así mismo, se observó un alto nivel de expresión de TNF- α en PBMC de ovinos con alta carga de BLV (Kabeya *et al.*, 2001).

Con base a los hallazgos obtenidos y considerando que la LP representa la expansión policlonal de linfocitos B IgM+ CD5+ cuyo fenotipo es similar al de las células Breg, se sugiere que la LP promueve un enriquecimiento predominante de células Br1 secretoras de alta cantidad de IL-10 lo que contribuye a la inhibición de las respuestas Th1 y Th2.

Finalmente se sugiere que la determinación de la carga proviral es un mejor predictor de la severidad de la enfermedad en comparación con la presencia de LP, ya que para este último tienen que transcurrir tres meses para confirmar el diagnóstico de LP+.

CONCLUSIONES

- La prevalencia de la infección por BLV se ha incrementado en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo y se observa similar a la que se reporta en EU, lo cual puede estar asociado con la relación comercial que se tiene con este país.
- La carga proviral del BLV mantiene una relación directamente proporcional con los conteos leucocitarios y se incrementa durante la progresión de la enfermedad en las vacas infectadas.
- La respuesta inmune celular en vacas infectadas con el BLV positivas a LP y con alta carga proviral se caracteriza por una disminución de las citocinas Th1 (IFN- γ , IL-12, IL-2) y Th2 (IL-4) en bovinos BLV+/LP+; indicativa de inmunosupresión mientras que, en animales infectados sin LP, con baja carga proviral y negativos al BLV, exhiben mayor expresión de dichas citocinas lo que se considera como una respuesta inmune apropiada y rasgos de resistencia a la LEB.
- Los resultados sugieren que el desarrollo de inmunosupresión en vacas infectadas con el BLV está asociado principalmente con incremento en la expresión de IL-10 probablemente por parte de células reguladoras (Tr1 o Br1) mientras que la expresión de TGF- β potencialmente no está relacionada o presenta un papel secundario en dicho proceso.

REFERENCIAS

- Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9th edition. Philadelphia, USA. Ed. Elsevier; 2018.
- Aida Y, Murakami H, Takahshi M, Takeshima S. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*. Review. 2013; 4: 328.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*. 2004; 35: 1592-1600.
- Amills M, Ramiya V, Norimine J, Olmstead CA, Lewin HA. Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4 T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis. *Virology*. 2002; 304: 1-9.
- Andrews AH. 2004. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. 2^o ed. Blackwell Science.
- Asadullah K, Sterry W, Volk H.D. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 241-269.
- Asamblea mundial de delegados de la OIE. CAPÍTULO 2.4.11. Leucosis bovina enzoótica. Mayo de 2012.
- Baltzell K.A, Shen H.M, Krishnamurthy S, Sison J.D, Nuovo G.J, Buehring G.C. Bovine leukemia virus linked to breast cancer bur not coinfection with human papilomavirus: case-control study of women in Texas. *Cancer*. 2018; 214: 1342-9.
- Barros C.S.L, Lemos R.A.A. Leucose Viral Bovina. En: Lemos R.A.A. Principais enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e Diagnóstico. Campo Grande: Univ. Fed. De Ms. 1998; pp. 366-385.
- Bartlett P.C, Norby B, Byrem T.M, Parmelee A, Ledergerber J.T, Erskine R.J. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2013; 96: 1591-1597.

