



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 en vacas infectadas por el virus de la leucemia bovina y tipificación de BoLA-DRB 3.2 para la determinación de alelos de resistencia”

TESIS

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

PRESENTA

ERNESTO MARÍN FLAMAND

TUTOR PRINCIPAL:

PHD. LUCIA ANGELICA GARCÍA CAMACHO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, ABRIL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

- A mi madre, por siempre apoyarme, guiarme y amarme, sin ti y tu guía nunca habría llegado hasta aquí, te amo y te extraño, ¡gracias por todo mamá!
- A mi padre, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente, en cada uno de los proyectos de mi vida, en realidad “el poeta eres tú”.
- A mi hermana, en realidad eres mi persona favorita, gracias por todo tu amor y por ser unas de las razones por las que hago todo en la vida, ¡te amo muchacha!
- A mi futura esposa Nayeli, por ser la luz que ilumina mi camino y ser mi compañera de vida, cuidarme en los momentos más difíciles y hacerme sentir profundamente amado, gracias, amor, te amo con toda mi alma, “Eres el destino que siempre soñé”
- A la Dra. Lucia Angélica García Camacho, por ser mi guía y madre académica, por aconsejarme y enseñarme, usted es la responsable de que todo esto sea posible, ¡muchas gracias!
- A mis amigos Víctor, Omar, Roy, Alex y Ángel, Cynthia, Emma, Jesica, Gerardo, Yeri, Leo, Vic, Blanca, Carlitos, Christian, Michele, Rodolfo y Lilia porque siempre me han apoyado tanto en las alegrías, tristezas y momentos difíciles, no tengo palabras para agradecer todo lo que hacen por mí, tengo la enorme suerte de que sean parte de mi vida y agradezco poder compartir la existencia con ustedes.
- Al Dr. Eugenio L. Flamand y Rodríguez por ser la persona que me acerco a la medicina y la ciencia y me hizo amarlas, por ser siempre mi guía y ejemplo para seguir, ¡te extraño mucho tío!

AGRADECIMIENTOS.

- Este proyecto fue apoyado y financiado por: Proyecto DGAPA-UNAM (PAPIIT IN228416) y el Laboratorio A: Patología Molecular Veterinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM.
- Al programa de becas CONACYT, por su compromiso en el apoyo a los estudiantes de posgrado.
- A las miembros del comité tutor y al jurado del examen de grado, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dra. Marcela Autrán Martínez, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y el Dr. José Francisco Montiel Sosa por todas sus aportaciones y comentarios, que permitieron enriquecer este trabajo.
- Al Dr. Ruperto Javier Hernández Balderas por su amistad y apoyo que fueron esenciales para la realización de este trabajo.
- Al Dr. Hugo Ramírez Álvarez por todas sus aportaciones que siempre han enriquecido mi formación académica, así como este trabajo.

RESUMEN.

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un *Deltaretrovirus* que infecta naturalmente ganado bovino, promoviendo linfocitosis persistente (LP), misma que se reconoce como un rasgo de susceptibilidad a la leucosis enzoótica bovina (LEB), y presenta relación directa con títulos de anticuerpos altos y la carga proviral BLV alta. Se menciona que la respuesta inmune celular es atípica y conduce a inmunosupresión. La LP en bovinos ha sido utilizada para la determinación de alelos de los antígenos de histocompatibilidad DRB-3.2 (BoLA-DRB3.2) con rasgos asociados a resistencia o susceptibilidad a la leucosis enzoótica bovina. Con el fin de evaluar la relación de la LP, los títulos de anticuerpos y la carga proviral con la expresión de IL12, IFN γ , IL2, IL4, IL10 y TGF β y su posible relación con alelos de resistencia y susceptibilidad en el gen BoLA-DRB3.2, se seleccionaron 58 vacas (30 BLV⁺ y 28 BLV⁻) de un hato lechero de alta prevalencia para realizar tres muestreos de sangre mensuales para la determinación de conteos linfocitarios, títulos de anticuerpos, carga proviral de BLV, expresión de IL12, IFN γ , IL2, IL4, IL10 y TGF β y genotipificación del gen BoLA-DRB3.2. Al término del tercer muestreo, las vacas infectadas con BLV se agruparon según el estatus de LP, carga proviral de BLV y títulos de anticuerpos contra BLV de la siguiente manera: BLV⁺LP⁺/n = 16 y BLV⁺LP⁻/n = 14; alta carga proviral (ACP)/n = 17 y baja carga proviral (BCP)/n = 13; altos títulos de anticuerpos (ATA)/n = 17 y bajos títulos de anticuerpos (BTA)/n = 13. Se encontró que las vacas BLV⁺ LP⁺ mostraron una carga proviral y títulos de anticuerpos significativamente más altos que el grupo BLV⁺LP⁻, la carga proviral sugirió progresión, presumiblemente no relacionada con el desarrollo del linfoma, puesto que las vacas LP⁻ exhibieron incrementos de carga proviral en el último muestreo. Los resultados indican que un alto título de anticuerpos está asociado con susceptibilidad, ya que está ligado con la presencia de LP⁺ y un perfil de citocinas compatible con supresión inmune. Esto último

puede estar asociado con la reversión hacia menor título de anticuerpos en vacas con mayor carga viral, dado que se observó en el tercer muestreo. En los grupos con BLV⁺LP⁺, ATA y ACP, se observó una expresión significativamente mayor de IL10 y TGFβ, asociada con reducción en la expresión de IL-12, IFN-γ, IL-2 e IL-4 a lo largo del experimento que la de los grupos restantes. Lo anterior sugiere, una supresión de la respuesta inmune inducida por IL10 y TGFβ. La expresión de IL10, mostró incrementos sostenidos, posiblemente asociados con la progresión de la enfermedad como se describe.

Se postula que la expansión proliferativa de linfocitos, conocida como LP podría incrementar la población de células B reguladoras secretoras de IL10 y TGFβ, puesto que presentan un fenotipo similar a la de las células blanco de la infección, lo que a su vez induce diferenciación de células T reguladoras, que en conjunto contribuyen a la supresión inmunológica. Se deben realizar más estudios sobre los tipos de células reguladoras involucradas en la supresión inmune, inducida por BLV. El análisis de los productos BoLA mostro que los animales estudiados presentaron una amplia diversidad alélica, y se encontró que los motivos de resistencia y susceptibilidad se encontraron presentes principalmente en el bolsillo 4, concretamente en las posiciones 70-71, 74 y 78 en las cuales se encontraron motivos de resistencia (TL/77-78, L/78, K /71, EK/70-71 y E/74) y susceptibilidad (TV/77-78), V/78, Y/78, RR/70-71, K/71 y Y/78), adicionalmente se encontraron motivos de resistencia en la posición 57 del bolsillo 9 (D/57), en la posición 30 del bolsillo 6 (Y/30) y en la posición 86 del bolsillo 1 (V/86), todo esto demuestra que la ausencia o presencia de estos motivos influyen en el desarrollo y resistencia a la BLV, por otro lado se analizó la carga electrostática del bolsillo 4 y los resultados indican que los animales BLV⁺LP⁺ presentan unca carga positiva a diferencia de los animales BLV⁺LP⁻ y BLV⁻ que presentan una carga negativa, esta diferencia en las cargas del bolsillo influye en la conformación de la

hendidura así como en el acomodo del antígeno para su posterior presentación. Estos hallazgos son de suma importancia porque pueden ser utilizados como estrategia de selección genética para combatir la enfermedad.

ÍNDICE

Contenido	Página
Dedicatorias.....	1
Agradecimientos.....	2
Resumen	3
Abreviaturas	7
Introducción	
Antecedentes.....	8
Hipótesis	21
Objetivos	22
Metodología	23
Diseño experimental	23
Hematología	23
Serología.....	24
Separación de PBMC y estimulación de células	25
Extracción de ADN y ARN.....	25
Iniciadores	26
PCR punto final	26
Retrotranscripción	27
PCR cuantitativa (qPCR)	28
Método de cuantificación	28
Genotipificación	29
Determinación de alelos y análisis de motivos.....	30
Modelaje de proteínas, cálculo de SASA y potencial electrostático	31
Análisis estadístico	31
Resultados	32
Discusión	52
Conclusiones	63
Referencias	65
Apéndice 1.....	74

ABREVIATURAS

°C = Grados centígrados.

μl = Microlitros.

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

ADNc = Ácido desoxirribonucleico complementario.

AGID = Inmunodifusión en gel de agar.

APC = Células presentadoras de antígeno profesionales.

ARN = Ácido ribonucleico.

BLV = Virus de la leucosis bovina.

CA = Cápside.

CAIT = Centro agropecuario e industrial de Tizayuca.

cbp = Cuanto baste para.

dNTP = Deoxinucleótidos.

E.coli. = Escherichia coli.

ELISA = Inmunoensayo ligado a enzimas.

env = Envoltura.

HPRT = Hipoxantín-guanífosforiltransferasa.

HRM = Desnaturalización de alta resolución

HTLV = Virus T-linfotrópico humano.

IFN-γ = Interferón gamma.

IL = Interleucina

IN = Integrasa.

LB = Linfocito B.

LBreg = Linfocito B regulador.

LEB = Leucosis enzoótica bovina.

LP = Linfocitosis persistente.

LPS = Lipopolisacáridos.

LT = Linfocito T.

LTH1 = Linfocito TH1.

LTH2 = Linfocito TH2.

LTreg = Linfocito T regulador.

MA = Matriz.

MgCl₂ = Cloruro de magnesio.

MHC-II = Complejo mayor de histocompatibilidad dos.

min = Minuto.

ml = Mililitros.

mM = Milimolar.

NC = Nucleocápside.

NK = Célula asesina natural.

nm = Nanómetros.

pb = Pares de bases.

PBMC = Células mononucleares de sangre periférica.

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa.

pm = Peso molecular.

pmol = Picomolar

qPCR = Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

rpm = Revoluciones por minuto.

seg = Segundos.

TGF-β = Factor de crecimiento transformante beta

TNF = Factor de necrosis tumoral.

RT = Transcriptasa reversa.

U = Unidades.

Ug = Microgramos.

INTRODUCCION

Antecedentes

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es una de las 117 enfermedades de la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), fundada como Organización Internacional de epizootias (OIE) incluida en el Código Terrestre, que pueden tener un alto impacto en la sanidad del ganado y la salud pública y repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal (Thiermann, 2015, <https://www.woah.org/2022>). 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. Posteriormente la enfermedad se propagó hacia el oeste y finalmente hacia diferentes partes del mundo (Burny et al., 1988). La enfermedad es causada por la infección por el virus de la leucemia bovina (Bovine leukemia virus [BLV], por sus siglas en inglés) tiene alta prevalencia, de aproximadamente el 66% del total de ganado lechero en los Estados Unidos (Motton & Buehring, 2003). La prevalencia real del BLV en nuestro país se desconoce ya que en la mayoría de las explotaciones no se realiza el diagnóstico rutinario. Sin embargo, en estudios realizados en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT) se ha determinado una prevalencia del 66% (Favila de Alba, 2014; Zavaleta H, 2009).

Virus de la leucemia bovina

El BLV con base en el comité internacional de taxonomía viral (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], por sus siglas en inglés), es un virus oncogénico ARN del género δ -retrovirus que infecta naturalmente al ganado bovino (Lefkowitz et al., 2018) que

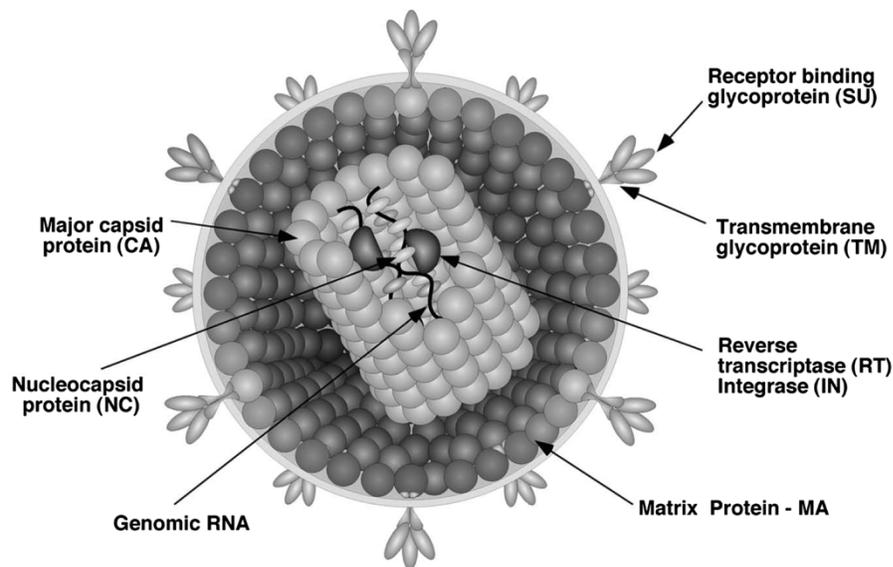
también puede transmitirse experimentalmente a ovejas, cabras o alpacas (Lee et al., 2012; Rodríguez et al., 2011). Recientemente, el ICTV reclasificó al BLV con este nuevo código: *Riboviria/Pararnavirae/Artverviricota/Revtraviricetes/Ortervirales/Retroviridae/Orthoretrovirinae/Deltaretrovirus/Bovine leukemia virus* (Walker et al., 2022)

Los virus de la familia *Retroviridae*, son virus ARN que se caracterizan por poseer una transcriptasa reversa (reverse transcriptase [RT] por sus siglas en inglés), para convertir su ARN viral en ADN. para integrarse en el genoma del hospedero utilizando una enzima denominada integrasa. La forma integrada de un retrovirus se denomina provirus. De este modo, los genes de estos provirus son expresados por mecanismos celulares para la síntesis de nuevas partículas virales (Gillet et al., 2007).

El BLV comparte su organización genómica con los virus linfotrópicos de células T de humanos (HTLV-1 y HTLV-2) y de simios (STLV-1, STLV-2 y STLV-3) (ICTV, 2019). Los virus integrantes del género *Deltaretrovirus* son capaces de regular la expresión de sus propios genes, mediante la síntesis de proteínas reguladoras expresadas a partir de su propio genoma. Esta propiedad es conferida por una región genómica ubicada entre el gen *env* y las secuencias terminales repetitivas largas 3' (long terminal repeats [LTR] por sus siglas en inglés). Esta característica se comparte con todos los lentivirus que provocan inmunodeficiencia en humanos (VIH), simios (VIS), bovinos (VIB) y felinos (VIF). (Lefkowitz et al., 2018).

La partícula viral tiene un diámetro de entre 60 y 125 nm. Bajo el microscopio electrónico se observa un núcleo central electrodensado rodeado por una envoltura celular con proteínas virales (Gillet et al., 2007). El virión presenta en su interior dos copias de genoma de ARN, simple hebra de polaridad positiva, de 8700 nucleótidos aproximadamente. Las proteínas de

cápside (CA), también denominada p24, conforman la cápside que contiene el ARN viral en interacción con proteínas de la nucleocápside (NC), que corresponde a la p12). Se requieren dos proteínas enzimáticas, RT e integrasa (IN) para la transcripción reversa y la integración del genoma viral en el genoma de la célula blanco mismas que también se ubican empaquetadas dentro de la cápside. 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 (gp) virales insertadas la gp de superficie (SU) denominada gp51 y la gp30 de transmembrana (TM) misma que intervendrán en el reconocimiento, la adsorción y la penetración a su célula blanco (Barez et al., 2015; Coffin et al., 1997; Gillet et al., 2007; Varmus, 1988) (Esquema 1).



Esquema 1. Estructura de la partícula viral del BLV modificado de Coffin, J. M., Hughes, S. H., & Varmus, H. E. (Eds.). (1997). Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Leucosis enzoótica bovina

En infecciones de campo, la mayoría de los animales infectados (65-70%) por el BLV permanecen asintomáticos y aproximadamente un tercio desarrolla linfocitosis persistente (LP), que se define como un incremento en el número absoluto de linfocitos circulantes de

tres o más desviaciones estándar sobre el intervalo normal (7,500/ μ l) que persiste por más de tres meses. Sólo una pequeña proporción del ganado infectado (5–10%) desarrollará linfoma (Ferrer et al., 1978; Xu et al., 1993). 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., 1976; Llames et al., 2001). Sin embargo, la LP está presente en la mayoría de los casos por lo que es considerado un rasgo de susceptibilidad.

Las células blanco para la infección por el BLV son los linfocitos B que expresan en su superficie IgM⁺, CD5⁺, CD11b⁺ y MHCII⁺ (Gillet et al., 2007) cuya expansión policlonal establece el desarrollo de LP (Cantor et al., 2001; Florins et al., 2008; Konnai et al., 2005; Lavanya et al., 2008). Debido a que el BLV afecta principalmente a los linfocitos B, se indica que la infección induce inmunosupresión, principalmente de la respuesta humoral (Emanuelson et al., 1992). Este efecto es más pronunciado en animales con LP (Trainin et al., 1996).

Transmisión

El contagio se produce por traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano mediante transmisión horizontal o vertical. En las secreciones y fluidos biológicos como leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen y orina se pueden llegar a encontrar linfocitos infectados por lo que estos fluidos representan 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, entre otros, que se practiquen sin tomar las medidas higiénicas necesarias son una importante forma de diseminación de la enfermedad (Gillet et al., 2007).

Por lo anterior, 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 los cuales además presentan un alto número de copias províricas (Juliarena et al., 2016; Lewin et al., 1988; Mirsky et al., 1998; Yakobson et al., 2000)

Implicaciones inmunológicas del BLV

Los trastornos inmunes retrovirales tienen en común el desarrollo de respuestas TH1 y TH2 inapropiadas (Yakobson 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. La viremia se puede identificar de 10 a 12 días post-infección (Schwartz & Levy, 1994) después de la cual se genera una respuesta inmune persistente, aunque ya no se pueden detectar viriones en los órganos de los animales infectados (Blagitz et al., 2017)

El ganado desarrolla una respuesta serológica entre 2 a 8 semanas post-infección (Burng, 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 son seroneutralizantes reconociendo los epítomos de gp51 y p24 expresados en 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, los anticuerpos derivados de la inmunidad pasiva 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). Se ha sugerido que después de la infección, los niveles de anticuerpos están relacionados con la carga viral (Gillet et al., 2007; Juliarena et al., 2009).

Por otro lado, una baja respuesta inmune celular está asociada con la progresión hacia LP (Pyeon et al., 1996). La expresión de citocinas TH1 (IL12, IFN- γ , IL2) se reporta más alta en animales que no desarrollan linfocitosis persistente (Konnai et al., 2005; Pyeon et al., 1996; Yakobson et al., 2000) y de manera opuesta, bovinos infectados con LP ha exhibido incrementos en la expresión de IL10 (Amills et al., 2002; Yakobson et al., 2000). Así mismo, se ha descrito que, en etapas iniciales de la infección, la expresión del tipo de citocinas es un factor determinante para el desarrollo de LP (Yakobson et al., 2000).

Por lo anterior, en estudios preliminares realizados en el CAIT, México se determinó que la carga viral del BLV presentó una relación estadísticamente significativa con LP y que vacas negativas al BLV permanecieron sin infección a todo lo largo del experimento, sugiriendo la presencia de factores de resistencia (Zavaleta H, 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. Por otro lado, la expresión de citocinas (IL12, IFN γ , IL4 e IL10) fue más baja en los grupos BLV⁺/LP⁺ y BLV⁺/LP⁻ que en el grupo BLV⁻, siendo estadísticamente significativa para IL10 e IL12, lo cual es sugestivo de inmunosupresión (Favila de Alba, 2014).. Los resultados sugieren que una expansión policlonal de células B IgM⁺, CD5⁺ (indicativo de LP), promueven 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 Las Breg secretan IL10 y TGF β e inducen la diferenciación de células Treg, promoviendo inmunosupresión (Noh & Lee, 2011). Dicha hipótesis puede ser validada

mediante la evaluación del perfil completo de las citocinas involucradas sugestivo de una respuesta de células Breg y Treg, así como, la determinación de subpoblaciones de LB y LT para validar la presencia de células Breg y Treg en la infección por el BLV.

Tomando en cuenta que no existe tratamiento y vacuna disponible para la LEB (Thiermann, 2015, <https://www.woah.org/2022>) su control depende principalmente del diagnóstico temprano de la infección y eliminación de animales positivos (Kuczewski et al., 2021; Ruggiero et al., 2019) Así mismo, la selección de animales con mayor resistencia a la LEB puede contribuir al control de la infección, principalmente mediante la identificación de marcadores genéticos de rasgos responsables de la inmunidad (Xu et al., 1993).

Entre estos marcadores, se destacan los genes de los antígenos linfocíticos bovinos (bovine lymphocyte antigen [BoLA], por sus siglas en inglés) que codifican al complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex [MHC] por sus siglas en inglés) MHC) los cuales presentan alto grado de polimorfismo (Carignano et al., 2017; Lo et al., 2020, 2021; Xu et al., 1993; Yoshida et al., 2009)

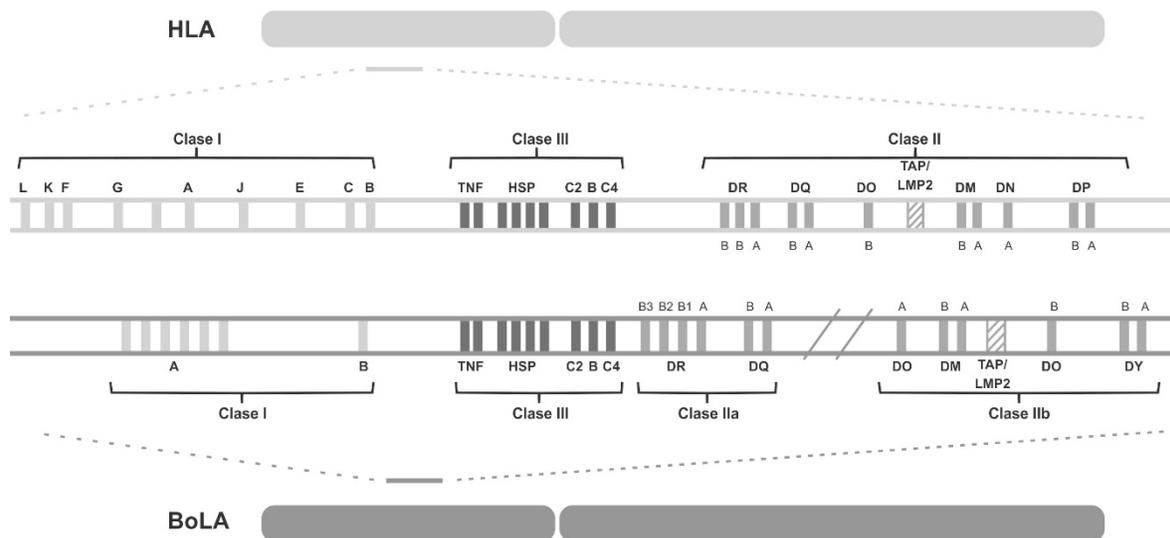
El complejo mayor de histocompatibilidad de los bovinos

El MHC es una parte fundamental del sistema inmune de la mayoría de los vertebrados. (Edwards & Hedrick, 1998). Es uno de los más importantes sistemas de genes responsables de la resistencia a agentes infecciosos en los vertebrados (Hedrick et al., 2000; Hill, 1998). La estructura, función y diversidad son de suma importancia para el discernimiento de la respuesta inmune en las diferentes especies. Existen tres grupos de antígenos de histocompatibilidad, la clase I, clase II y clase III. Las moléculas de la clase I (MHC-I) consisten en una cadena alfa con un peso molecular de 45kDa (cadena pesada) asociada no covalentemente con una Beta microglobulina B2 de 12kDa. El MHC-I consiste en moléculas

que se expresan en todas las células nucleadas, y su principal función es presentar péptidos procesados, derivados de antígenos endógenos, a los linfocitos T CD8⁺ los cuales destruyen células infectadas por el virus y neoplásicas. La clase II (MHC-II) está formada por la asociación no covalente de una cadena A y una B que están codificadas en diversos genes del MCH con un peso molecular de 33 kDa y 28 kDa, respectivamente. El MHC-II se expresa en las células presentadoras de antígenos profesionales (Antigen presenting cells [APCs] por sus siglas en inglés), tales como las células dendríticas, los macrófagos y linfocitos B activados. Las APC internalizan antígenos exógenos (ruta endocítica) para ser procesados. De este modo, los péptidos resultantes son presentados en el contexto del MHC-II a los linfocitos T CD4⁺ los cuales, una vez estimulados, activan macrófagos y linfocitos B para generar respuestas inflamatorias y de anticuerpos. Las moléculas de la clase III incluyen productos asociados a procesos inmunológicos, tales como componentes del complemento, hidrolasas esteroides y el factor de necrosis tumoral/TNF (Owen et al., 2013).

Los genes del BoLA (MCH bovino) se encuentran en el cromosoma 23 (Fries et al., 1986, 1993) a diferencia del MCH de humanos (HLA) y del de roedores (H-2) (Behl et al., 2012; Lewin H, 1996) dado que estos se localizan en el cromosoma 6 y 17 respectivamente. El tamaño completo de la región del MHC-I oscila entre 770Kb a 1650 Kb mientras que el MHC-II se procede de dos locus ligeramente ligados (BoLA-A y BoLA-B) de 200Kb (Amills et al., 1998; Behl et al., 2012; Lewin H, 1996). Así mismo, la organización del MHC de los rumiantes difiere del ratón y el humano principalmente dado que la región del MHC-II se subdivide en dos subregiones separadas por al menos 15cM desde DYA en la clase IIb a la región DRB3 de la clase IIa. La clase IIa comprende dos clústers de genes, DR y DQ, estas regiones tienen una contigua proximidad y están ligados a los genes de la clase III y I,

como sucede en sus homólogos humanos (Gwakisa et al., 1994; van Eijk et al., 1995) (Esquema 2). La región de la clase IIb incluye los genes DMA, DMB, LMP2, LMP7 y TAP, que están involucrados en el procesamiento y transporte de antígenos (Davies et al., 1997; Lewin H, 1996; Russell et al., 2004) y otros genes tipo-clase II como son el DNA, DOB, DIB DYB y El DYB que tienen una función desconocida hasta el momento (Lewin H, 1996). Si bien los genes del BoLA existen como un sistema, están organizados en clústers por lo que algunos locus están estrechamente ligados a otros que están relativamente distantes, por lo que variaciones significativas se han observado en la recombinación entre DRB3 y DYB, lo anterior sugiere la presencia de recombinaciones polimórficas, inserciones o rearrreglos cromosomales en estas regiones. Se menciona que en los genes del MHC-I no se modifican por recombinación (Behl et al., 2012)



Esquema 2. Organización genética del HLA y BoLA modificado de Gutiérrez, S E, et al. "Major histocompatibility complex-associated resistance to infectious diseases: the case of bovine leukemia virus infection." Trends and advances in veterinary genetics 65804 (2017).

Con respecto a los genes DR clase o subregión IIa, el gen DRA codifica la cadena α de la molécula DR (BoLA-DRA), la cual se ha considerado por mucho tiempo monomórfica con un solo alelo reportado. Sin embargo, se han demostrado 3 polimorfismos de un solo

nucleótido (SNP) dado que existe variación en los alelos en el segundo exón del DRA (Zhou et al., 2007)

En contraste, los genes que codifican la cadena β de la molécula DR son altamente polimórficos, este polimorfismo se concentra principalmente en el segundo exón, el cual codifica la región variable del sitio de unión con el péptido, en las vacas existen al menos tres locus DRB pero solo el DRB3 es funcional, el DRB1 es un pseudo gen que contiene codones para en la cadena B1 tras membranal y el DRB2 tiene una expresión muy baja y es monomórfico (Behl et al., 2012).

BoLA-DRB3.2

El estudio del polimorfismo del locus DRB3 es de gran importancia ya que esta región está presente en el sitio de presentación del antígeno y la variabilidad en esta región puede estar relacionada con la variabilidad en la espontaneidad inmune de diferentes individuos a patógenos particulares.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación y la secuenciación se han utilizados para definir la organización del gen DRB3. Se ha estimado que el tamaño de la región de codificación es de aproximadamente 11.4 Kbp y contiene la región promotora, el gen DRB3 y la región de 3' (Russell et al., 2004). El BoLA DRB3.2, es el segundo exón del tercer gen bovino DRB (DRB3), responsable del dominio β 1 del único gen DRB mismo que es ampliamente expresado en el ganado bovino. Se han realizado gran cantidad de estudios de tipificación, para determinar la variabilidad genética existente en el DRB3.2 en varias razas de ganado de todo el mundo, en los que se han reportado, un alto grado de polimorfismo en este locus, así como un amplio espectro de alelos y frecuencias de genes que varían entre sí (Behl et al., 2012; Carignano et al., 2017; Lo et al., 2020, 2021; Sharif et al., 2000; van Eijk et al., 1992; Xu et al., 1993; Yoshida et al., 2009; Zanotti et al., 1996). Hasta el momento,

se han identificado más de 380 alelos del exón 2 del gen BoLA-DRB como sucede paralelamente para el gen HLA-DRB1 que cuenta con más de 290 alelos identificados (da Mota et al., 2004).

En este locus, se han encontrado algunos de los alelos asociados con resistencia a la infección por el BLV con base en la ocurrencia de LP (van Eijk et al., 1992; Xu et al., 1993; Zanotti et al., 1996). Adicionalmente, se ha encontrado asociación entre las secuencias de aminoácidos en la posición 70-71 (motivos ER) del BoLA-DRB3.2, en alelos potencialmente resistentes debido a su asociación a la ausencia de LP, postulándose que la eliminación de un solo aminoácido en esta secuencia (localizado en el sitio de unión del antígeno) afecta la unión del péptido lo que puede tener fuertes repercusiones en el establecimiento de una respuesta inmune (Xu et al., 1993). Los individuos que llevan el motivo ER de resistencia también muestran una reducción significativa en la carga proviral del BLV (Mirsky et al., 1998). Por tanto, la tipificación del locus del BoLA-DRB3 puede ayudar a la identificación de haplotipos para la resistencia al BLV y puede representar un método general de selección genética para la resistencia a diversas enfermedades de importancia en bovinos debido a que los MHC clase II son responsables de las diferencias entre los individuos en la respuesta inmune a los agentes infecciosos (Behl, et al., 2007).

El BoLA es altamente polimórfico (Amills et al., 1998; Behl et al., 2012; da Mota et al., 2004; Lewin H, 1996; Russell et al., 2004; Zanotti et al., 1996; Zhou et al., 2007) por tal motivo, varios estudios se han enfocado en identificar las variaciones presentes en el locus BoLA-DRB3. Hasta la fecha, en la base de datos de polimorfismos inmunes (Immuno-Polymorphism Database- MHC [IPD-MHC], por sus siglas en inglés: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA/>, consultada en julio de 2022) se han registrado alrededor de 384 alelos diferentes (Robinson et al., 2009).

Con respecto a la infección por el BLV, la carga proviral y el desarrollo de la linfocitosis persistente están íntimamente relacionados con la respuesta inmune del huésped. Las células infectadas y transformadas por el BLV pueden ser eliminadas por linfocitos citotóxicos CD8⁺ vía reconocimiento del péptido presentado en las moléculas del MHC-I. Por tanto, la presentación de antígenos mediada por los diferentes alelos del MHC-II afectan directamente la respuesta antiviral del huésped. Por tal motivo, se ha investigado la asociación de los alelos del BoLA DRB-3 con base al hallazgo de LP, carga proviral y la progresión a linfoma para establecer rasgos de resistencia y susceptibilidad (Carignano et al., 2017; Lo et al., 2020, Xu et al., 1993; Zanotti et al., 1996). La LP es el criterio más documentado, dado puesto que ha mostrado una fuerte relación con la resistencia a la enfermedad.

El sitio en el que se reconocen los antígenos está formado por una hendidura que presenta una base β -plegada y dos paredes integradas por hélices α . Esta hendidura contiene 5 bolsillos (pockets) denominados P1, P4, P6, P7, y P9 los cuales representan cavidades en la superficie o el interior de la proteína que conforman los sitios de unión (binding pockets). Por tanto, su interacción con el péptido a presentar es crucial para la integración específica y la flexibilidad del mismo con la estructura del MHC-II. De este modo, los residuos o motivos de los aminoácidos que rodean o conforman el sitio de unión determinan la características bioquímicas y fisicoquímicas y su funcionalidad (Stank et al., 2016; Takeshima et al., 2009), influyendo críticamente en la eficiencia de la unión del péptido al sitio de reconocimiento, así como la abundancia y calidad de la respuesta inmune del huésped a los agentes infecciosos (Baxter et al., 2009; Lo et al., 2021; Yoshida et al., 2009).

La variabilidad genética dentro del MHC se determina por un gran número de alelos, presencia de varias copias de cada gen, así como variaciones alélicas en las regiones de control de la expresión. Por otro lado, es importante recordar que la resistencia genética es

un rasgo multigénico, es decir, determinado por diversos genes, entre los cuales se encuentran los del MHC. El polimorfismo de estos genes determina la diversidad de las proteínas codificadas de la respuesta inmune, y tendría como consecuencia la variación genotípica en la resistencia/susceptibilidad. De ahí que los loci del MHC constituyen los principales genes candidatos para el estudio de asociación entre marcadores genéticos de resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en la evaluación de la respuesta inmune relacionada con el desarrollo de LP durante la infección por el BLV, así como los motivos presentes en los bolsillos (P1, P4, P6, P7, y P9) del BoLA-DRB3.2, sus características fisicoquímicas y su relación con resistencia o susceptibilidad a la enfermedad con base al hallazgo LP y carga viral en vacas infectadas por el BLV.

HIPÓTESIS

1. La carga proviral alta y/o títulos altos de anticuerpos tendrán relación significativa con el hallazgo de LP.
2. La expresión alta de IL10 y TGF β mostrará relación significativa con la presencia de LP y estará vinculado con la disminución de IL12, IFN γ , IL2 e IL4, indicativo de modulación negativa de la respuestas Th1 y Th2.
3. La ausencia o presencia de LP, mostrara asociación con motivos distintivos de los bolsillos P1, P4, P6, P7, y P9 indicando potencial resistencia y susceptibilidad, respectivamente, a la infección por BLV.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la respuesta inmune y los polimorfismos en el locus de BoLA-DRB3.2 en hatos con alta prevalencia de leucosis enzoótica bovina para la detección de alelos resistentes o de susceptibilidad a la infección por el virus de la Leucemia Bovina (BLV).

Objetivos particulares

- Seleccionar vacas lecheras de un hato con alta prevalencia del BLV con base a su estatus de infección.
- Determinar el estatus de linfocitosis persistente (LP) en los animales seleccionados.
- Determinar la carga proviral en las vacas seleccionadas para determinar su relación con la presencia de LP.
- Determinar los títulos de anticuerpos en vacas seleccionadas para determinar su relación con la carga proviral de BLV y la presencia de LP.
- Determinar la expresión de IL4, IL10, TGF β , IL12, IL2, e interferón gamma (IFN γ) en la población de vacas BLV- y BLV+ seleccionadas para determinar su relación con la carga proviral de BLV, el título de anticuerpos y la presencia de LP.
- Estandarizar e implementar ensayos de genotipificación de alelos de BoLA-DRB3 para la detección de polimorfismos de resistencia y susceptibilidad.
- Determinar la frecuencia de alelos de BoLA-DRB3.2 en los animales seleccionados.
- Evaluar la relación de los polimorfismos del BoLA-DRB3.2 asociados a LP con base en los residuos de aminoácidos de los bolsillos (P4) para la determinación de alelos de susceptibilidad o resistencia a la infección por el BLV.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

Se muestrearon al azar 155 vacas de segundo y tercer parto procedentes de un hato con alta prevalencia de LEB ubicado en el CAIT (Centro agropecuario e industrial de Tizayuca) para la genotipificación de BoLA-DRB3.2 y determinación del estatus de infección por el BLV. Posteriormente, se seleccionaron 28 vacas BLV⁻ y 30 vacas BLV⁺, para conformar la población experimental, de esta, se realizaron 3 muestreos mensuales de sangre para la determinación del estatus de linfocitosis persistente (LP), carga proviral del BLV, títulos de anticuerpos frente al BLV y expresión de citocinas.

Al tercer mes se conformaron tres grupos de animales con base a la LP de la siguiente manera: BLV⁺LP⁺ (n = 16), BLV⁺LP⁻ (n = 14) and BLV⁻ (n = 28). Así mismo, se estableció el valor limítrofe superior de los parámetros de carga proviral y título de anticuerpos para agrupar a la población experimental de la siguiente manera: Alta carga proviral (ACP)/n = 17, baja carga proviral (BCP)/n = 13 y BLV negativos (BLV⁻) /n = 28; Alto título de anticuerpos (ATA)/n = 17, bajo título de anticuerpos (BTA)/n = 13 and BLV negativos (BLV⁻)/n = 28, respectivamente. Para el análisis de los polimorfismos presentes en los motivos de los bolsillos P1, P4, P6, P7, y P9 y el modelaje proteico, se seleccionaron al azar 10 vacas de cada grupo conformado con base al estatus de LP.

Hematología

En cada muestreo mensual, el conteo total de leucocitos se realizó por métodos automatizados (Abacus Junior Vet®) mientras que el conteo diferencial se ejecutó en frotis de sangre teñidos con Wright para calcular el número absoluto de linfocitos siguiendo una

metodología de rutina. (Stoddart, 2011). La determinación de LP se estableció al término de los tres muestreos para cubrir el criterio diagnóstico, utilizando un valor de corte 7500 linfocitos/ μ l (Juliarena et al., 2007, Lewin et al., 1988 y Takezawa et al., 2021).

Serología

Se utilizó un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del BLV en microplaca de 96 pozos siguiendo las indicaciones del fabricante (VMRD Inc., Pullaman, WA. USA). Se realizó una dilución de 1/50 para la determinación del título de anticuerpos. Cada placa con antígeno incluyó un suero control positivo, dos sueros controles negativos, incluidos en el paquete de reactivos y un pozo blanco de reactivos. La lectura y registro de la prueba se realizó inmediatamente después de la aplicación de la solución de “paro” en un lector de ELISA (Stat Fax 3200 Awareness Technology) a una longitud de onda de 620 nm para determinar la densidad óptica (DO).

Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos se transformaron a relación muestra a positivo (Sample to Positive Ratio [S/P] por sus siglas en inglés) como lo describe Yahara et al., 2002 utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Relación S/P} = \frac{\text{DO de la muestra} - \text{DO del control negativo}}{\text{DO del control positivo} - \text{DO del control negativo}}$$

Posteriormente, se determinó el valor del límite superior empleando la media del S/P más 1.0 desviación estándar de todas las muestras del M1. El valor obtenido fue S/P = 1.992 con el cual se conformaron 3 grupos: Alto título de anticuerpos (ATA)/n = 17, bajo título de anticuerpos (BTA)/n = 13 and BLV negativos (BLV⁻)/n = 28.

Separación y estimulación de células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por diferencia de gradientes. Las muestras de sangre completa se diluyeron 1/2 (500 μ l de sangre con 500 μ l de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en un microtubo estéril de 1.5 ml. Posteriormente, esta solución se depositó suavemente sobre 500 μ l de solución con densidad de 1.077 ± 0.001 (HISTOPAQUE 1077, Sigma, Saint Louis Missouri, USA) contenido 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 PBS durante 10 min a 400 g. Una porción de las PBMC fue preservada a -20°C y otra fue estimulada con lipopolisacárido (LPS) en microplacas de 96 pozos, depositando 50 μ l de las células en suspensión, 50 μ l del mitógeno (LPS) y 100 μ l 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 CO_2 por 48 horas para su posterior extracción de ARN.

Extracción de ADN y ARN

A las PBMC obtenidas se les realizó la extracción de ADN mediante kits de reactivos comerciales (One-4-All Genomic DNA Mini-Preps Kit Bio basic, Canadá) y Trizol (tiocianato de guanidina/fenol-cloroformo, USA). A partir de las PBMC estimuladas con LPS se realizó la extracción de ARN mediante equipos de reactivos comerciales (RNA Mini-Preps Super Kit Bio basic, Canadá inc) así como con Trizol (tiocianato de guanidina/fenol-cloroformo USA). En ambos casos se determinó la concentración mediante espectrofotometría (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts,

USA) y se ajustó la concentración de ADN y ARN a 100 ng/μl, acto seguido, las alícuotas se conservaron a -20 y -70°C, respectivamente.