- Bartlett P.C, Sordillo L.M, Byrem T.M, Norby B, Grooms D.L, Swenson C.L, Zalucha J, Erskine R.J. Options for the control bovine leukemia virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2014; 244: 914-922.
- Beagley K.W, Eldridge J.H, Kiyono H, Everson M.P, Koopman W. J, Honjo T, McGhee J.R. Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA- positive Peyer's patch B cells. *J. Immunol.* 141 (6) 1988; 2035-2042.
- Benveniste O, Vaslin B, Le Grand R, Cheret A, Matheux F, Theodore F, Cranage M.P, Dormont D. Comparative (IL)-2/interferón (IFN-) γ and IL-4/IL-10 responses during acute infection of macaques inoculated with attenuated net-transacted or pathogenic SIV mac 251 virus. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1996a; 93: 3658-63.
- Benveniste O, Vaslin B, Le Grand R, Fouchet P, Omessa V, Theodore F, Fretier P, Clayette P, Boussin F, Dormont D. Interleukin 1 β , interleukin 6, tumor necrosis factor α and interleukin 10 responses in peripheral blood mononuclear cells of cynomolgus macaques during acute infection with SIV mac 251. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996b; 12: 241-50.
- Berndt A, Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 78: 143-161.
- Beyer J, Köllner B, Teifne J.P, Starick E, Beier D, Reimann I, Grunwald U, Ziller M. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *J. vet. Med.* 2002; 49 [B]: 270-277.
- Biron, CA, Gazzinelli, RT. IL-12 effects on immune responses to microbial infections: A key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 485-496.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard J.C. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 749-795.

- Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4 and interleukin-10. *Ann. NY Acad. Sci.* 1993; 685; 713-39.
- Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations. 2007.
- Bracha Yakobson, J. Brenner, Hanna Ungar-Waron, Z. Trainin. Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2000; 23: 197-208.
- Bracha, Y, Brenner, J, Hanna, Ungar-Waron, Trainin, Z. Cellular immune response cytokine expression during the initial stage if bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases.* 1999; 23: (2000) 197-208.
- Buehring G.C, Shen H, Schwartz D.A, Lawson J.S. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PLOSE one.* 2017; 12 (6).
- Buehring G.C, Shen H.M, Jensen H.M, Choi Y, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerging Infectious Diseases.* 2014; 20: 772-782.
- Buehring G.C, Shen H.M, Jenses H.M, Jin D.L, Hudes M, Block G. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case control study. *PLOS one.* 2015; 10 (9).
- Burdin N, Kooten C.V, Galibert J, Abrams S, Wijdenes Y, Banchereau Y, Roussett F. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40 activated human B lymphocytes. *J Immunol.* 1995; 154: 2533-44.
- Burgu I, Alkan F, Karaoglu, Bilge-Dagalp S, Can-Sahna K, Güngör B, Demir B. Control and eradication programs of enzootic bovine leucosis (EBL) from selected dairy herds in Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2005; 112: 271-274.

- Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, Hoelzer D, Thiel E. No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology*. 2007; 4:11.
- Burny A, Bruck C, Chantrenne, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Leclercq M, Leunen J, Mammerickx M, Portetelle D, Klein G.O. *Bovine Leukemia Virus: Molecular Biology and Epidemiology*, Raven Press, New York. 1980.
- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 1988; 32: 149-170.
- Butera S.T, Roberts B.D, Folks T.M. Regulation of HIV-1 expression by cytokine networks in a CD4+ model of chronic infection. *J. Immunol.* 1993; 150: 625-634.
- Cantor G.H, Pritchard S.M, Dequiedt F, Willems L, Kettmann R, Davis W.C. 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.* 2000; 75: 1689-1696.
- Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park S.H, Beavis A, Koezuka Y, Bandelac A. Cutting Edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 1999; 163: 4647-4650.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K.J, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 1875-1886.
- Clerici M, Balotta C, Meroni L, Ferrario E, Riva C, Trabattoni D, Ridolfo A, Villa M, Shearer G.M, Morini M, Galli M. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long-term nonprogression in HIV infection. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses.* 1996; 12: 1053-1651.