Iniciadores

Se utilizaron los iniciadores previamente validados para la amplificación del BLV, IL4, IL10 e IFN-γ (Fabila, 2015) y se diseñaron iniciadores específicos para IL2, TNF-α y TGF-β con base a secuencias obtenidas del GenBank, utilizando el programa Primer3 (Untergasser A., 2013) generando iniciadores que amplifican productos de 100 a 250 pares de bases (pb). Así como se utilizaron iniciadores previamente descritos para la genotipificación del BOLA-DRB3 (van Eijk et al., 1992), (Tabla 1).

PCR punto final

La determinación del estatus de infección por BLV se realizó por PCR punto final, utilizando ADN genómico. Se emplearon iniciadores que amplifican productos específicos de 674 pb (Tabla 1) pertenecientes al gen *env* (gp30) (Heinecke et al., 2017). La amplificación se realizó en reacciones de 50 μl en microtubos 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. finalmente, se realizó una elongación de 72°C durante 7 minutos, posteriormente se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, para observar un producto de 674 pb positivo a BLV.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para amplificación por PCR convencional y qPCR

Iniciador	Secuencia	T° alineación	Tamaño del producto (pb)	Gen Bank Posición / N° Accesoión
BLVenv/F-5852	ACGCTTGATCACAGCAATTA	52°C	674	5852-6525/ K_02120
BLVenv/R-6525	TCTCTGCGCTACACTCAGTC			
BLVpol/F-6473	GGCGATTTCTGCAGCTGTGCTAA	60°C	199	6473-6671/AF_033818
BLVpol/R-6671	AACCTCTGAGCCACAACCTTCCTT			
HPRT/F-182	TTGCCGACCTGTTGGATTAC	50°C	229	182-410/ AF_176419
HPRT/R-410	TTGACCAAGGCAAGCAAAGT			
IFN γ /F-983	CCACTACTTTGATGGCATGT	60°C	106	983-1088 / NM_174086
IFN γ /R-1088	TGAAGCGCCAGGTATAAGG			
IL12/F-643	AGCTTGAGCACAGGGAGTA	60°C	110	643-752 / NM_174645
IL12/R-752	TGCACAGTTCTACCACGA			
IL2/F-245	GCCCAAGGTTAACGCTACAG	60°C	104	245-348 / NM_180997
IL2/R-348	GGTTCAGGTTTTTGCTTGGA			
IL4/F-77	CCTACCAGCTGATCCCAGTG	60°C	114	77-190 / NM_173921
IL4/R-190	TGAGGATGTTACGCGTTTTG			
L10/F-455	CTCCAAGAGAGGGGTGTCT	60°C	127	445-571 / NM_174088
L10/R-571	TCACCATCCTGGAGGTCTTC			
TGF β /F-1193	TGCTTCAGCTCCACAGAAAA	60°C	146	1193-1338/ NM_001166068
TGF β /R-1338	TCCAGGCTCCAGATGTAAGG			
BoLA-HL030	ATCCTCTCTCTGCAGCACATTCC	66°C	302	
BoLA-HL031	TTTAAATTGCGCTCACCTCGCCGCT			

Retrotranscripción

La obtención de ADN complementario (ADNc) se realizó en reacciones de 20 μ l, iniciando con la incubación previa de 50 μ g ARN con 2.5 μ M de iniciador Oligo (dT) (Promega Corp., Madison WI., USA) y agua grado biología molecular cbp 11 μ l. La mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos seguida de una incubación a 4°C por 5 minutos en termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). Acto seguido, se agregó 1 U de enzima RT (ImProm-II™ Reverse Transcriptase, USA) y agua grado molecular cbp 20 μ l, la mezcla se homogenizará e incubará a 37°C en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf,

Hamburg, Germany) durante 60 minutos. El ADNc se visualizó en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y se ajustó la concentración a 50 ng para congelar a -20°C hasta su uso en protocolos de qPCR.

PCR cuantitativa (qPCR)

Previo a la estandarización de la qPCR, la temperatura de alineación, concentración óptima de MgCl₂ y de iniciadores para la amplificación de cada citocina se determinaron por PCR punto final. Así mismo 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 reactivo comercial Sensi Fast SYBR Lo-Rox Master Mix (Bioline, London, UK) y como sistema de amplificación y detección en un equipo Agilent technologies Mx3005P (Stratagene). Cada muestra se ejecutó por triplicado y con una reacción control sin templado (NTC/Non Template Control) en placas ópticas de 96 pozos. Posterior a la activación de la enzima a 95°C por 2 min, se continuo con las condiciones estándar de amplificación (desnaturalización 5 seg. a 95°C, alineación 10 seg. a 60°C, elongación 10 seg. a 72°C, durante 45 ciclos). Posterior a la amplificación, se incrementó la temperatura de 95°C para construir una curva de disociación y se determinó la especificidad del producto amplificado.

Método de cuantificación

Se utilizó el método de cuantificación relativa mediante la comparación del punto de cp cruce (cross-point/CP) de la muestra desconocida con una muestra calibradora (muestras provenientes de PBMC no estimuladas de una vaca no infectada) (Pfaffl, 2001; Raymaekers et al., 2009). Todas las cuantificaciones de las muestras desconocidas y de la muestra

calibradora serán normalizadas con un control interno. En este estudio se utilizó el gen constitutivo hipoxantina-guanina fosforribosiltransfera (HPRT) como control interno.

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

ΔC_p "muestra"=Promedio de la Ct de la muestra-HPRT

ΔC_p "muestra"=Promedio de la Ct de la muestra-HPRT

ΔC_p "muestra"- ΔC_p "calibrador"= $\Delta\Delta C_p$

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

Posteriormente, se realizó la transformación logarítmica de los valores relativos obtenidos mediante el uso de logaritmo base 10 ($[2^{-\Delta\Delta C_p} (\text{Log } 10)]$). Así mismo, para la carga proviral se determinó el valor del límite superior utilizando la media del $[2^{-\Delta\Delta C_p} (\text{Log } 10)]$ más 1.0 desviación estándar de todas las muestras del M1. El valor obtenido fue $2.5 [2^{-\Delta\Delta C_p} (\text{Log } 10)]$ con el cual se conformaron 3 grupos: Alta carga proviral (ACP)/n = 17, baja carga proviral (BCP)/n = 13 y BLV negativos (BLV⁻)/n = 28.

Para la expresión de citocinas, de acuerdo con el análisis del conteo de linfocitos en los tres muestreos se determinaron los animales con linfocitosis persistente (LP), y se conformaron 3 grupos de análisis, BLV⁺LP⁺(n = 16), BLV⁺LP⁻ (n = 14) and BLV⁻ (n = 28), así como los grupos anteriormente formados para la carga proviral (Alta carga proviral (ACP)/n = 17, baja carga proviral (BCP)/n = 13 y BLV negativos (BLV⁻)/n = 28) y el título de anticuerpos (Alto título de anticuerpos (ATA)/n = 17, bajo título de anticuerpos (BTA)/n = 13 and BLV negativos (BLV⁻)/n = 28).

Genotipificación.

Para la genotipificación de BoLA-DRB3.2, se utilizaron iniciadores previamente descritos (van Eijk et al., 1992) (Tabla 1). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de

desnaturalización inicial a de 94°C por 4 min., seguido por 35 ciclos (94.5°C por 90 s, 66°C por 120 s y 72°C por 60 s. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta (Apollo Instrumentation, Claremont, California, EUA) para su fotodocumentación (Doc-It System; UVP BioImaging Systems, Cambridge, UK). Los productos obtenidos de los 58 animales se purificaron del gel de agarosa usando un kit comercial (Min Elute Gel Extraction kit; Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los productos de PCR purificados se realizó en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, utilizando un kit de enzimas de alta fidelidad, procesividad, y especificidad (TaqPlatinum Polymerase; High Fidelity, Carsbald, California, EUA) y secuenciador Model3100 (Applied Biosystems, Foster, California, EUA). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas, alineadas y analizadas para realizar la predicción usando el programa bioinformático (BioEdit v7.2.0®) (Hall, 1999). Para el análisis de los polimorfismos compuestos por residuos de aminoácidos descritos para los bolsillos (P1, P3, P4, P7, P9) localizados en el sitio de presentación de antígeno del MHC-II, la secuenciación se realizó en ambos sentidos.

Determinación de alelos y análisis de motivos

Para la determinación de los alelos las secuencias fueron introducidas en el software BLAST IPD-MHC(Immuno Polymorphism Database <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/blast/>) y con base al alelo con mayor homología estas se descargaron de la base de datos IPD-MHC (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/ipd/mhc/>) (Maccari et al., 2017) y fueron alineadas utilizando el usando el programa informático (BioEdit v7.2.0®) (Hall, 1999), se tomó como base ≤ 5 cambios en los aminoácidos para ser consideradas del mismo grupo alélico (Maccari et al., 2018). Para el análisis de los motivos presentes en los bolsillos se utilizó la relación de

probabilidades (odds ratio [OR], por sus siglas en inglés), para determinar la relación de resistencia o susceptibilidad a la LP, tomando como una relación positiva los motivos con una relación ≥ 1 .

Modelaje de proteínas, cálculo de SASA y potencial electrostático.

Para la construcción de los modelos proteicos en 3D se utilizó el programa informático SWISS-MODEL® (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse et al., 2018), utilizando una platilla de construcción del HLA (<http://www.wwpdb.org>) (Berman et al., 2007). Así como el programa PyMOL® para la visualización de los modelos proteicos (Schrödinger LLC, 2015), para el cálculo de SASA (Calculation of Solvent Accessible Surface Areas) de cada residuo, así como la carga de este, se utilizó el programa informático GETAREA® (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>) (Fraczkiewicz & Braun, 1998), con estos datos se calculó todo el potencial electrostático del bolsillo 4 sumando los valores de cada motivo positivo y restando los motivos negativos. Adicional a lo anterior se crearon modelos del potencial electrostático de 3 muestras de cada grupo utilizando el programa informático APBS electrostatics® (Jurrus et al., 2018).

Análisis estadístico

El análisis de las diferencias entre los grupos de acuerdo a los parámetros de LP, título de anticuerpos y la carga proviral, se realizaron con la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre grupos, usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion 18®. La relación de la carga viral con el conteo linfocitario y título de anticuerpos, así como la relación de los títulos de anticuerpos con el conteo linfocitario y carga proviral se determinó por prueba de t-Student para muestras independientes, mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion 18®. En todas las

instancias, la significancia estadística se estableció con un valor de ($p < 0.05$). Los valores obtenidos del valor electrostático de cada muestra se analizaron con la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre grupos de acuerdo con LP.

RESULTADOS

Grupos: Linfocitosis persistente

En el presente trabajo la prevalencia de BLV fue de 73% (116/39) mientras que la ocurrencia de linfocitosis se colocó en 53% (16/30). Así mismo, el grupo BLV⁺LP⁺ presentó conteos de linfocitos aproximadamente tres veces superiores que la correspondiente a los grupos BLV⁺LP⁻ y BLV⁻. El grupo BLV⁻ mantuvo su estatus y los conteos de linfocitos permanecieron estables en todos los grupos a lo largo del experimento (Figura 1). El grupo BLV⁺LP⁺ fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a los grupos BLV⁺LP⁻ y BLV⁻.

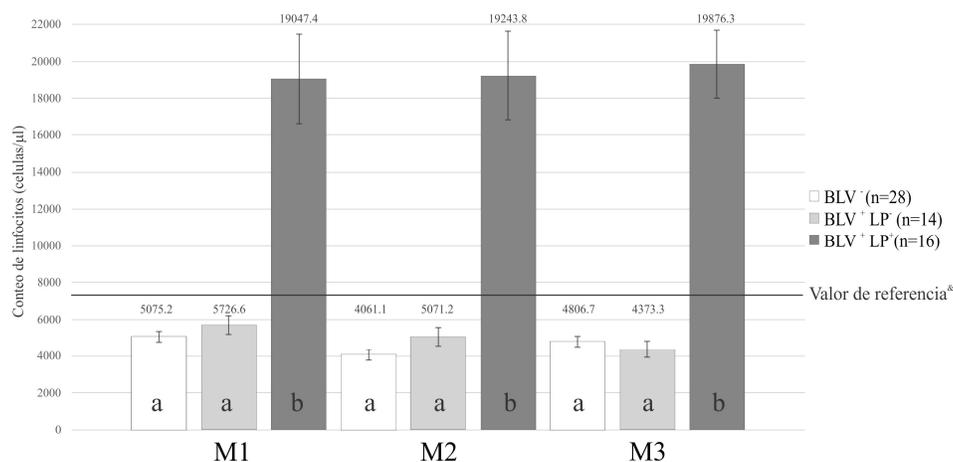


Figura 1. Grupos de linfocitosis persistente (LP) contra conteo de linfocitos. Media, +/- error standard; grupos con literales iguales no presentan diferencia estadística significativa entre ellos ($p < 0.05$). *Valor de referencia (7500/ μ l) para el conteo de linfocitos.

El grupo BLV⁺LP⁺ presentó una relación S/P significativamente mayor que la del grupo BLV⁺LP⁻ (Figura 2A). Con relación en la carga proviral, los dos grupos BLV⁺ incrementaron

gradualmente su carga proviral a lo largo de los muestreos e incluso el grupo BLV⁺LP⁻ sobrepasó el límite de intervalo superior en el último muestreo a pesar de presentar diferencia estadísticamente significativa con el grupo BLV⁺LP⁺ a lo largo de experimento (Figura 2B).

Grupos: Título de anticuerpos

Los animales del grupo ATA tuvieron los conteos de linfocitos más altos presentando diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en comparación con el grupo BTA y BLV⁻ (Figura 3A) mientras que la carga proviral en los grupos ATA y BTA no presentó diferencia estadísticamente significativa de la (Figura 3B).

Grupos: Carga Proviral

Por otro lado, el grupo ACP presentó conteos linfocitarios significativamente más altos que los de los grupos BCP y BLV⁻ negativo (Figura 4A) en todos los muestreos. Por otro lado, los títulos de anticuerpos del grupo ACP son mayores que los del grupo BCP en el primer muestreo (M1) mientras que en el tercer muestreo esta relación se invierte, siendo mayores los título de anticuerpos en el BCP (Figura 4B). Sin embargo, estos hallazgos no mostraron diferencia estadísticamente significativa.

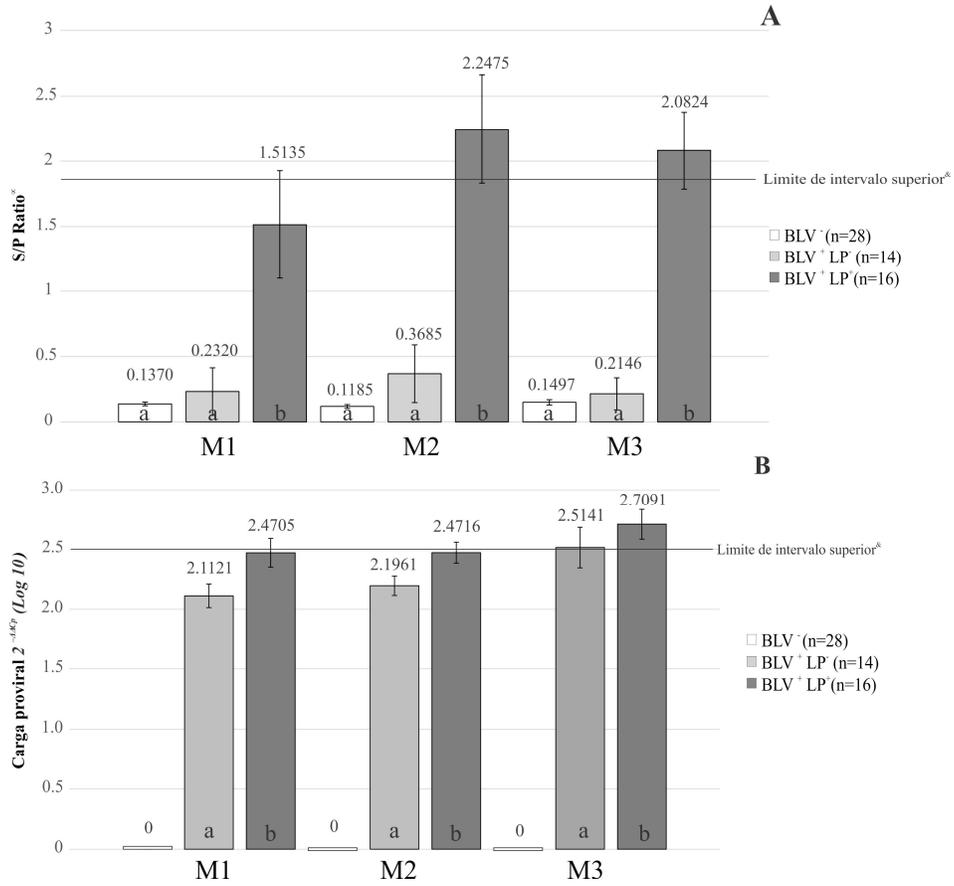


Figura 2. Grupos de linfocitosis persistente (LP) contra título de anticuerpos (A) y carga proviral de BLV (B) Media, +/- error estándar. Los grupos con las mismas literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).
 * El valor del límite de intervalo superior para la carga proviral de BLV y los títulos de anticuerpos de BLV es una desviación estándar por encima de la media ($1.992 \times S/P$, y $2.5 [2^{-\Delta\Delta Cp} (Log 10)]$, respectivamente)

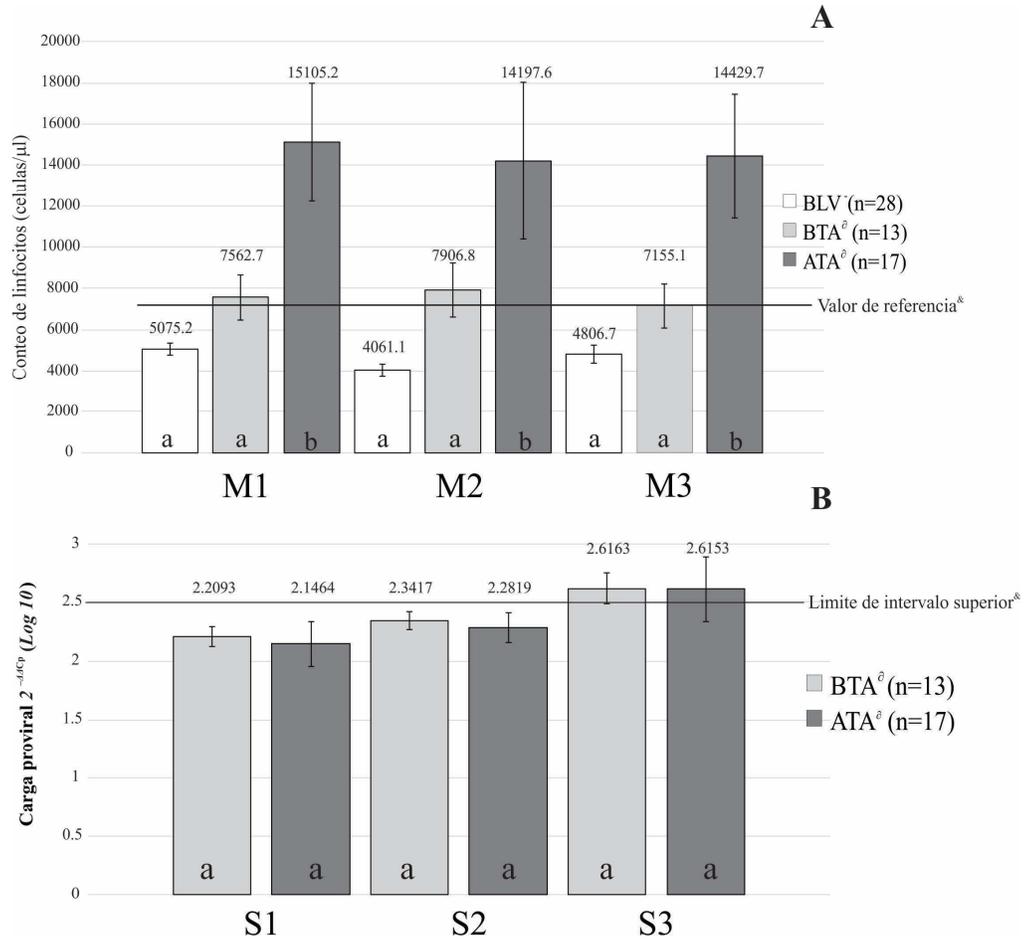


Figura 3. Grupos de título de anticuerpos contra conteo de linfocitos (A) y carga proviral de BLV (B). ^o Alto título de anticuerpos (ATA), bajo título de anticuerpos (BTA), Media, +/- error estándar. Los grupos con las mismas literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). ^o Valor de referencia (7500/μl) para el conteo de linfocitos. ^o El valor del limite de intervalo superior para la carga proviral de BLV es una desviación estándar por encima de la media ($2.5 [2^{-\Delta\Delta C_p} (\text{Log } 10)]$).

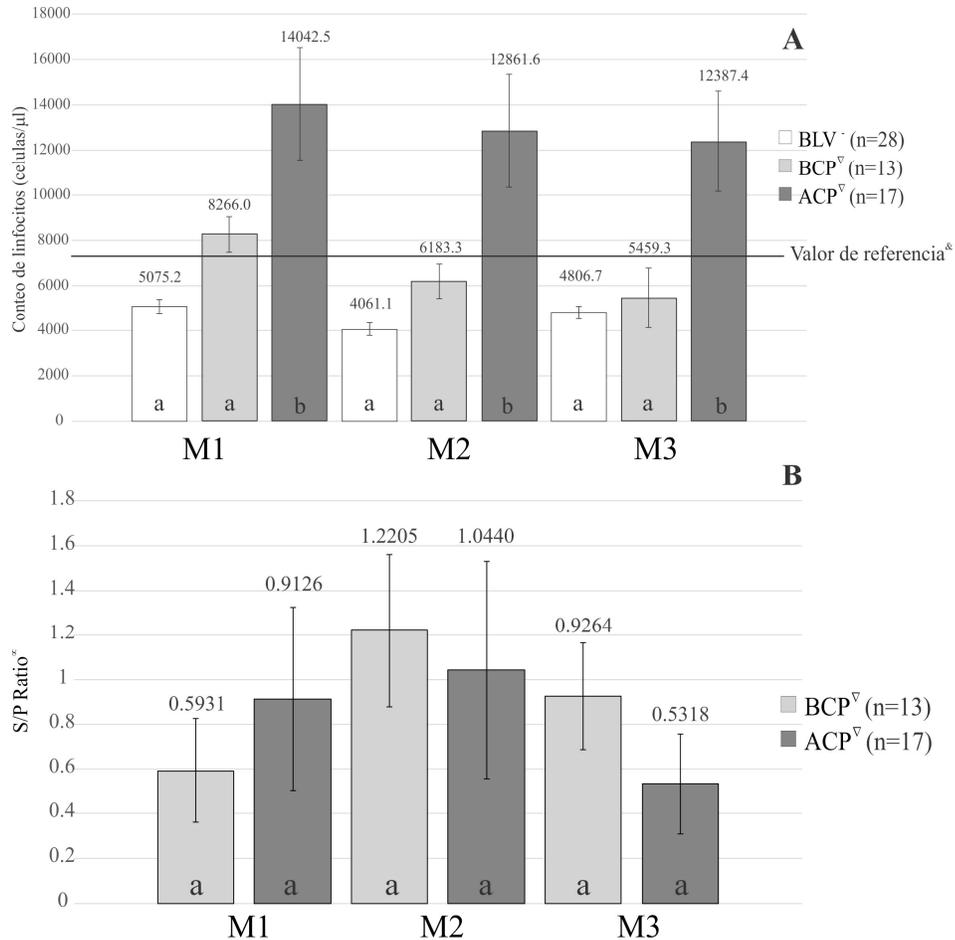


Figura 4. Grupos de carga proviral de BLV contra conteo de linfocitos (A) título de anticuerpos (B). [∇] Alta carga proviral (ACP), baja carga proviral (BCP) Media, +/- error estándar. Los grupos con las mismas literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). *Valor de referencia (7500/ μ l) para el conteo de linfocitos. El valor del límite de intervalo superior para los títulos de anticuerpos de BLV es una desviación estándar por encima de la media ($1.992 \times S/P$).

Expresión de citocinas

La expresión de IFN γ de los grupos BLV⁺LP⁺ y ATA y ACP fue significativamente menor en comparación con el grupo BLV⁻ (Figura 5A, y 5B, respectivamente) en todos los muestreos mientras que en el grupo ACP sólo se observó diferencia significativa en M1 y M2 (Figura 5C). Se observó que en los grupos BLV⁻ y BLV⁺LP⁻ la expresión de IFN γ (Figura 5A) fue significativamente más alta en comparación con el grupo BLV⁺LP⁺ durante dos de los tres muestreos, mismos en los que se observa diferencia estadística significativa. Por otro lado, la expresión de IL12, IL2 e IL4 (figura 6, 7 y 8 respectivamente) fue

marcadamente más alta en el grupo BLV⁻ en comparación del grupo BLV⁺LP⁺ en al menos dos de los tres muestreos, esta diferencia fue estadísticamente significativa para la IL2 e IL4. La expresión de IL10 (Figura 9) se observó más elevada en el grupo BLV⁺LP⁺ en comparación de los grupos BLV⁻ y BLV⁺LP⁺, presentando diferencia estadística solo en uno de los muestreos. La expresión de TGF- β (Figura 10) fue más elevada en el grupo BLV⁺LP⁺ en comparación del grupo BLV⁻, sin embargo, no se observa diferencia estadística significativa.

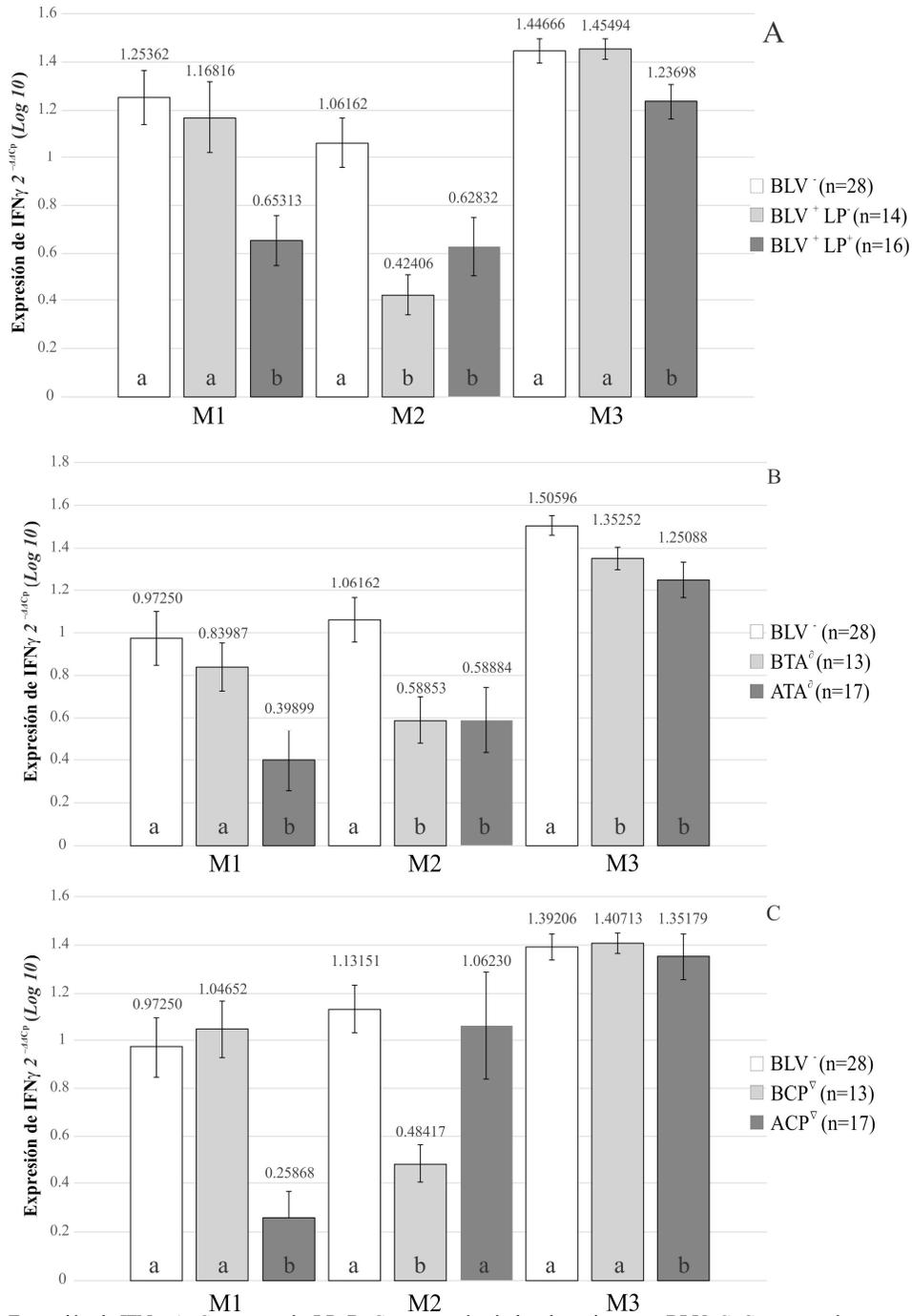


Figura 5. Expresión de IFN γ . A. Grupos según LP. B. Grupos según títulos de anticuerpos BLV. C. Grupos según carga proviral de BLV. δ BTA/títulos de anticuerpos bajos, ATA/títulos de anticuerpos altos, ∇ BCP/carga proviral baja, ACP/carga proviral alta. Media, \pm error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

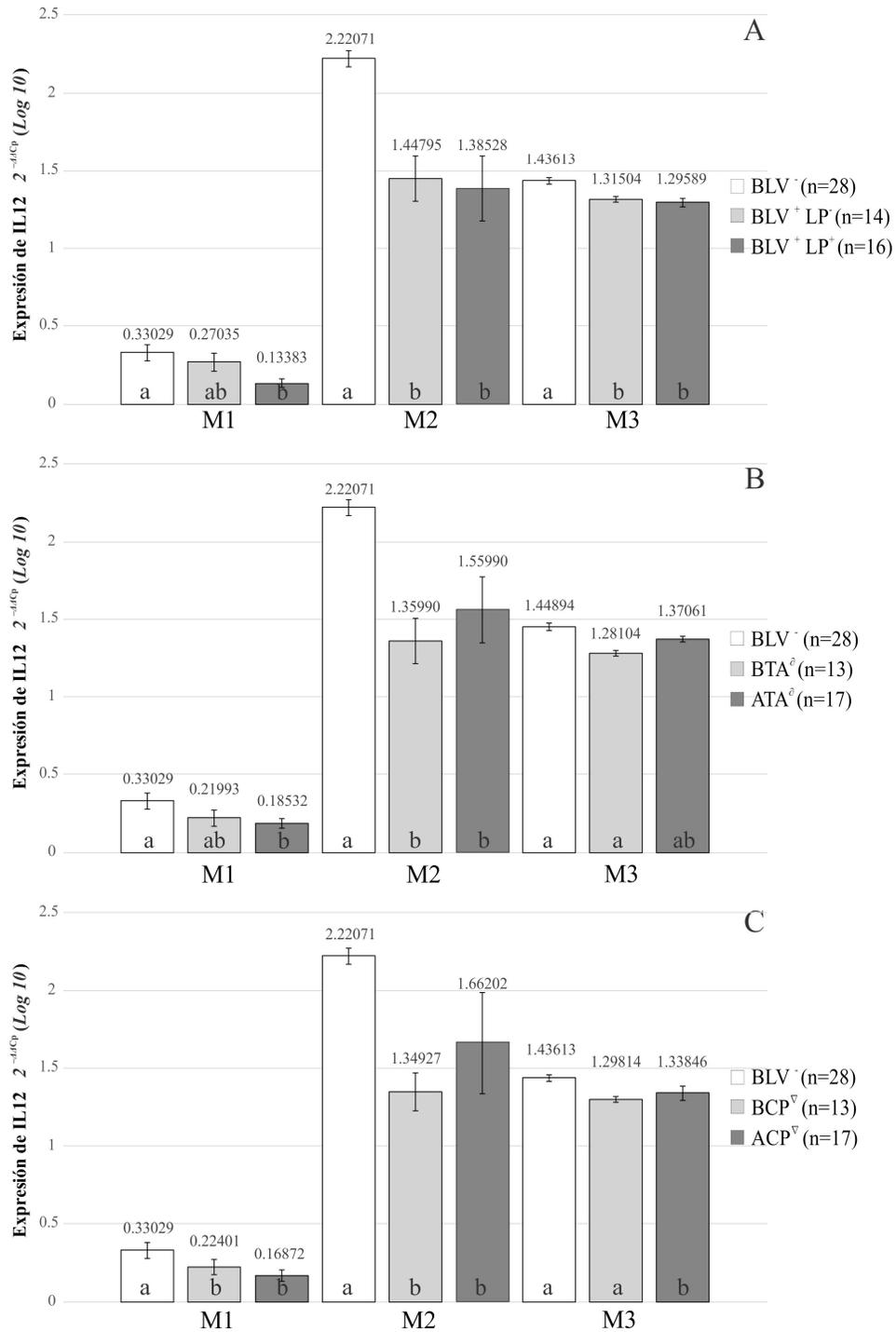


Figura 6. Expresión de IL12 A. Grupos según LP. B. Grupos según títulos de anticuerpos BLV, C. Grupos según carga proviral de BLV. δ BTA/títulos de anticuerpos bajos, ATA/títulos de anticuerpos altos, ∇ BCP/carga proviral baja, ACP/carga proviral alta. Media, \pm error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

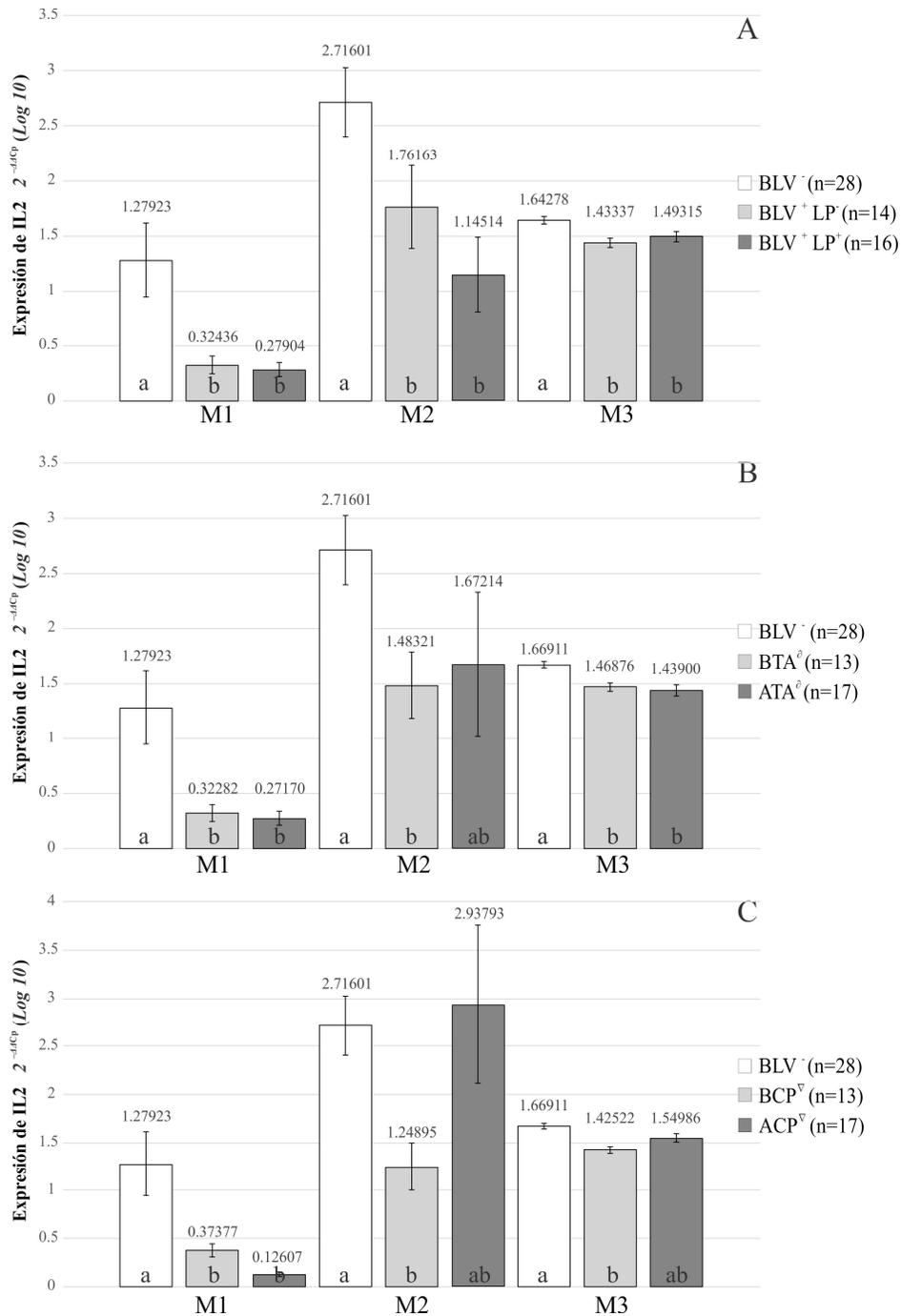


Figura 7. Expresión de IL2 A. Grupos según LP. B. Grupos según títulos de anticuerpos BLV. C. Grupos según carga proviral de BLV. δ BTA/títulos de anticuerpos bajos, ATA/títulos de anticuerpos altos, ∇ BCP/carga proviral baja, ACP/carga proviral alta. Media, +/- error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

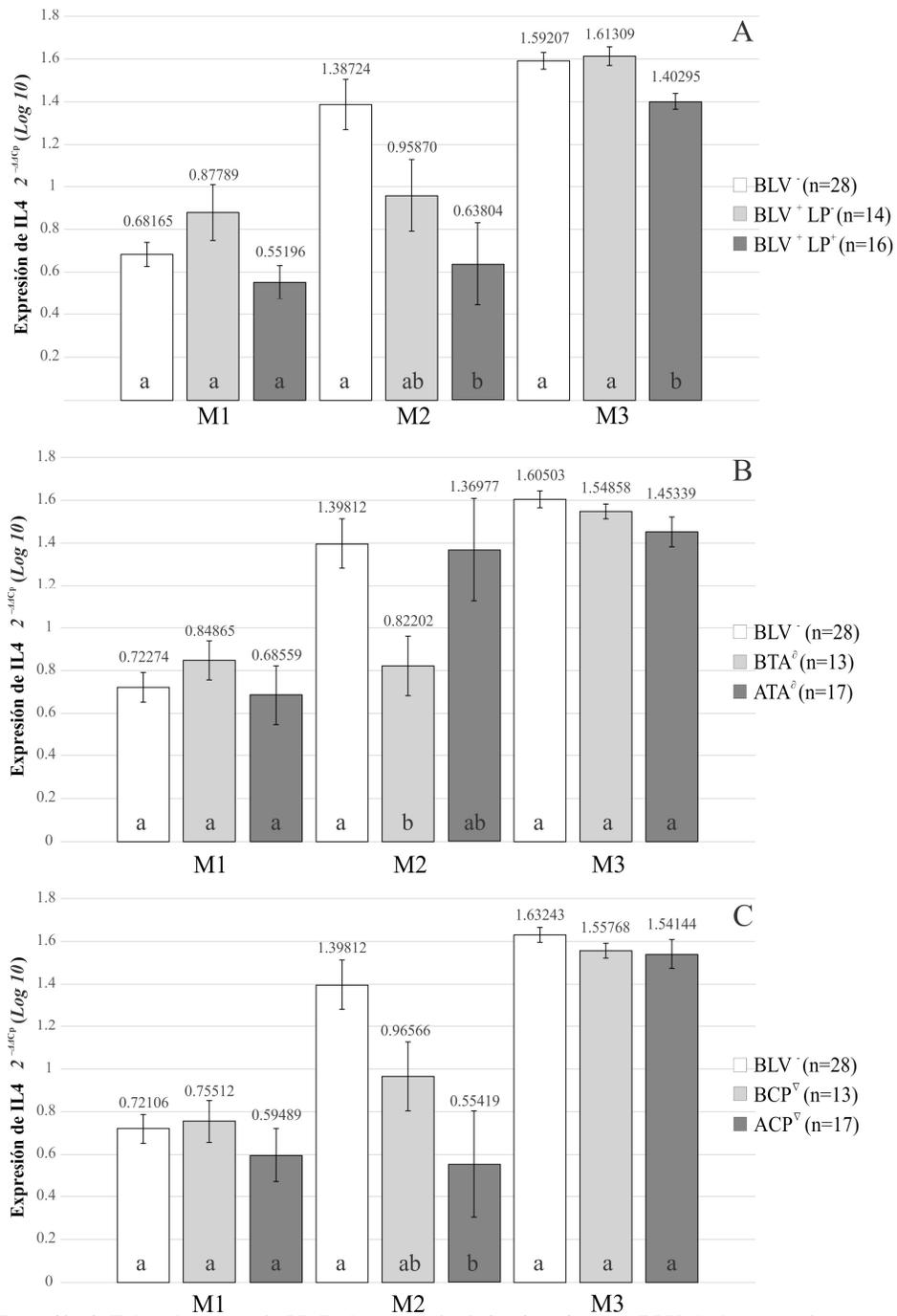


Figura 8. Expresión de IL4 A. Grupos según LP. B. Grupos según títulos de anticuerpos BLV, C. Grupos según carga proviral de BLV. δ BTA/títulos de anticuerpos bajos, ATA/títulos de anticuerpos altos, ∇ BCP/carga proviral baja, ACP/carga proviral alta. Media, +/- error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