- Clerici M, Shearer G.M. A Th1-Th2 switch is a critical step in the ethiology of HIV infection. *Immunol Today*. 1993; 14: 107-11.
- Cook LB, Elemans M, Rowan AG, Asquith B. HTLV-1: persistence and pathogenesis. *Virology*. 2013; 435: 131-140.
- Cotmore S.F, Agbandje-Mckenna M, Canuti M, Chiorni J.A, Eis-Hubinger A, Hughes J, Mietzsch M, Modha S, Ogliastro M, Pénzes J.J, Pintel D.J, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijseen P, and ICTV Report Consortium, (2019) ICTV Virus Taxonomy.
- Dai Y.C, Zhong J, Xu J.F. Regulatory B cells in infectious disease (Review). *Mol Med Rep*. 2017; 16(1): 3-10.
- Dequiedt F, Hanon E, Kerkhofs P, Pastoret P, Portetelle D, Burny A, Kettmann R, Williems L. Both wild-type and strongly attenuated bovine leukemia viruses protect peripheral blood mononuclear cells from apoptosis. *J. Virol*. 1997; 71: 630-369.
- Emanuelson U, Scherling K, Pettersson, H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med*. 1992; 12: 121–131
- Erskine R.J, Barlett T.M, Byrem C.L, Render C.F, Houseman J.T. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci*. 2012; 95: 727-734.
- Erskine R.J, Bartlett P.C, Sabo K.M, Sordillo L.M. Bovine leukemia virus infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5 Escherichia coli bacterin. *Vet. Med. Int*. 2011; 915747.
- Esteban E.N, Thorn R, Ferrer J.F. Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukaemia virus. *Cancer Res*. 1985; 45: 3225-3230.
- Fabila A. R. 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). [Tesis de maestría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.

- Fargeas C, Wu C.Y, Nakajima T, Cox D, Nutman T, Delespesse G. Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1992; 22; 2173-76.
- Fermer R, Zúñiga J, López A, Miranda H. Prevalence and space distribution of brucellosis, bovine leukemia, bovine viral diarrhea and infectious bovine rhinotracheitis by using bulk milk ELISA test in dairy herds of the IX Region, Chile. *Med. Vet.* 2009; 41: 17-26.
- Ferrer J.F, Marshak R.R, Abt D.A, Kenyon S.J. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis: a review. *J. Am. Vet. Med Assoc.* 1979; 7: 705-708.
- Ferrer J.F, Marshak R.R, Abt D.A, Kenyon S.Y. Persistent lymphocytosis in cattle: Its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann. Rech. Vet.* 1978; 9: 851-857.
- Florins A, Boxus M, Vandermeers F, Verlaeten O, Bouzar A, Defoiche J, Hubaux R, Burny A, Kettmann R, Willems L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. *Vet. Immunol and Immunopath.* 2008; 125: 1-7.
- Fontenot J.D, Rasmussen J.P. Williams L.M, Dooley J.L, Farr A.G, Rudensky A.Y. Regulatory T cell lineage specification by forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity.* 2005a; 22: 329-41.
- Fontenot J.D, Rudensky A.Y. A well-adapted regulatory contrivance. Regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 2005b; 6: 331-7.
- Freund Y.R, Sgarlato G, Jacob C.O, Suzuki Y. Remington J.S. Polymorphisms in the tumor necrosis factor Alpha (TNF-alpha) gene correlate with murine resistance to development of toxoplasmic encephalitis and with

levels of TNF-alpha mRNA in infected brain tissue. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 683-688.

- Frie M.C, Coussens P.M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2014.
- Frucht D.M, Fukao T, Bogdan C, Shindler H, O'Shea J.J, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends immunol.* 2001; 22: 556-560.
- Fukao T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol* 2000; 164: 64-71.
- Gatti M. Leucosis bovina, enfermedad de gran importancia y limitante para la exportación de ganado en pie. Laboratorios Santa Elena, Uruguay. Sitio Argentino de producción animal. 2007.
- Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expresión in macrophages and its posible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9; 117-123.
- Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar A.B, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology.* 2007; 4: 18.
- Giovanna M, Ulloa J.C, Uribe A.M, Guiterrez M.F. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. *Open Journal of Medical Microbiology.* 2013; 3: 84-90.
- Graves D.C, Ferrer J.F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.* 1976; 36: 4252-4159.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries J.E. Rocanolo, MG. A CD4+ T cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997; 389: 737-42.

- Hamilton V.T, Stone D.M, Cantor G.H. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology*. 2003; 315: 135-47.
- Harris D.P, Haynes L, Sayles P.C, Duso D.K, Eaton S.M, Lepak N.M, Johnson L.L, Swain S.L, Lund F.E. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol*. 2000; 1; 475-482.
- Heinecke C.N. Detección molecular y genotipificación del virus de la leucemia bovina en los estados de Hidalgo, Jalisco y México. [Tesis de licenciatura]. México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
- Hiroi T, Yanagita M, Lijima H, Iwatani K, Yoshida T, Takatsu K, Kiyono H. Deficiency of IL-5 receptor alpha-chain selectively influences the development of the common mucosal immune system independent IgA-producing B-1 cell in mucosa-associated tissues. *J. Immunol*. 162 (2) 1999; 821-828.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003; 299: 1057-1061.
- Jacobs R.M, Pollar F.L, McNab W.B et al. Serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, productions records, and managements practices. *Can J. Vet. Res*. 1995; 59: 271-278.
- Jimba M, Takeshima S.N, Matoba K, Endoh D, Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR: quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology* 2010; 7; 91.
- Jimba M, Takeshima S.N, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsuhashi T, Ohmori T, Nunoya T, Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet Res* 2012; 8 (1): 167.
- Johnson R, Kaneene J.B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull*. 1992; 62: 287-312.

- Josefowicz S.Z, Wilson C.B, Rudensky A.Y. Cutting Edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J. Immunol.* 2009; 182: 6648-52.
- Juliarena M.A, Gutierrez S.E, Ceriani C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am. J. Vet. Res.* 2007; 68: 1220-1225.
- Juliarena M.A, Lendez P.A, Gutierrez S.E. Forletti A, Rensetti D.E, Ceriani M.C. Partial molecular characterization of different proviral strains of bovine leukemia virus. *Arch. Virol.* 2013; 158: 63-70.
- Juliarena MA, Poli M, Ceriani C, Sala L, Rodríguez E, Gutierrez S, Dolcini G, Odeon A, Esteban E.N. 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.* 2009; 92: 375-381.
- Kabeya H, Fukuda A, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. Tumor necrosis factor Alpha and its receptors in experimentally bovine leukemia virus-infected sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001; 81: 129-139.
- Kabeya H, Ohashi K, Oyunbileg N, Nagaoka Y, Aida Y, Sugimoto C, Yokomizo Y, Onuma M. Up-regulation of tumor necrosis factor Alpha mRNA is associated with bovine-leukemia virus (BLV) elimination in the early phase of infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999; 68: 255-265.
- Kelleher, P, Maroof, A, Knight, SC. Retrovirally induced switch from production of IL-12 to IL-4 in dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 2309-2318.
- Kettmann R, Burny A, Callenbaut I, Droogmans L, Mammerckx M, Willems I, Portelle D. Bovine leukemia virus. En: J.A. Levy (ed.) *The Retroviridae* plenum press, New York, N.Y. 1994; pp 39-81.
- Kettmann R, Deschamps J, Cleuter Y, Couez D, Burny A, Marbaix G. Leukemogenesis by bovine leukemia virus: Proviral integration and lack of

RNA expression of viral long terminal repeat and 3'proximate cellular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. 1982; 79: 2465-2469.

- Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M. et al. Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. 1976; 73: 1014-1018.
- Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M. Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. *Virology*. 2005; 339: 239-248.
- Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet. Micro*. 2003; 94: 283-294.
- Lairmore M.D. Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus type-1: Insights in transmission and pathogenesis. *Annu. Rev. Anim. Biosci*. 2014; 2: 189-208.
- Lavanya M, Kinet S, Montel-Hagen A, Mongellaz C, Battini JL, Sitbon M, Taylor N. Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. *J. Immunol*. 2008; 181: 891-898.
- Lee L.C, Scarratt W.K, Buehring G.C. Saunders G.K. Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma, *Can. Vet. J*. 2012; 53: 283-286.
- Lewinsky M.K, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, Berry C.C, Ecker J.R, Bushman F. D. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Patho*. 2006; 2: e60.
- Llamas L, Goyache J, Domenech A, Arjona A, Suarez G, Gomez-Lucia E. Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J. Clin. Virol*. 2001; 22: 31-39.
- Locksley R.M, Killeen N, Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104: 487-501.