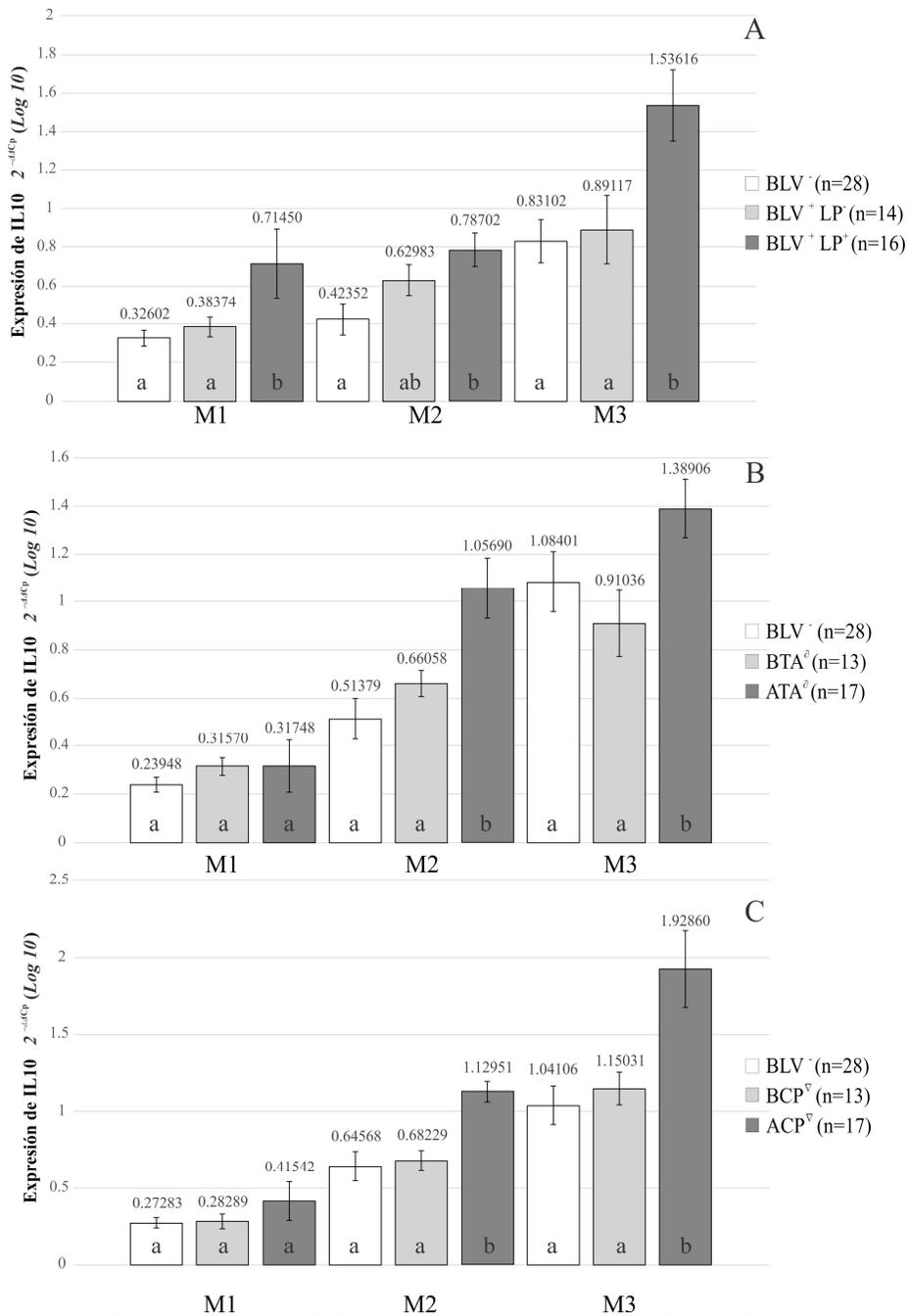


Figura 9. Expresión de IL10 A. Grupos según LP. B. Grupos según títulos de anticuerpos BLV. C. Grupos según carga proviral de BLV. δ BTA/títulos de anticuerpos bajos, Δ ATA/títulos de anticuerpos altos, ∇ BCP/carga proviral baja, ∇ ACP/carga proviral alta. Media, \pm error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

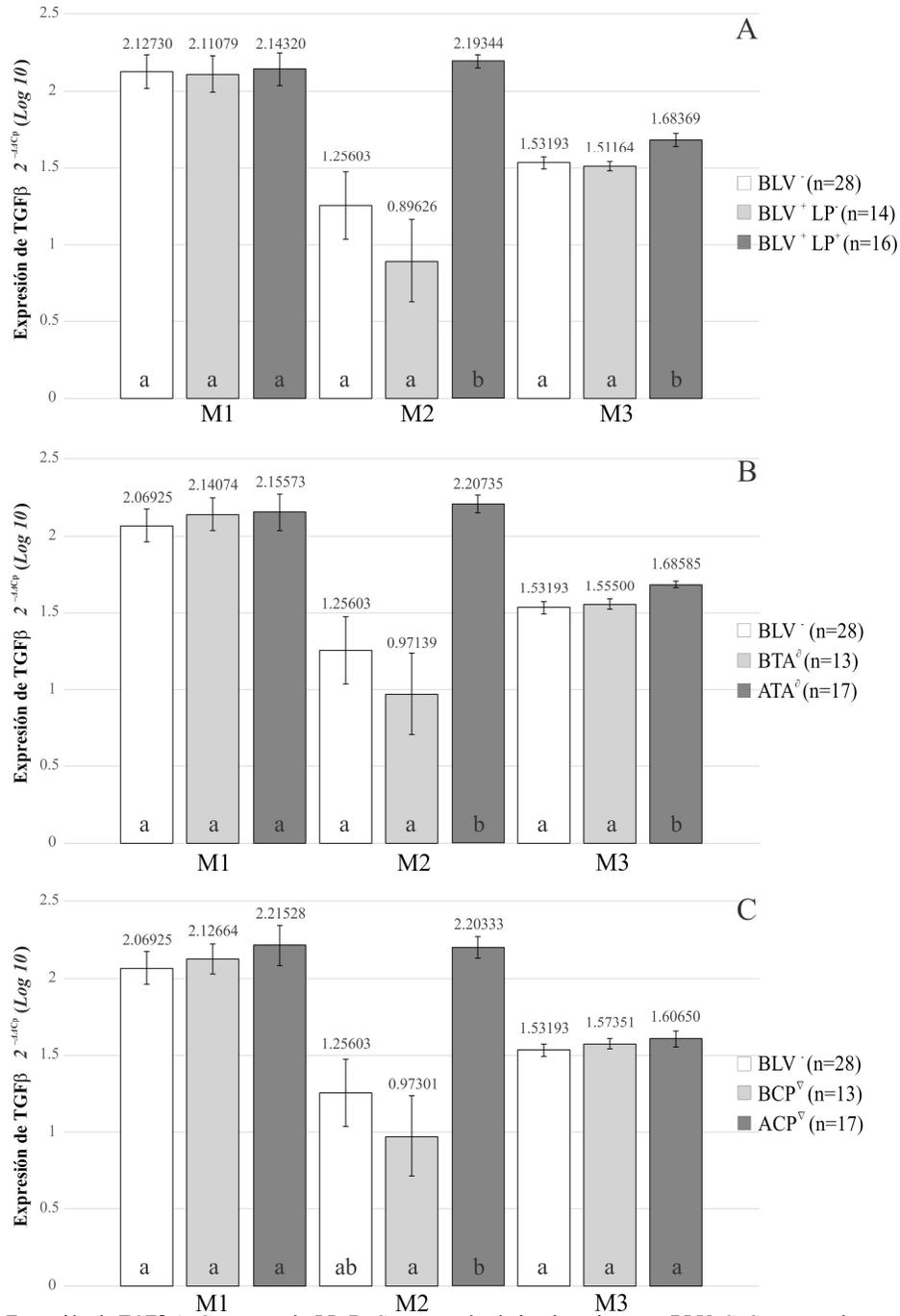


Figura 10. Expresión de TGFβ A. Grupos según LP. B. Grupos según títulos de anticuerpos BLV, C. Grupos según carga proviral de BLV. δ BTA/títulos de anticuerpos bajos, ATA/títulos de anticuerpos altos, ∇ BCP/carga proviral baja, ACP/carga proviral alta. Media, +/- error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Análisis in silico de productos del BoLA-DRB3.2

Se amplificaron 58 productos de PCR que incluyeron alrededor de 280 nucleótidos, los cuales fueron analizados para determinar su precisión con el fin de establecer la predicción de aminoácidos. El análisis de las secuencias de nucleótidos reveló una alta diversidad de alelos ya que sólo se observaron 3 pares con identidad del 100% (*BoLA-DRB3*001:01*, *BoLA-DRB3*011* y *BoLA-DRB3*015:01*). La predicción de motivos en las posiciones 70-71 y 75-78 descritas para susceptibilidad y resistencia, respectivamente (Juliarena et al., 2008; Xu et al., 1993) del total de muestras se muestran en la tabla 2 (grupos BLV⁻ y BLV⁺LP⁻) y tabla 3 (grupo BLV⁺LP⁺). Se observó que los motivos ER/70-71 fueron poco comunes, detectándose sólo cuatro de ellos (2/grupo BLV⁻, 1/grupo BLV⁺LP⁻ y 1/grupo BLV⁺LP⁺). Dos de estos motivos se observaron en combinación con motivo V/78 y los dos restantes en presencia de motivos poco comunes en posición 78 (grupo BLV⁻ con W/78 y BLV⁺LP⁺ con I/78). Se observó una frecuencia considerable de motivos E/74 (22/42, 52%) L/78 (15/42, 35%) y EK/70-71 (13/42, 30%) en grupos con rasgo de resistencia (BLV⁻ y BLV⁺LP⁻) mientras que el motivo más frecuente en el grupo BLV⁺LP⁺ (susceptibilidad) fue Y/78 (8/15, 53%) seguido de Y/74 (6/15, 40%).

Los alelos presentes conforme a los alelos reportados en IPD-MHC (Maccari et al 2017) y los aminoácidos presentes en los bolsillos con base al estatus de LP se muestran en la tabla 4. La frecuencia de los alelos fue la siguiente: *BoLA-DRB3*001:01*=3, *BoLA-DRB3*007:06*=2, *BoLA-DRB3*010:01*=2, *BoLA-DRB3*011:01*=2, *BoLA-DRB3*015:01*=2, *BoLA-DRB3*015:01*=2, *BoLA-DRB3*102:01*=1, *BoLA-DRB3*007:06*=1, *BoLA-DRB3*015:10*=1, *BoLA-DRB3*024:03*=1, *BoLA-DRB3*120:01*=1, *BoLA-DRB3*010:02*=1, *BoLA-DRB3*031:03*=1, *BoLA-DRB3*031:04*=1, *BoLA-DRB3*075:03*=1 y *BoLA-DRB3*083:01*=1. Se encontraron 10 secuencias que no han sido reportadas previamente

mismas que fueron denominadas como inéditas de las cuales el 80% presentan el motivo L (leucina) en posición 78 mismo que (4/10, 40%) corresponde al 40% (4/10) y 30% (3/10) dentro de

Tabla 2. Análisis de motivos en las posiciones 70-78, grupos BLV- y BLV+LP-

Muestra	Estatus	Posición								
		70	71	72	73	74	75	76	77	78
378	BLV-	E	K	R	A	E	V	D	R	V
429	BLV-	G	K	R	A	E	V	D	T	V
493	BLV-	Q	G	R	A	E	V	D	T	V
552	BLV-	R	T	R	A	E	V	D	T	V
565	BLV-	E	R	R	A	E	V	D	R	V
600	BLV-	R	A	R	A	A	V	D	T	L
631	BLV-	G	K	R	A	E	V	D	T	V
664	BLV-	E	K	R	A	E	V	D	R	V
677	BLV-	G	K	R	A	E	V	D	T	V
758	BLV-	E	K	R	A	E	V	D	R	V
759	BLV-	E	K	R	A	Y	V	D	T	L
774	BLV-	E	K	R	A	E	V	D	R	V
776	BLV-	E	R	A	A	E	V	D	R	W
780	BLV-	E	K	R	A	Y	V	D	T	L
782	BLV-	D	K	R	A	D	V	D	T	L
784	BLV-	R	R	R	A	A	V	D	Y	C
797	BLV-	R	T	R	A	E	V	D	T	L
814	BLV-	Q	K	R	A	E	V	D	R	V
831	BLV-	E	K	R	A	Y	V	D	T	L
836	BLV-	E	K	R	A	E	V	D	T	L
838	BLV-	R	K	R	A	E	V	D	T	V
839	BLV-	R	E	R	A	Y	V	D	T	Y
840	BLV-	R	E	R	A	Y	V	D	T	L
843	BLV-	D	K	R	A	S	V	D	T	V
849	BLV-	R	E	R	A	E	V	D	T	C
681	BLV-	A	P	R	A	V	V	L	N	G
782	BLV-	D	K	R	A	D	V	D	T	L
600	BLV-	R	A	R	A	A	V	D	T	C
320	BLV+LP-	R	K	R	A	Y	V	D	T	V
340	BLV+LP-	E	R	R	A	E	V	D	R	V
571	BLV+LP-	Q	T	R	A	E	V	D	R	L
615	BLV+LP-	R	T	R	A	E	V	D	T	L
654	BLV+LP-	G	A	R	A	A	V	D	T	K
771	BLV+LP-	D	K	R	A	S	V	D	T	L
672	BLV+LP-	R	A	R	A	Y	V	D	T	Y
792	BLV+LP-	G	K	R	A	E	V	D	T	V
794	BLV+LP-	E	K	R	A	E	V	D	R	V
798	BLV+LP-	E	K	R	A	Y	V	D	T	L
812	BLV+LP-	E	K	R	A	Y	V	D	T	L
800	BLV+LP-	E	K	R	A	E	V	D	R	V
819	BLV+LP-	R	A	R	A	A	V	D	T	Y
820	BLV+LP-	E	K	R	A	E	V	D	T	L

Tabla 3. Análisis de motivos en las posiciones 70-78, grupo BLV⁺LP⁺

Muestra	Estatus	Posición									
		70	71	72	73	74	75	76	77	78	
344	BLV+LP+	E	A	R	A	E	V	D	T	Y	
441	BLV+LP+	R	A	R	A	A	V	D	T	V	
444	BLV+LP+	E	K	R	A	E	V	D	R	L	
455	BLV+LP+	R	E	R	A	Y	V	D	T	Y	
492	BLV+LP+	R	E	R	A	Y	V	D	T	Y	
557	BLV+LP+	E	K	R	A	Y	V	D	R	L	
581	BLV+LP+	R	K	R	A	Y	V	D	T	V	
588	BLV+LP+	R	E	R	A	Y	V	D	T	Y	
601	BLV+LP+	R	A	R	A	A	V	D	T	Y	
605	BLV+LP+	E	K	R	A	E	V	D	T	V	
633	BLV+LP+	R	A	R	A	A	V	D	T	Y	
635	BLV+LP+	D	K	R	A	S	V	D	T	Y	
673	BLV+LP+	E	R	R	A	E	V	D	R	I	
674	BLV+LP+	R	E	R	A	Y	V	D	T	Y	
682	BLV+LP+	E	K	R	A	E	V	D	R	V	
815	BLV+LP+	R	R	R	A	E	V	D	T	V	

los grupos BLV⁻ y BLV⁺LP⁻. Así mismo, se detectó un alelo inédito con motivos ER/70-71 y motivo W/78 en el grupo BLV⁻. Otro hallazgo relevante de la evaluación de los bolsillos fue la presencia de motivos EK/70-71 con frecuencia general de 43% (13/30), la mayoría presentes en animales de los grupos BLV⁻ y BLV⁺LP⁻ (33%), constituyendo el 40% de los alelos inéditos. Por otro lado, los motivos más frecuentes en el grupo BLV⁺LP⁺ fueron Y/78 (8/15, 53%) e Y/74 (6/15, 40%), sugestivo de susceptibilidad. A pesar de que el motivo 77 no forma parte del bolsillo 4, los motivos TL/71-78 fueron comunes en alelos inéditos con rasgos de resistencia (5/10, 50%). También se encontraron asociaciones en motivos presentes en otros bolsillos se encontró que V/86 relacionado con susceptibilidad (6/10, 60%) perteneciente al bolsillo 1, así como relacionados con resistencia como es Y/30 del bolsillo 6 (17/20, 85%) y D/57 del bolsillo 9 (13/20, 65%). No se apreciaron posibles asociaciones en los bolsillos restantes de la hendidura.

El análisis de la relación de probabilidades (OR) para establecer rasgos de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad se muestra en la tabla 5 y tabla 6, respectivamente. Dicho análisis reveló que los motivos L/78 (P4), R/71 (P4), K/71 (P4), EK/70-71 (P4), R/77 (P4), TL/77-78 (P4), E/74 (P4), Y/30 (P6), D57 (P9), mostraron un $OR > 1$, indicando una relación positiva con resistencia y los motivos TV/77-78 (P4), V/78 (P4), Y/78 (P4), RR/70-71 (P4), R/71 (P4), K/71-Y/78 (P4), Y/74 (P4), V/86 (P1) mostraron un $OR > 1$, indicando una relación positiva con susceptibilidad. Sin embargo, en ambos rasgos estos valores no mostraron nivel de significancia estadística ($p < 0.05$).

El valor del SASA (área superficial accesible al solvente) de cada residuo, así como el valor electrostático de todo el bolsillo 4 se muestran en la Tabla 7. El análisis de los valores obtenidos del valor electrostático de cada muestra acuerdo con LP se muestran en la Figura 11, en la cual el grupo BLV^+LP^+ presentó valor electrostático de carga positiva en comparación con los grupos BLV^+LP^- y BLV^- , que presentaron un valor negativo, teniendo diferencia estadística significativa entre ellos ($p < 0.05$).

Los modelos tridimensionales de las 3 muestras representativas de cada grupo, así como su potencial electrostático se muestran en la figura 12.