- Lucey D.R. Evolution of the type-1 (Th1)-type-2 (Th2) cytokine paradigm. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1999; 13: 1-9 v.
- Matsouka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene.* 2011; 30: 1379-1389.
- Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder T.F. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol.* 2010; 185: 2240-52.
- Matulova M, Stepanova H, Sisak F, Havlickova H, Havlickova H, Faldynova M, Kyrova K, Volf J, Rychlik. Cytokine signaling in splenic leukocytes from vaccinated and non-vaccinated chickens after intravenous infection with *Salmonella enteritidis*. *PLoS One.* 2012; 7: e32346.
- Meas S, Ohashi K, Tum S, Chhin M, Te K, Miura K, Sugimoto C, Onuma M. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J. Vet. Med. Sci.* 2000; 62: 779-781).
- Mirsky M.L, Olmstead C, Da Y, Lewin H.A. Reduced bovine leukemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Anim Genet.* 1998; 29: 245-252.
- Motton D, Buehring G. Bovine Leukemia Virus Alters Growth Properties and Casein Synthesis in Mammary Epithelial Cells. *J. Dairy Sci.* 2003. 86:2826–2838.
- Noh G, Lee J.H. Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011; 3: 168-177.
- Noh J, Choi W.S, Noh G, Lee J.H. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B cells in human peripheral blood mononuclear cells: human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cells (Breg). *Immune Netw* 2010a; 10: 247-249.

- Noh J, Lee J.H, Noh G, Bang S.Y, Kim H.S, Choi W.S, Cho S, Lee S.S. Characterisation of allergen-specific responses of IL-10 producing regulatory B cells (Br1) in cow milk allergy. *Cell Immunol.* 2010b; 264: 143-9.
- Norby B, Bartlett P.C, Byrem T.M, Erskine R.J. Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2016; 99: 2043-2052.
- Ohnno A, Takeshima S, Matsumoto Y, Aida Y. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Research.* 2015; 210: 283-290.
- Orloff S, Wallingford J, McDougal J. Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J. Hum Lact* 1993; 9: 13-17.
- Ott S.L, Johson R, Wells S.J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med.* 2003; 61: 249-62.
- Parekh V.V, Prasad D.V, Banerjee P.P, Joshi B.N, Kumar A, and Mishra G.C. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *J. Immunol.* 2003; 170; 5897-5911.
- Parodi AI: Pathology of enzootic bovine leukosis. *Conf ISCAH*, 1985.
- Peeters M, Delaporte E. Simian retroviruses in africanus pes. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 514-520.
- Perzova R.N, Loghran T.P, Dube S, Ferrer J, Esteban E, Poiesz B.J. Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2000; 109: 64-70.
- Ploegh H.L. Viral strategies of immune invasion, *Science.* 1998; 280: 248-53.
- Pyeon D, O'Reilly K, Splitter GA. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotoxic animals infected with bovine leukemia virus. *J. Virol.* 1996; 70: 5706-5710.

- Pyeon D, Splitter G.A. Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. *J. Virol* 1998; 70: 5706-5710.
- Radostits O.M, Gay C.C, Blood D.C, Hinchcliff K.W. *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9a ed. Madrid, España. Mc Graw Hill-Interamericana. 2002; Pp 1534: 1971-1974.
- Rainard P, Riollot C. Innate immunity of bovine mammary gland. *Vet. Res.* 2006; 37: 369-400.
- Robinson L.A, Jaing C.J, Pierce Campbell C, Magliocco A, Xiong Y, Magliocco G, Thissen J.B, Antonia S. Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. *Br J Cancer.* 2016; 115: 497-504.
- Rocanolo M.G, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings M.K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006; 212:28-50.
- Rodríguez S.M, Florins A. Gillet N, de Brogniez A, Sanchez-Alcaraz M.T, Boxus M, Boulanger F, Gutierrez G, Trono K, Alvarez I. et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses.* 2011; 3: 1210-1248.
- Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflammatory Bowel Dis.* 1999; 5: 285-294.
- Rusov V, Milojevic Z, Stojanovic L. Occurrence of mastitis and sanitary-hygienic quality of milk of cows infected with enzootic leukosis. *Vet. Glas.* 1994; 48: 303-308.
- Sandev N, Koleva M, Binev R, Ilieva D. Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of lactation. *Vet. Arch.* 2004; 74 (6): 411-416.

- Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: How the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *J. Clin. Exp. Hematop.* 2010; 50; 1-8.
- Schwartz I, Levy D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res.* 1994b; 25: 521-36.
- Schwartz I.A, Bensaïd B, Polack B, Perrin M, Berthelemy, Levy D. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J. Virol.* 1994a; 68; 4589-4596.
- Sen G.C. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 55; 255-281.
- Sledge D.G, Maes R, Wise A, Kiupel M, Fitzgerald S.D. Coinfection of a cow with bovine leukemia virus and *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diag. Investig.* 2009; 21: 878-882.
- Sordillo L.M, Hicks C.R, Pighetti G.M. Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus infected cattle. *Proc Soc Exp Biol Med Sos Exp Med* 1994; 207: 268-273.
- Stoddart M.J. Mammalian cell viability: methods and protocols New York (NY): Humana Press. 2011. (pp. 1-7).
- Stone D.M, Hof A. J, and Davis W.C. Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MCH class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytopenic cows. *Vet. Immunol. Immunolathol.* 1995; 48; 65-76.
- Storan E.R, O'Gorman S.M, McDonald I.D, Steinhoff M. Role of Cytokines and Chemokines in itch. *Pharmacology.* 2015; 226.
- Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell.* 1993; 73: 5-8.
- The U.S. Department of Agriculture (USDA). Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations. 2007.
- Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, and Kaufman D.L. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and

prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 2001; 167; 1081-1089.

- Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor G.P, Bangham C.R. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: Inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood* 2008; 111; 5047-5053.
- Trainin Z, Brenner J, Meirum R, Ungar-Waron H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 54: 293-302.
- Trinchieri G. Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-Helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. Review. *Blood journal.* 2019.
- Trinchieri G. Interleukin-12: A pro-inflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity. *Ann. Rev. Immunol.* 1995; 13: 251-276.
- Trueblood E.S, Brown W.C, Palmer G.H, Davis W.C, Stone D.M, and McElwain T.F. B-lymphocyte proliferations during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *J. Virol.* 1998; 72; 3169-3177.
- Van Dyken S.J, Locksley R.M. Interleukin-4 and interleukin-13- mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Ann Rev Immunol.* 2013; 31: 317-43.
- Vanleeuwen J.A, Haddad J.P, Dohoo J.R, Keefe G.P, Tiwari A, Tremblay R. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 2010; 94: 54-64.
- Wang J, Boyer D, Ugen K, Srikantan V, Ayyavoo V, Agadjanyan M, Williams W, Newman M, Coney L, Carrano R, Weiner D.B. Nucleic-acid based immunization against HIV-1: induction of protective in vivo immune responses. *AIDS (Suppl. AI 5159).* 1995; 9.

- Watanabe R. et al. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* 2007; 171: 560-570.
- Wellenberg G.J, Van Der Poel, W.H.M, VanOirschot J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet. Microbiol.* 2002; 88: 27-45.
- Wynn T.A. IL.13 Effector Functions. *Annual review of immunology.* 2003; 21 (1), 425-456.
- Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z. 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.* 2000; 23: 197-208.
- YaKobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Training Z. Short-termed expresion of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 64: 207-218.
- Yamano Y, Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Azakami K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Yagishita N, et al. Abnormally high levels of virus-infected IFN- γ +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS ONE.* 2009: 4.
- Yang Y, Fan W, Mao Y, Yang Z, Lu G, Zhang R, Zhang H, Szeto C, Wang C. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: association with reduced milk production and increased somatic cell score. *J. Dairy Sci.* 2016; 99: 3688-3697.
- Yuan X, Malek T.R. Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Review. Human Immunology.* 2012; 73: 773-782.
- Zavaleta J.N.H. Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB). [Tesis de maestría]. México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.

- Zwirner N.W, Domaica C.I. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors*. 2010; 36: 274-288.