Tabla 4. Análisis de motivos y bolsillos (pockets)

Muestra	BoLA-DRB3 Alelo	Estatus	P1	POCKET 4								P6		P7		P9	
Posición			86	13	26	70	71	74	77	78	11	30	47	71	9	57	
378	*001:01	BLV-	M	S	F	E	K	E	R	V	S	Y	F	K	E	D	
834	*001:01	BLV-	V	S	F	E	K	E	R	V	S	Y	F	K	E	D	
552	*011:01	BLV-	G	S	F	R	R	E	T	V	H	H	F	R	Q	D	
839	*015:01	BLV-	V	S	Y	R	E	Y	T	Y	S	Y	Y	E	E	V	
600	*102:01	BLV-	G	K	F	Q	K	A	T	V	S	Y	F	K	E	D	
631	Inédito	BLV-	R	S	F	E	K	E	T	L	Y	Y	F	E	E	V	
849	Inédito	BLV-	R	N	F	R	E	E	T	L	S	Y	F	R	E	D	
776	Inédito	BLV-	D	S	F	E	R	E	R	W	Y	Y	F	E	D	D	
493	Inédito	BLV-	G	S	F	Q	R	E	T	L	Y	C	F	Q	E	D	
759	*Inédito	BLV-	M	S	F	E	K	Y	T	L	S	Y	F	K	E	D	
820	*001:01	BLV+LP-	M	K	F	E	K	E	T	V	S	Y	F	K	E	A	
571	*007:06	BLV+LP-	V	S	F	E	K	E	R	E	S	Y	F	K	E	V	
798	*007:06	BLV+LP-	I	S	F	E	K	E	R	E	S	Y	F	K	E	V	
672	*015:10	BLV+LP-	G	S	F	R	E	E	T	Y	S	Y	Y	E	E	V	
812	*024:03	BLV+LP-	I	S	F	E	K	E	R	V	S	Y	F	K	E	D	
771	*120:01	BLV+LP-	G	R	F	E	K	E	T	E	Y	Y	F	K	E	D	
615	Inédito	BLV+LP-	G	S	F	R	T	E	T	Y	H	Y	Y	R	Q	D	
444	Inédito	BLV+LP-	R	R	F	E	K	E	R	L	Y	Y	F	E	E	D	
671	Inédito	BLV+LP-	R	S	F	Q	K	E	R	L	S	Y	F	Q	E	D	
654	Inédito	BLV+LP-	G	S	F	E	R	E	T	L	Y	C	F	E	E	V	
601	*010:01	BLV+LP+	G	S	F	R	T	A	T	Y	S	Y	Y	R	E	A	
674	*010:01	BLV+LP+	G	S	F	R	E	E	T	Y	S	Y	Y	E	E	V	
441	*010:02	BLV+LP+	G	G	F	R	R	A	T	V	H	H	F	R	Q	S	
815	*011:01	BLV+LP+	V	G	L	R	R	E	T	V	H	H	F	R	Q	S	
492	*015:01	BLV+LP+	V	S	Y	R	E	Y	T	Y	S	Y	Y	E	E	V	
605	*031:03	BLV+LP+	M	S	F	E	K	E	R	V	Y	H	F	K	Q	A	
581	*031:04	BLV+LP+	V	S	F	R	K	E	T	V	Y	H	F	K	Q	A	
320	*075:03	BLV+LP+	V	G	Y	R	K	Y	T	Y	H	H	F	K	E	A	
635	*083:01	BLV+LP+	V	S	F	E	K	S	T	Y	S	Y	F	K	E	A	
557	Inédito	BLV+LP+	V	R	F	E	K	Y	R	L	Y	C	F	E	E	D	

*Motivo 77 no forma parte del bolsillo 4 (P4)

Tabla 5.
Motivos potencialmente asociados a la resistencia al BLV

Motivo ¹	OR ²	Intervalos de confianza al 95%	Nivel de significancia
Resistencia (n=30)			
TV (77-78)	0.5000	0.0851 to 2.9391	P = 0.4431
TL (77-78)	5.6341*	0.2836 to 111.9421	P = 0.2570
V (78)	0.7500	0.1715 to 3.2797	P = 0.7023
L (78)	3.500*	0.3769 to 32.5039	P = 0.2706
R (71)	1.0000*	0.1558 to 6.4200	P = 1.0000
Y (78)	0.3000	0.0594 to 1.5163	P = 0.1453
RR (70-71)	0.1024	0.0045 to 2.3343	P = 0.1531
K (71)	1.200*	0.3302 to 4.3603	P = 0.7818
K (71) / Y (78)	0.1024	0.0045 to 2.3343	P = 0.1531
EK (70-71)	1.6667*	0.3730 to 7.4469	P = 0.5036
R (77)	1.7500*	0.3056 to 10.0227	P = 0.5297
E (74)	1.3968*	0.4788 to 4.0752	P = 0.5407
Y (30)	2.1250*	0.5633 to 8.0157	P = 0.2658
D (57)	6.5000*	0.7414 to 56.9872	P = 0.0911

¹Motivo (posición) ²OR Relación de probabilidades (odds ratio). *Presenta una relación positiva

Tabla 6.
Motivos potencialmente asociados con la susceptibilidad a la infección de BLV

Motivo ¹	OR ²	Intervalos de confianza al 95%	Nivel de significancia
Susceptibilidad (n=30)			
TV (77-78)	2.0000*	0.3402 to 11.7563	P = 0.4242
TL (77-78)	0.1775	0.3049 to 5.8306	P = 0.7023
V (78)	1.8000*	0.2635 to 12.2963	P = 0.5488
L (78)	0.4500	0.0347 to 5.8437	P = 0.5416
Y (78)	2.2500*	0.3465 to 14.6113	P = 0.3956
RR (70-71)	4.5238*	0.1918 to 106.7046	P = 0.3493
R (71)	4.000*	0.6231 to 25.6800	P = 0.1439
K (71)	0.833	0.2293 to 3.0280	P = 0.7818
K (71) / Y (78)	9.7619*	0.4284 to 222.4458	P = 0.1531
EK (70-71)	0.4500	0.0862 to 2.3498	P = 0.3437
R (77)	0.5714	0.0998 to 3.2727	P = 0.5297
Y (74)	13.6667*	0.6439 to 290.0721	P = 0.5407
V (86)	4.0000*	0.8237 to 19.4238	P = 0.0855

¹Motivo (posición) ²OR Relación de probabilidades (odds ratio). *Presenta una relación positiva

Tabla 7. Área superficial accesible al solvente mostrando carga por motivos y neta del bolsillo 4 (P4)

Muestra	Alelo	Estatus	Bolsillo 4 (P4) Posiciones							CARGA		
			13	26	70	71	74	77*	78	POS	NEG	NETA
378	*001:01	BLV-	S ¹	F	E	K	E	R	V			
			73.2 ²	0.58	77.2	31.1	14.1	177	48	91.26	207.77	-116.51
834	*001:01	BLV-	S	F	E	K	E	R	V			
			73.2	0.58	77.2	31.1	14.1	177	48	91.28	207.71	-116.43
552	*011:01	BLV-	S	F	R	R	E	T	V			
			74.5	0	138	49.8	5.1	88.6	47.1	5.1	187.66	-182.56
839	*015:01	BLV-	S	Y	R	E	Y	T	Y			
			46	1.84	118	4.74	46.2	90.5	73.8	4.74	118.26	-113.52
776	Inédito	BLV-	S	F	E	R	E	R	W			
			58.5	1.74	88.5	52.7	8.59	135	121	97.13	187.42	-90.29
849	Inédito	BLV-	N	F	R	E	E	T	L			
			78.5	0	123	1.48	12.7	91	56.6	123.39	14.17	109.22
631	Inédito	BLV-	S	F	E	K	E	T	L			
			61	2.57	101	29.5	28.7	89.5	58.8	29.5	129.75	-100.25
493	Inédito	BLV-	S	F	Q	R	E	T	L			
			61.3	0.15	102	42.3	19.3	88.7	58.8	19.26	42.27	-23.01
600	*102:01	BLV-	K	F	Q	K	A	T	V			
			126	4.44	102	37.1	2.69	88.9	62.5	163.03	0	163.03
759	Inédito	BLV-	S	F	E	K	Y	T	L			
			64.7	0.07	90.8	23.9	37.7	88.6	56	90.82	23.91	66.91
771	*120:01	BLV+LP-	R	F	E	K	E	T	E			
			93.5	0.03	75.4	21.5	9.89	88.3	39.4	124.71	114.94	9.77
672	*015:10	BLV+LP-	S	F	R	E	E	T	Y			
			54.8	5.93	123	13.8	33.9	89	69.4	47.7	123.01	-75.31
812	*024:03	BLV+LP-	S	F	E	K	E	R	V			
			73.1	2.69	87.1	35.8	26.4	158	45	113.45	193.82	-80.37
820	*001:01	BLV+LP-	K	F	E	K	E	T	V			
			121	0.05	82.1	20.7	7.86	88.6	48	90	20.67	69.33
571	*007:06	BLV+LP-	S	F	E	K	E	R	E			
			72.4	3.96	97.5	53.2	37.4	175	63.8	198.7	228.02	-29.32
798	*007:06	BLV+LP-	S	F	E	K	E	R	E			
			72.4	3.95	97.8	46.6	37.4	175	63.8	198.97	221.36	-22.39
444	Inédito	BLV+LP-	R	F	E	K	E	R	L			
			142	1.75	85.9	25.6	27.1	163	51.4	113.03	330.39	-217.36
654	Inédito	BLV+LP-	S	F	E	R	E	T	L			
			57.3	1.86	114	45.4	23.1	94.3	59.9	136.59	45.43	91.16
615	Inédito	BLV+LP-	S	F	R	T	E	T	Y			
			44.9	4.31	153	12.6	37.7	89.4	74.4	152.79	37.67	115.12
601	*010:01	BLV+LP+	S	F	R	T	A	T	Y			
			50.8	7.07	136	7.54	7.89	96	82.5	135.59	0	135.59
674	*010:01	BLV+LP+	S	F	R	E	E	T	Y			
			47.5	3.17	118	9.29	24.1	90.3	73.4	117.6	33.35	84.25
441	*010:02	BLV+LP+	G	F	R	R	A	T	V			
			56.6	9.55	157	46.3	1.75	87	67.1	203.06	0	203.06
815	*011:01	BLV+LP+	G	L	R	R	E	T	V			
			60.7	5.82	142	38.9	21.7	92.6	60.9	181.42	21.73	159.69
492	*015:01	BLV+LP+	S	Y	R	E	Y	T	Y			
			46	1.84	118	4.74	46.2	90.5	73.8	118.26	4.74	113.52
557	Inédito	BLV+LP+	R	F	E	K	Y	R	L			
			141	0	87.8	4.81	43.4	176	45.9	322.02	87.77	234.25
605	*031:03	BLV+LP+	S	F	E	K	E	R	V			
			75.9	1.06	81.3	26.5	19.4	173	55.5	199.06	100.77	98.29
581	*031:04	BLV+LP+	S	F	R	K	E	T	V			
			73.9	0.02	151	37.5	22.4	86.5	46.1	188.3	22.44	165.86
320	*075:03	BLV+LP+	G	Y	R	K	Y	T	Y			
			29	3.16	147	16.1	57.4	88.6	79	162.75	0	162.75
635	*083:01	BLV+LP+	S	F	E	K	S	T	Y			
			53.1	6.13	109	50.6	74.7	96.7	81.6	50.55	108.76	-58.21

¹Motivo (posición) ²SASA (área superficial accesible al solvente) La carga negativa se indica en azul y la carga positiva en rojo. *Motivo 77 no forma parte del bolsillo 4 (P4)

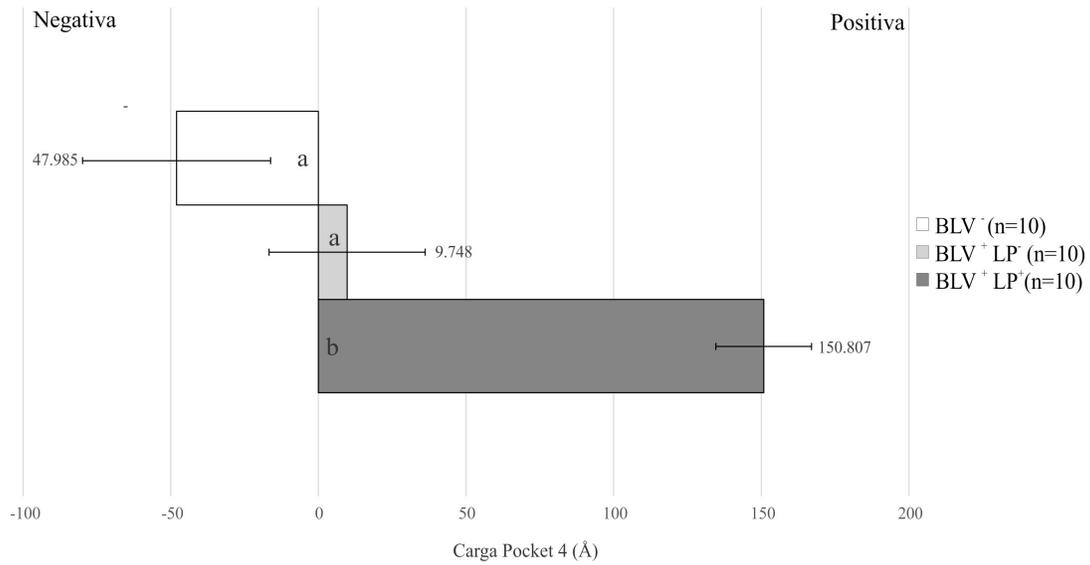


Figura 11. Carga neta del bolsillo 4 Grupos de LP *Media, **+/- error standard; grupos con literales iguales no presentan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

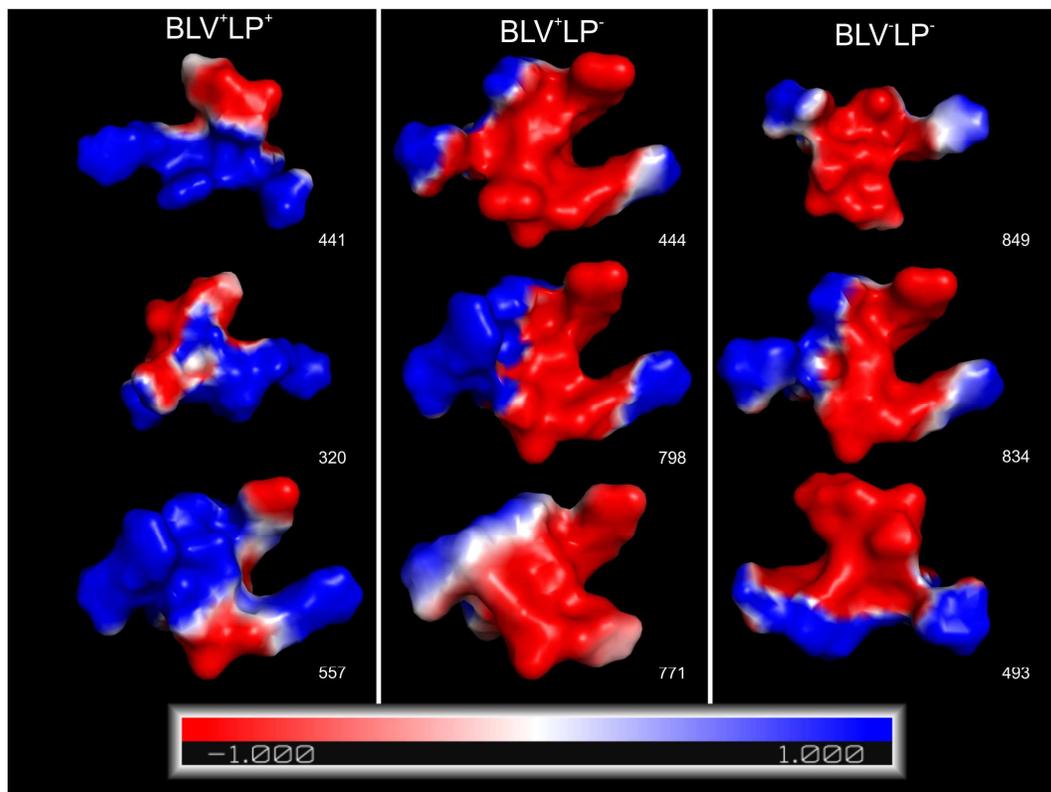


Figura 12. Potencial electrostático del pocket 4 La carga negativa se indica en rojo y la carga positiva en azul.

DISCUSIÓN

La linfocitosis persistente es considerada el principal parámetro para establecer la progresión y resistencia de la LEB dado que representa la expansión policlonal de linfocitos B con fenotipo IgM⁺, CD5⁺, CD11b⁺, MHC-II⁺ (Abt et al., 1970; Gutiérrez et al., 2011; Juliarena et al., 2007; Somura et al., 2014; Trainin et al., 1996). Con anterioridad al desarrollo de técnicas modernas de diagnóstico la LP se utilizó para diagnosticar la enfermedad mediante el uso de la European Community's leukosis key. (Akagami et al., 2019; Hutchinson et al., 2021; Takezawa et al., 2021). Así mismo, la LP se ha considerado como un predictor para el desarrollo de linfoma (Ferrer et al., 1978). Sin embargo, estudios posteriores sugieren que esta fase no es necesaria para el desarrollo de la neoplasia (Llames et al., 2001). Se menciona que aproximadamente un tercio de los animales infectados por el BLV desarrollan LP (Abt et al., 1970; Ferrer et al., 1978; Schwartz & Levy, 1994) En el presente estudio, la proporción de animales que exhibieron LP fue mayor (53%) a la descrita. Así mismo, los conteos linfocitarios obtenidos en las vacas con LP muestran un promedio general de 19,388 linfocitos/ μ l para el grupo BLV⁺LP⁺ y en algunos casos se obtuvieron conteos hasta los 30,000 linfocitos/ μ l. Estos valores son ampliamente mayores que los reportados en otros estudios los cuales oscilan entre 7500 y 12000 linfocitos/ μ l (Amills et al., 2004; Ohira et al., 2016; Pyeon & Splitter, 1998; Sordillo et al., 1994; Trueblood et al., 1998). Adicionalmente, los conteos obtenidos en este estudio se incrementaron considerablemente en comparación con los de trabajos previos realizados en el CAIT (Favila de Alba, 2014; Zavaleta H, 2009). Posiblemente, los incrementos en la proporción de animales LP⁺ y de los conteos linfocitarios estén relacionados con la acentuación de la prevalencia en la cuenca lechera evaluada, lo que a la vez puede ser indicativo de una mayor prevalencia de la enfermedad en nuestro país. Por

otro lado, el promedio de los conteos linfocitarios de los animales del grupo BLV⁺LP⁻ (5,056 linfocitos/ μ l) y de los animales no infectados (4,647 linfocitos/ μ l) fue significativamente menor que los del grupo de animales infectados. Este hallazgo fue constante a lo largo del experimento lo cual es sugestivo de la existencia de rasgos de resistencia genéticos en estos grupos (Juliarena et al., 2008) dado que, como se mencionó anteriormente, pertenecen a un complejo lechero que históricamente ha mostrado alta prevalencia.

En los grupos con base al hallazgo de LP, se observó que los títulos de anticuerpos fueron mayores en los animales infectados con LP en congruencia con lo reportado (Juliarena et al., 2007). Del mismo modo, los conteos linfocitarios de los animales del grupo ATA fueron significativamente mayores que los del grupo BTA al igual que en los informes previos (Gutiérrez et al., 2012; Itohara et al., 1985; Ohno et al., 2015). Se ha sugerido que una fuerte respuesta humoral en animales infectados con BLV que desarrollan LP está asociada con un aumento de la expresión de ARNm de IL10 (Pyeon et al., 1996) aunado a una baja expresión de IL12 y IFN γ (Yakobson et al., 1998). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos con relación en la expresión de IL10 dado que se apreció elevada durante el experimento y congruente con la noción de que el desequilibrio en las citocinas puede contribuir a la alta producción de anticuerpos contra BLV (Frie & Coussens, 2015; Sordillo et al., 1994; Yakobson et al., 2000). Cabe señalar que se considera que la producción alta de anticuerpos inducida durante la infección por BLV no es indicativa de protección a la infección ni de progresión de la misma (Frie & Coussens, 2015) ya que la respuesta humoral inducida por BLV se presenta de una manera aberrante (Teutsch & Lewin, 1996). Por tanto, la respuesta de anticuerpos con base a los resultados obtenidos y en la evidencia recabada en diversos estudios debería ser interpretada como un indicador de susceptibilidad en animales con LP.

Por otro lado, se reporta que la carga proviral también está íntimamente relacionada con el conteo de linfocitos de sangre periférica, bazo y linfonodos (Somura et al., 2014) y que los animales que desarrollan LP presentan una carga proviral alta por otro lado, (Juliarena et al., 2007). Estos hallazgos concuerdan con lo observado en el presente estudio debido a que la carga proviral del grupo BLV⁺LP⁺ fue significativamente mayor en comparación con la de los otros grupos y los conteos linfocitarios del grupo ACP fueron significativamente más altos que los del grupo BCP. A pesar de que este hallazgo muestra una relación similar a la obtenida para títulos de anticuerpos, los resultados de la carga proviral son indicativos de progresión dado que mostró incrementos graduales a lo largo del experimento en las vacas infectadas. Dicho hallazgo se observó sin importar el estatus de LP y a pesar de que estos grupos fueron significativamente diferentes y los conteos linfocitarios del BLV⁺LP⁻ fueron marcadamente menores que los del grupo con LP. Lo anterior sugiere que no es conveniente asociar categóricamente una alta carga viral con progresión a linfoma como se sugiere (Aida et al., 2013) debido a que las vacas BLV⁺LP⁻ mostraron una carga viral con incrementos sostenidos que sobrepasaron el valor superior del intervalo en el tercer muestreo además de que la LP se considera como un precedente de linfoma en la mayoría de los casos (Ferrer et al., 1978).

Sin embargo, la determinación de la carga proviral de BLV en un hato es de suma importancia debido a que la mayoría de las vacas desarrollan infección subclínica y pueden infectar a sus compañeras de hato, contribuyendo significativamente a la transmisión de la enfermedad. En infecciones retrovirales, el valor predictivo de la carga proviral es reconocido en varias especies. Por ejemplo, en la infección por el virus del VIH, la baja carga proviral se ha relacionado a supervivencia de los pacientes (Berry et al., 2002; Gueudin et al., 2008), y la

infectividad por BLV es mayor en animales con carga proviral alta, (Ruggiero et al., 2019) De hecho se reporta que los animales con baja carga proviral no transmiten la enfermedad (Juliarena et al., 2016). De este modo, la carga proviral alta y sostenida observada en la población experimental pudo promover una mayor infectividad en la cuenca lechera, ocasionando que en una década la prevalencia se incrementara del 66% (Zavaleta H, 2009) al 73%. Por tal motivo, la implementación de intervalos de carga proviral, como el propuesto en el presente estudio, podría demostrar ser de gran utilidad en la valoración de la infectividad y seguimiento de la progresión de la enfermedad en animales con infección subclínica, particularmente en hatos con alta prevalencia de infección por BLV.

Así mismo, es importante señalar que el hecho de que los animales BLV⁺LP⁻ y BLV⁻ mantuvieran su estatus a lo largo del experimento aún en presencia de una potencial alta infectividad en el hato en estos últimos, sugiere que existen rasgos genéticos de resistencia presentes en estos animales (Carignano et al., 2017; Lo et al., 2020; Xu et al., 1993)

En resumen, los hallazgos reportados en los diversos reportes al igual que los obtenidos en el presente estudio demuestran que la carga proviral y el título de anticuerpos son parámetros íntimamente relacionados con la presencia de LP (Favila de Alba, 2014; Gutiérrez et al., 2012; Itohara et al., 1985). Sin embargo, cabe destacar que en el grupo ACP se observaron títulos de anticuerpos menores que en el grupo BCP en el tercer muestreo (M3). Aunque este hallazgo no presentó diferencia estadística significativa, contradice el paradigma de que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta humoral y la carga proviral (Gillet et al., 2007). Posiblemente lo anterior esté relacionado con inmunosupresión mediada por IL10, ya que en este grupo se observó una expresión mayor estadísticamente significativa de esta citocina a lo largo del experimento. Potencialmente, linfocitos B reguladores (Bregs)

secretoras de IL10 participen en el desarrollo de dicha inmunosupresión ya que modifican el perfil de citocinas necesario para la activación y diferenciación de células plasmáticas, inhibiendo de manera directa la producción de anticuerpos o mediante la inducción de células T reguladoras (Tregs) (Rosser et al., 2014).

Por otro lado, la secreción de IL10 también induce a la secreción de anticuerpos antiinflamatorios. En humanos, la producción de IL10 mediada por Bregs, induce la secreción de anticuerpos antiinflamatorios IgG4 (van de Veen et al., 2013) e IgA (Monteiro, 2014). En bovinos, la polarización de la secreción de inmunoglobulinas también ha sido descrita. Puesto que la co-estimulación de linfocitos B CD5⁺ con IL10 y TGFβ favorece la secreción de IgA. Así mismo, la estimulación con citocinas Th1 (IFNγ e IL2) induce secreción de IgG2 mientras que las citocinas Th2 (IL4 e IL13) favorecen la producción de IgG1 (Estes & Brown, 2002a). Por lo tanto, es posible que la estimulación de IL10 en el grupo ACP promueva la secreción de isotipos antiinflamatorios que no pudieron ser detectados por la prueba de ELISA ya que el protocolo sólo detecta IgG sin hacer diferencia de sub-isotipos.

En relación con la expresión de citocinas en los grupos de estudio, se observó una disminución significativa en la expresión de citocinas del perfil Th1 (IFNγ, IL12 and IL2) en los grupos BLV⁺LP⁺, ATA y ACP en comparación con el grupo BLV⁻ en la mayoría de muestreos. Así mismo, los grupos BLV⁺LP⁻, BTA y BCP presentaron menor expresión de estas citocinas en comparación con el grupo negativo (BLV⁻) en los muestreos M1/M3, M2 y M1/M2, respectivamente. Varios estudios reportan hallazgos similares en los que se observa menor expresión de estas citocinas en animales infectados por BLV, particularmente en animales que cursan con LP (Amills et al., 2002; Pyeon & Splitter, 1999; Yakobson et al., 1998, 2000). Por otro lado, se reporta que los animales BLV⁺ presentan menor expresión de

IFN γ e IL4 en comparación con los animales no infectados (Trueblood et al., 1998), tal y como la expresión observada en los muestreos M2/M3 y M2 de los grupos BLV⁺LP⁺ y ACP, respectivamente. Los hallazgos sugieren una inhibición de las respuestas Th1 y Th2, mediada por IL10 dado que en los grupos LP⁺, ATA y ACP la expresión de esta citocina fue significativamente alta. Los resultados de estudios previos son compatibles con este escenario, inclusive la alta expresión de IL10 en animales BLV⁺ se ha relacionado con la inmunosupresión que a la progresión de la enfermedad y al desarrollo de linfoma. (Amills et al., 2002; Pestka et al., 2004; Pyeon et al., 1996; Yakobson et al., 2000).

Por otro lado, los animales BLV⁺ han presentado una mayor expresión de TGF β aunada a una mayor proporción de linfocitos T Foxp3⁺CD4⁺ (Tregs) en animales que presentan linfocitosis persistente (LP⁺). Lo anterior ha sido relacionado con una disminución de la expresión de citocinas Th1 por parte de los linfocitos CD4⁺ así como con un decremento en la citotoxicidad de célula NK, En conjunto, se desarrolla un estado de inmunosupresión que lleva a la progresión de la enfermedad y al desarrollo de infecciones oportunistas en animales positivos a BLV⁺(Estes & Brown, 2002b; Ohira et al., 2016; Pestka et al., 2004; Sajiki et al., 2020). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerda con lo reportados ya que los animales de los grupos BLV⁺LP⁺ y ATA presentan una mayor expresión de TGF β , en comparación de los grupos BLV⁺LP⁻ y BTA en los muestreos M2 y M3 (Figura 10A y 10B).

Debido a que los resultados son consistentes con inhibición de respuestas Th1 y Th2 mediada por incremento de IL10 y TGF β , es posible que la expansión policlonal de linfocitos B IgM⁺, CD5⁺ y MHC II⁺, identificada como LP, contribuya al enriquecimiento de una población Breg ambiente de inmunosupresión dado que presentan un fenotipo similar (Noh & Lee, 2011). En este contexto, el incremento de Bregs pueden promover un ambiente de

inmunosupresión mediante la secreción de IL10 y TGF β . Aunado a esto, se reconoce que la actividad de Bregs induce a la diferenciación de células T regs Foxp3⁺ (Tr1 y Th3) las cuales refuerzan y mantienen un estado de inmunosupresión (Berthelot et al., 2013; Estes & Brown, 2002b; Nouël et al., 2015; Ohira et al., 2016; Sajiki et al., 2020). En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la expresión aumentada de IL10 y TGF β poseen un rol importante en la inmunosupresión que se observa en los animales BLV⁺, así como el enriquecimiento de células Breg en los animales LP⁺ y su dinámica con las células Treg, contribuyen a la disminución de las respuestas Th1 y Th2.

En cuanto al análisis de los productos del BoLA, se ha postulado que los rasgos de resistencia y susceptibilidad a la LP se encuentran ubicados en las posiciones 70-78, las cuales integran la mayoría de los motivos contenidos en el bolsillo 4. En este modelo, se menciona que los motivos ER en la posición 70-71 están asociados con resistencia mientras que la mayoría están asociados a susceptibilidad se encuentran en la localización 75-78 (VDTY, VDTV y VDRV) (Juliarena et al., 2008; Xu et al., 1993). Sin embargo, en esta propuesta inicial se incluyen motivos bien conservados (posición 75, 76) y semi-conservados (posición 77) y a la par excluye el motivo 74 y motivos descritos en la nueva propuesta de bolsillos de unión al antígeno (Carignano et al., 2017; Lo et al., 2020, 2021). En el presente trabajo, el análisis de los motivos contenidos en los bolsillos es indicativo de que la resistencia y susceptibilidad, se encuentran predominantemente en el bolsillo 4 (posiciones 70-71, 74 y 78), concordando con los estudios iniciales y la propuesta de los bolsillos de unión (binding pockets).

Se ha descrito que el motivo ER/70-71 está fuertemente ligado con resistencia y que cambios de un aminoácido en dicha posición podrían afectar la conformación del sitio y por ende, la presentación del antígeno (Xu et al., 1993). Sin embargo, en el presente estudio los motivos

ER no fueron frecuentes, aunque posiblemente estén asociados con resistencia dado que fueron detectados en animales BLV⁻ y BLV⁺LP⁻ (3/4). No obstante, la principal relación positiva con resistencia se observó en la posición 70-71, como se ha postulado, pero asociada a los motivos K/71, EK/70-71, a diferencia de lo reportado por otros los han relacionado con susceptibilidad (Carignano et al., 2017; Lo et al., 2021). Cabe resaltar que la evidencia recabada indica que la posición 71 tiene suma importancia en la resistencia a la enfermedad ya que es mencionado en los estudios iniciales (Juliarena et al., 2008; Xu et al., 1993) así como en la propuesta de los bolsillos (Lo et al., 2020, 2021). Además, el motivo 71 está presente tanto en el bolsillo 4 como en el bolsillo 7 por lo que un cambio en esta posición puede modificar sustancialmente la conformación de la hendidura, repercutiendo con la presentación del antígeno. Los resultados obtenidos apoyan dicha noción ya que un cambio de aminoácido en esa posición incluso resultó en un cambio de rasgo de resistencia a susceptibilidad. Por ejemplo, K/71 se apreció asociado a resistencia pero R/71 se relacionó con susceptibilidad. Así mismo, se observó que K/71 asociado con un motivo de susceptibilidad alta Y/78 (OR=2.2500) incrementa el valor de susceptibilidad (OR=9.7619). Posiblemente, la divergencia de relación con resistencia de los motivos EK/70-71 con lo reportado en otros estudios radique en la combinación de aminoácidos localizada en otras posiciones tal y como se apreció en el presente estudio.

Si bien la resistencia está centrada en la posición 70-71, los resultados obtenidos sugieren que la resistencia también puede estar ubicada en la posición 78, dependiendo del aminoácido presente. Por ejemplo, Leucina (L) en posición 78 con base en los datos del presente estudio se apreció asociado con resistencia (OR=3.5000) mientras que Valina (V) y Tirosina (Y) en la misma posición al parecer están asociado con susceptibilidad tal y como se ha descrito (Xu

et al., 1993). Adicionalmente, los resultados sugieren que la posición 78 en combinación con otros motivos también podrían determinar el rasgo de resistencia (TL/77-78, OR=5.6341) o susceptibilidad (TV/77-78, OR=2.0000), concordando con la noción descrita para esas posiciones. RE/70-71 y TV/77-78 así como RR/70-7 y TY77-78 indicados como susceptibilidad para las dos combinaciones y E/74 solo para resistencia (Carignano et al., 2017; Lo et al., 2021; Xu et al., 1993). Cabe señalar que el motivo 77 no es motivo descrito para el bolsillo 4, sin embargo, es posible que tenga participación dado que su combinación con L o V en posición 78, incrementó la relación para resistencia (OR= 3.5000) y susceptibilidad (OR=1.3333), respectivamente. A pesar de que la mayoría de las asociaciones se centraron en el P4 con base en los resultados, los motivos Y/30 (P6) y D/57 (P9) presentaron relación con resistencia (OR=2.1250 y OR=6.5000) y el motivo V/86 (P1) la presentó para susceptibilidad (OR=4.0000), revelando la importancia de evaluar otros bolsillos que puedan alterar la estructura de la hendidura.

Adicionalmente, es importante mencionar que en el presente trabajo se encontraron varios motivos no descritos con anterioridad, así como alelos inéditos no reportados en la IPD-MHC (Maccari et al 2017). Dentro de estos destaca el motivo L/78 mismo que presentó una alta frecuencia en la población experimental y dentro de los alelos inéditos. Este hallazgo es relevante porque ese motivo solo está presente en dos alelos de la IPD-MHC (*BoLA-DRB3*143:01* y *BoLA-DRB3*161:01*) y estuvo asociado con resistencia. Adicionalmente, dentro de los motivos inéditos se obtuvieron relaciones de resistencia no antes reportadas: L/78 (OR= 3.5000), R/77 (OR= 1.7500) y E/74 (OR= 1.3968).

No obstante, dichas asociaciones no mostraron significancia estadística a pesar de tener motivos con alto potencial de asociación con resistencia y susceptibilidad. Lo anterior puede

estar ligado a que la diversidad de alelos presentes en la población evaluada ocasionó que la frecuencia de alelos fuera baja en el tamaño de muestra evaluada. Esta variabilidad genética se debe a que las unidades productoras de la cuenca lechera obtienen su genética de fuentes diversas en la implementación de los programas de cría e inseminación artificial, lo cual es una situación deseable para evitar endogamia, pero pudo contribuir a que el valor estadístico no fuera significativo. Esta situación, puede ser solventada si se incrementa el número de alelos. Por otro lado, es posible que los rasgos de resistencia estén vinculados no sólo a uno o dos motivos en el bolsillo, sino que representen la interacción de todos motivos dado que los cambios de aminoácidos detectados influyen notoriamente en la conformación del surco y por ende, en la unión del antígeno. Los valores electrostáticos obtenidos para el bolsillo 4 en los diferentes grupos, así como los modelos tridimensionales obtenidos apoyan dicha hipótesis. De cualquier modo, varios estudios mencionan que los aminoácidos presentes en el bolsillo 4 también influyen en la respuesta inmune a otros patógenos. Las posiciones 13, 71 y 74 están asociadas con la resistencia a la mastitis (Sharif et al., 2000; Yoshida et al., 2009). La respuesta a la vacunación contra la fiebre aftosa se vinculó a las posiciones 57, 61 y 70 (Baxter et al., 2009), ésta última posición corresponde al bolsillo 4. La resistencia a la dermatofitosis en el ganado cebú se ha asociado con el motivo EIAY en las posiciones 66, 67, 74 y 78 (Maillard et al., 1996). así como la falta de 65inDRB3 que está presente en el alelo *DRB3*0201* afecta la conformación del bolsillo 4 y la respuesta inmune resultante a una vacuna contra las garrapatas (Sitte et al., 2002). Por tanto, es posible que los hallazgos del presente estudio sean representativos aún sin ser estadísticamente significativos dado que corresponden a los sitios más frecuentemente relacionados con resistencia e involucran predominantemente al bolsillo 4.

Adicionalmente, el tipo de aminoácidos que conforman el sitio determina la carga electrostática del surco, afectando las interacciones con el péptido. Por tanto, la carga del bolsillo influye directamente en la susceptibilidad o resistencia a las enfermedades. Por ejemplo, se menciona que la carga electrostática influye en la susceptibilidad a la colangitis esclerótica en humanos (Hov et al., 2011). Se reporta que los animales que presentan una carga positiva en el P9 son más resistentes al desarrollo del linfoma inducido por BLV. En el mismo estudio, se aprecia en los modelos presentados que la carga del P4 en animales con susceptibilidad es predominantemente positiva (Lo et al., 2021), concordando con los resultados obtenidos en este trabajo donde se apreció que los animales del grupo BLV⁺LP⁺ (susceptibilidad) el bolsillo 4 presentó una carga electrostática positiva la cual fue significativamente diferente a la obtenida para los grupos BLV⁺LP⁻ y BLV⁻ que mostraron una carga negativa (Figura 11).

Así mismo, los resultados de las cargas electrostáticas obtenidas por grupo, se fortalecieron mediante los modelos tridimensionales de la carga electrostática del bolsillo 4 realizados en los alelos de los diferentes grupos. En la figura 12, se presentan los modelos de tres muestras representativas de cada grupo, donde se puede apreciar que los animales BLV⁺LP⁺ exhiben una carga electrostática positiva (azul) que determina una conformación diferente a la de los animales de los grupos BLV⁺LP⁻ y BLV⁻ que presentan una carga mayoritariamente negativa (roja) en el bolsillo. Sin embargo, existen pocos estudios sobre estas interacciones electrostáticas en animales así como de su interacción con los motivos de los bolsillos que conforman la hendidura del MHC-II. Por tanto, un abordaje adecuado para validar los resultados del presente trabajo sería profundizar en el estudio del modelaje del bolsillo 4, que fue donde se encontraron la mayoría de las relaciones, en conjunto con otros bolsillos

implicados en la resistencia y susceptibilidad con base en sus valores electrostáticos. Para dicho fin, también sería deseable incrementar el tamaño de muestra, aunque puede ser realizado inicialmente con los alelos obtenidos puesto que los valores mostraron significancia estadística.

CONCLUSIÓN.

Los resultados de este trabajo establecen que los parámetros de LP, carga proviral y títulos de anticuerpos de BLV presentan una relación estadísticamente significativa. Así mismo, se observó que los animales infectados por el BLV incrementan su carga proviral a lo largo del tiempo, independientemente de su estatus de LP, lo cual puede tener repercusiones relevantes con la infectividad dentro del hato. Los títulos de anticuerpos son significativamente mayores en animales con LP, sugiriendo que la respuesta humoral posiblemente denota un rasgo de susceptibilidad debido a su asociación con LP. En general, la expresión de citocinas Th1 y Th2 fue significativamente más baja en animales con LP, altos título de anticuerpos y alta carga viral mientras que la expresión de IL10 y TGF β fue mayor en dichos casos, siendo el estatus de LP el que mostro consistentemente una relación estadísticamente significativa con la expresión de las citocinas evaluadas en el presente estudio. Dicho perfil de citocinas sugiere que la inmunosupresión descrita en la infección por BLV es mediada por IL10 y TGF β . Aparentemente, en el transcurso de la enfermedad el efecto de la expresión alta de IL10 y TGF β puede contribuir a la secreción de inmunoglobulinas antiinflamatorias. Con base en los resultados, se propone que la inmunosupresión puede estar relacionada al enriquecimiento de células Bregs (secretoras de IL10 y TGF β) durante la expansión policlonal de linfocitos B (células blanco de la infección) que se define como LP, lo que a su vez induce una población T reguladora, y potencialmente la secreción de inmunoglobulinas

antinflamatorias. La hipótesis se basa en el hecho que el fenotipo de las células blanco (IgM^+ , $CD5^+$ y $MHC II^+$) es similar al descrito para las Breg. Dado que la LP es el parámetro más importante para determinar la progresión de la enfermedad, es de suma importancia su uso en la determinación de rasgos genéticos de resistencia y susceptibilidad. La evaluación de los bolsillos contenidos en los alelos del BoLA DRB3 revelaron que la mayoría de las asociaciones con resistencia y susceptibilidad se encuentran en el bolsillo 4 (motivos 70, 71, 74 y 78), y que en ocasiones la combinación con otro motivo incrementa el rasgo de resistencia o susceptibilidad. Así mismo, se apreció que el cambio de un aminoácido, así como la combinación de motivos con diferente rasgo, puede promover la inversión del rasgo de resistencia o susceptibilidad. Por otro lado, en los animales susceptibles (BLV^+LP^+), la carga electrostática del bolsillo 4 fue positiva y significativamente diferente a la de las vacas con rasgos de resistencia, promoviendo una conformación diferente en los modelos tridimensionales. Por tal motivo, la carga electrostática neta con base en los motivos presentes en el bolsillo 4 determina la conformación del mismo y posiblemente influye en la presentación del antígeno. Los hallazgos obtenidos serán de suma importancia como herramienta para la selección de animales y en el control para la enfermedad dado que la presencia de motivos específicos, así como el potencial electrostático del mismo al parecer participan directamente en la eficiencia de la presentación del antígeno, y por ende, en respuesta inmune contra el BLV en el desarrollo de la infección.

REFERENCIAS

- Abt, D. A., Marshak, R. R., Kulp, H. W., & Pollock, R. J. (1970). Studies on the Relationship Between Lymphocytosis and Bovine Leukosis I. In *International Symposium on Comparative Leukemia Research* (pp. 527–536). <https://doi.org/10.1159/000391747>
- Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M., & Takeshima, S.-N. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00328>
- Akagami, M., Oya, S., Kashima, Y., Seki, S., Ouchi, Y., & Hayama, Y. (2019). A hematologic key for bovine leukemia virus screening in Japanese black cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(4), 568–571. <https://doi.org/10.1177/1040638719848449>
- Amills, M., Norimine, J., Olmstead, C. A., & Lewin, H. A. (2004). Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Cytokine*, 28(1). <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.06.004>
- Amills, M., Ramiya, V., Nonmine, J., & Lewin, H. A. (1998). The major histocompatibility complex of ruminants. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 17, Issue 1).
- Amills, M., Ramiya, V., Norimine, J., Olmstead, C. A., & Lewin, H. A. (2002). Reduced IL-2 and IL-4 mRNA Expression in CD4+ T Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected Cows with Persistent Lymphocytosis. *Virology*, 304(1). <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1651>
- Barez, P.-Y., de Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutiérrez, G., Hamaidia, M., Jacques, J.-R., Perike, S., Neelature Sriramareddy, S., Renotte, N., Staumont, B., Reichert, M., Trono, K., & Willems, L. (2015). Recent Advances in BLV Research. *Viruses*, 7(11), 6080–6088. <https://doi.org/10.3390/v7112929>
- Baxter, R., Craigmile, S. C., Haley, C., Douglas, A. J., Williams, J. L., & Glass, E. J. (2009). BoLA-DR peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. *Vaccine*, 28(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.131>
- Behl, J. D., Verma, N. K., Tyagi, N., Mishra, P., Behl, R., & Joshi, B. K. (2012). The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review. *ISRN Veterinary Science*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.5402/2012/872710>
- Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2007). The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_1, 1), D301–D303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl971>
- Berry, N., Jaffar, S., van der Loeff, M. S., Ariyoshi, K., Harding, E., N’Gom, P. T., Dias, F., Wilkins, A., Ricard, D., Aaby, P., Tedder, R., & Whittle, H. (2002). Low Level Viremia and High CD4% Predict Normal Survival in a Cohort of HIV Type-2-Infected Villagers. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18(16). <https://doi.org/10.1089/08892220260387904>
- Berthelot, J. M., Jamin, C., Amrouche, K., le Goff, B., Maugars, Y., & Youinou, P. (2013). Regulatory B cells play a key role in immune system balance. In *Joint Bone Spine* (Vol. 80, Issue 1, pp. 18–22). <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.04.010>

- Blagitz, M. G., Souza, F. N., Batista, C. F., Azevedo, L. F. F., Sanchez, E. M. R., Diniz, S. A., Silva, M. X., Haddad, J. P., & della Libera, A. M. M. P. (2017). Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Research in Veterinary Science*, *114*, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.012>
- Burng, A. (1980). Bovine leukemia virus: molecular biology and epidemiology. *Viral Oncology*, *231*–*289*. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572824499323849856.bib?lang=en>
- Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., van den Broeke, A., Willems, L., & Thomas, R. (1988). Bovine Leukaemia: Facts and Hypotheses Derived from the Study of an Infectious Cancer. In *Virus Infections and the Developing Nervous System* (pp. 37–56). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1243-4_4
- Cantor, G. H., Pritchard, S. M., Dequiedt, F., Willems, L., Kettmann, R., & Davis, W. C. (2001). CD5 Is Dissociated from the B-Cell Receptor in B Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected, Persistently Lymphocytotic Cattle: Consequences to B-Cell Receptor-Mediated Apoptosis. *Journal of Virology*, *75*(4). <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1689-1696.2001>
- Carignano, H. A., Beribe, M. J., Caffaro, M. E., Amadio, A., Nani, J. P., Gutierrez, G., Alvarez, I., Trono, K., Miretti, M. M., & Poli, M. A. (2017). BOLA-DRB3 gene polymorphisms influence bovine leukaemia virus infection levels in Holstein and Holstein × Jersey crossbred dairy cattle. *Animal Genetics*, *48*(4), 420–430. <https://doi.org/10.1111/age.12566>
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., & Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses* (J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus, Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- da Mota, A. F., Martinez, M. L., & Coutinho, L. L. (2004). Genotyping BoLA-DRB3 alleles in Brazilian Dairy Gir cattle (*Bos indicus*) by temperature-gradient gel electrophoresis (TGGE) and direct sequencing. *European Journal of Immunogenetics*, *31*(1), 31–35. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2370.2004.00438.X>
- Davies, C. J., Andersson, L., Ellis, S. A., Hensen, E. J., Lewin, H. A., Mikko, S., Muggli-Cockett, N. E., van der Poel, J. J., & Russell, G. C. (1997). Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics*, *28*(3), 159–168. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2052.1997.00106.X>
- Edwards, S. v., & Hedrick, P. W. (1998). Evolution and ecology of MHC molecules: From genomics to sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, *13*(8), 305–311. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01416-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01416-5)
- Emanuelson, U., Scherling, K., & Pettersson, H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, *12*(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90075-Q](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90075-Q)
- Estes, D. M., & Brown, W. C. (2002a). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *90*(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00201-5)
- Estes, D. M., & Brown, W. C. (2002b). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *90*(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00201-5)

- Favila de Alba, R. (2014). *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)* [National Autonomous University of Mexico]. <http://132.248.9.195/ptd2014/noviembre/0721708/Index.html>
- Ferrer, J. F., Marshak, R. R., Abt, D. A., & Kenyon, S. J. (1978). Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 9(4), 851–857. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00901079>
- Florins, A., Boxus, M., Vandermeers, F., Verlaeten, O., Bouzar, A.-B., Defoiche, J., Hubaux, R., Burny, A., Kettmann, R., & Willems, L. (2008). Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.04.007>
- Fraczkiewicz, R., & Braun, W. (1998). Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *Journal of Computational Chemistry*, 19(3), 319–333. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199802\)19:3<319::AID-JCC6>3.0.CO;2-W](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199802)19:3<319::AID-JCC6>3.0.CO;2-W)
- Frie, M. C., & Coussens, P. M. (2015). Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014>
- Fries, R., Eggen, A., & Womack, J. E. (1993). The bovine genome map. *Mammalian Genome* 1993 4:8, 4(8), 405–428. <https://doi.org/10.1007/BF00296815>
- Fries, R., Hediger, R., & Stranzinger, G. (1986). Tentative chromosomal localization of the bovine major histocompatibility complex by in situ hybridization. *Animal Genetics*, 17(2), 287–294. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2052.1986.TB00722.X>
- 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. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
- Gueudin, M., Damond, F., Braun, J., Taïeb, A., Lemée, V., Plantier, J.-C., Chêne, G., Matheron, S., Brun-Vézinet, F., & Simon, F. (2008). Differences in proviral DNA load between HIV-1- and HIV-2-infected patients. *AIDS*, 22(2). <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f42429>
- Gutiérrez, G., Alvarez, I., Politzki, R., Lomónaco, M., Dus Santos, M. J., Rondelli, F., Fondevila, N., & Trono, K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 151(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.035>
- Gutiérrez, G., Carignano, H., Alvarez, I., Martínez, C., Porta, N., Politzki, R., Gammella, M., Lomonaco, M., Fondevila, N., Poli, M., & Trono, K. (2012). Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Veterinary Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-187>
- Gwakisa, P., Mikko, S., & Andersson, L. (1994). Close genetic linkage between DRBP1 and CYP21 in the MHC of cattle. *Mammalian Genome*, 5(11), 731–734. <https://doi.org/10.1007/BF00426083>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95–98.
- Hedrick, P. W., Parker, K. M., Gutiérrez-Espeleta, G. A., Rattink, A., & Lievers, K. (2000). Major histocompatibility complex variation in the Arabian oryx. In *Evolution* (Vol. 54, Issue 6).
- Heinecke, N., Tórtora, J., Martínez, H. A., González-Fernández, V. D., & Ramírez, H. (2017). Detection and genotyping of bovine leukemia virus in Mexican cattle. *Archives of Virology*, 162(10). <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3477-z>
- Hill, A. V. S. (1998). The immunogenetics of human infectious diseases. *Annual Review of Immunology*, 16(1), 593–617. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.593>
- Hov, J. R., Kosmoliaptsis, V., Traherne, J. A., Olsson, M., Boberg, K. M., Bergquist, A., Schrupf, E., Bradley, J. A., Taylor, C. J., Lie, B. A., Trowsdale, J., & Karlsen, T. H. (2011). *Electrostatic Modifications of the Human Leukocyte Antigen-DR P9 Peptide-Binding Pocket and Susceptibility to Primary Sclerosing Cholangitis*. <https://doi.org/10.1002/hep.24299>
- Hutchinson, H. C., Ruggiero, V. J., Norby, B., Sporer, K. R. B., & Bartlett, P. C. (2021). Diagnostic measures of disease progression in cattle following natural infection with bovine leukemia virus. *Pathogens*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/pathogens10080987>
- ITOHARA, S., OIKAWA, I., TERUI, S., & MIZUNO, Y. (1985). Infectivities of bovine leukemia virus in peripheral blood lymphocytes from naturally infected cattle and their relation to persistent lymphocytosis and antibody titers. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 47(5). <https://doi.org/10.1292/jvms1939.47.807>
- Juliarena, M. A., Barrios, C. N., Ceriani, M. C., & Esteban, E. N. (2016). Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *Journal of Dairy Science*, 99(6). <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10480>
- Juliarena, M. A., Gutierrez, S. E., & Ceriani, C. (2007). Determination of proviral load in bovine leukemia virus–infected cattle with and without lymphocytosis. *American Journal of Veterinary Research*, 68(11), 1220–1225. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.11.1220>
- Juliarena, M. A., Poli, M., Ceriani, C., Sala, L., Rodríguez, E., Gutierrez, S., Dolcini, G., Odeon, A., & Esteban, E. N. (2009). Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. *Journal of Dairy Science*, 92(1). <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1143>
- Juliarena, M. A., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Rodriguez, E. M., Mario, B., Rodriguez-Dubra, C., & Esteban, E. N. (2008). Association of BLV infection profiles with alleles of the *BoLA-DRB3.2* gene. *Animal Genetics*, 39(4), 432–438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01750.x>
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.3280>

- Kettmann, R., Portetelle, D., Mammerickx, M., Cleuter, Y., Dekegelo, D., Galoux, M., Ghysdael, J., Burny, A., & Chantrenne, H. (1976). Bovine leukemia virus: An exogenous RNA oncogenic virus (simultaneous detection/relatedness/DNA-DNA hybridizations). In *Biochemistry* (Vol. 73, Issue 4).
- Konnai, S., Usui, T., Ikeda, M., Kohara, J., Hirata, T., Okada, K., Ohashi, K., & Onuma, M. (2005). Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. *Virology*, 339(2). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.010>
- Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H. W., Mason, S., Erskine, R., & van der Meer, F. (2021). Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 104, Issue 6, pp. 6358–6375). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18925>
- Lavanya, M., Kinet, S., Montel-Hagen, A., Mongellaz, C., Battini, J.-L., Sitbon, M., & Taylor, N. (2008). Cell Surface Expression of the Bovine Leukemia Virus-Binding Receptor on B and T Lymphocytes Is Induced by Receptor Engagement. *The Journal of Immunology*, 181(2). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.891>
- Lee, L. C., Scarratt, W. K., Buehring, G. C., & Saunders, G. K. (2012). *Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma*.
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Lewin H. (1996). Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572543025466511360.bib?lang=en>
- Lewin, H., Wu, M.-C., Nolan, T. J., & Stewart, J. A. (1988). Peripheral B Lymphocyte Percentage as an Indicator of Subclinical Progression of Bovine Leukemia Virus Infection. *Journal of Dairy Science*, 71(9). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79841-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79841-0)
- Llames, L., Goyache, J., Domenech, A., Arjona, A., Suarez, G., & Gomez-Lucia, E. (2001). Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Virology*, 22(1). [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(01\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(01)00154-8)
- Lo, C. W., Borjigin, L., Saito, S., Fukunaga, K., Saitou, E., Okazaki, K., Mizutani, T., Wada, S., Takeshima, S. N., & Aida, Y. (2020). BoLA-DRB3 polymorphism is associated with differential susceptibility to bovine leukemia virus-induced lymphoma and proviral load. *Viruses*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/v12030352>
- Lo, C. W., Takeshima, S. N., Okada, K., Saitou, E., Fujita, T., Matsumoto, Y., Wada, S., Inoko, H., & Aida, Y. (2021). Association of bovine leukemia virus-induced lymphoma with bola-drb3 polymorphisms at dna, amino acid, and binding pocket property levels. *Pathogens*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens10040437>
- Maccari, G., Robinson, J., Ballingall, K., Guethlein, L. A., Grimholt, U., Kaufman, J., Ho, C.-S., de Groot, N. G., Flicek, P., Bontrop, R. E., Hammond, J. A., & Marsh, S. G. E. (2017). IPD-MHC

- 2.0: an improved inter-species database for the study of the major histocompatibility complex. *Database Issue Published Online*, 45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1050>
- Maccari, G., Robinson, J., Bontrop, R. E., Otting, N., de Groot, N. G., Ho, C. S., Ballingall, K. T., Marsh, S. G. E., & Hammond, J. A. (2018). IPD-MHC: nomenclature requirements for the non-human major histocompatibility complex in the next-generation sequencing era. *Immunogenetics*, 70(10), 619–623. <https://doi.org/10.1007/s00251-018-1072-4>
- Maillard, J. C., Martinez, D., & Bensaïd, A. (1996). An Amino Acid Sequence Coded by the Exon 2 of the BoLA DRB3 Gene Associated with a BoLA Class I Specificity Constitutes a Likely Genetic Marker of Resistance to Dermatophilosis in Brahman Zebu Cattle of Martinique (FWI). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 791(1), 187–197.
- Mirsky, M. L., Olmstead, C., Da, Y., & Lewin, H. A. (1998). Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Animal Genetics*, 29(4), 245–252. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2052.1998.00320.X>
- Monteiro, R. C. (2014). Immunoglobulin A as an anti-inflammatory agent. *Clinical & Experimental Immunology*, 178. <https://doi.org/10.1111/cei.12531>
- Motton, D. D., & Buehring, G. C. (2003). Bovine Leukemia Virus Alters Growth Properties and Casein Synthesis in Mammary Epithelial Cells. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2826–2838. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(03\)73880-6](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(03)73880-6)
- Noh, G., & Lee, J. H. (2011). Regulatory B Cells and Allergic Diseases. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 3(3). <https://doi.org/10.4168/aaair.2011.3.3.168>
- Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., le Meur, Y., Pers, J. O., & Hillion, S. (2015). B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in a CTLA-4 dependent manner. *Journal of Autoimmunity*, 59, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.02.004>
- Ohira, K., Nakahara, A., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Maekawa, N., Ikebuchi, R., Kohara, J., Murata, S., & Ohashi, K. (2016). Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF- β secretion from regulatory T cells. *Inflammation and Disease*, 4(1), 52–63. <https://doi.org/10.1002/iid3.93>
- Ohno, A., Takeshima, S., Matsumoto, Y., & Aida, Y. (2015). Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Research*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.020>
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. (2013). *Kuby immunology*. WH Freeman.
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., & Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 22, pp. 929–979). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 9).
- Pyeon, D., O'Reilly, K. L., & Splitter, G. A. (1996). Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *Journal of Virology*, 70(8). <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5706-5710.1996>

- Pyeon, D., & Splitter, G. A. (1998). Interleukin-12 p40 mRNA Expression in Bovine Leukemia Virus-Infected Animals: Increase in A lymphocytosis but Decrease in Persistent Lymphocytosis. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 72, Issue 8). <http://jvi.asm.org/>
- Pyeon, D., & Splitter, G. A. (1999). Regulation of Bovine Leukemia Virus *tax* and *pol* mRNA Levels by Interleukin-2 and -10. *Journal of Virology*, 73(10). <https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8427-8434.1999>
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., & Cartuyvels, R. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(3), 145–151. <https://doi.org/10.1002/jcla.20307>
- Rodríguez, S. M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Teresa Sánchez-Alcaraz, M., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K., Alvarez, I., Vagnoni, L., & Willems, L. (2011). Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. *Viruses*, 3, 1210–1248. <https://doi.org/10.3390/v3071210>
- Rosser, E. C., Blair, P. A., & Mauri, C. (2014). Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. In *Molecular Immunology* (Vol. 62, Issue 2, pp. 296–304). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.014>
- Ruggiero, V. J., Norby, B., Benitez, O. J., Hutchinson, H., Sporer, K. R. B., Droscha, C., Swenson, C. L., & Bartlett, P. C. (2019). Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 9165–9175. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-16186>
- Russell, G. C., Smith, J. A., & Oliver, R. A. (2004). Structure of the BoLA-DRB3 gene and promoter. *European Journal of Immunogenetics*, 31(3), 145–151. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2370.2004.00461.X>
- Sajiki, Y., Konnai, S., Goto, S., Okagawa, T., Ohira, K., Shimakura, H., Maekawa, N., Gondaira, S., Higuchi, H., Tajima, M., Hirano, Y., Kohara, J., Murata, S., & Ohashi, K. (2020). The Suppression of Th1 Response by Inducing TGF- β 1 From Regulatory T Cells in Bovine Mycoplasmosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.609443>
- Schrödinger LLC. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version~1.8*.
- Schwartz, I., & Levy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary Research*, 25(6), 521–536.
- Sharif, S., Mallard, B. A., & Sargeant, J. M. (2000). Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76(3–4), 231–238. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00216-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00216-6)
- Sitte, K., Brinkworth, R., East, I. J., & Jazwinska, E. C. (2002). A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(3–4), 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00430-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00430-5)
- Somura, Y., Sugiyama, E., Fujikawa, H., & Murakami, K. (2014). Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle

- with latent infection. *Archives of Virology*, 159(10). <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2137-9>
- Sordillo, L. M., Hicks, C. R., & Pighetti, G. M. (1994). Altered Interleukin-2 Production by Lymphocyte Populations from Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 207(3), 268–273. <https://doi.org/10.3181/00379727-207-43815>
- Stank, A., Kokh, D. B., Fuller, J. C., & Wade, R. C. (2016). Protein Binding Pocket Dynamics. *Accounts of Chemical Research*, 49(5), 809–815. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00516>
- Stoddart, M. J. (2011). *Mammalian Cell Viability* (M. J. Stoddart, Ed.; 1st ed., Vol. 740). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Takeshima, S., nosuke, Sarai, Y., Saitou, N., & Aida, Y. (2009). MHC class II DR classification based on antigen-binding groove natural selection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(2), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.142>
- Takezawa, S., Maezawa, M., Tsuzuku, S., Kawakami, J., Oouci, Y., & Inokuma, H. (2021). Abnormal clonalities of b-lymphocytes in bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(12), 1928–1932. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0357>
- Teutsch, M. R., & Lewin, H. A. (1996). Aberrant expression of immunoglobulin mRNA in bovine leukemia virus-infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53(1–2). [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(96\)05558-4](https://doi.org/10.1016/0165-2427(96)05558-4)
- Thiermann, A. B. (2015). International standards: the World Organisation for Animal Health Terrestrial Animal Health Code. In *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* (Vol. 34, Issue 1).
- Trainin, Z., Brenner, J., Meirom, R., & Ungar-Waron, H. (1996). Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54(1–4). [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05706-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05706-6)
- Trueblood, E. S., Brown, W. C., Palmer, G. H., Davis, W. C., Stone, D. M., & McElwain, T. F. (1998). B-Lymphocyte Proliferation during Bovine Leukemia Virus-Induced Persistent Lymphocytosis Is Enhanced by T-Lymphocyte-Derived Interleukin-2. *Journal of Virology*, 72(4). <https://doi.org/10.1128/JVI.72.4.3169-3177.1998>
- van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D. G., Rückert, B., Akdis, C. A., & Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 1204–1212. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.014>
- van Eijk, M. J. T., Beever, J. E., Da, Y., Stewart, J. A., Nicholaides, G. E., Green, C. A., & Lewin, H. A. (1995). Genetic mapping of BoLA-A, CYP21, DRB3, DYA, and PRL on BTA23. *Mammalian Genome*, 6(2), 151–152. <https://doi.org/10.1007/BF00303266>
- van Eijk, M. J. T., Stewart-Haynes, J. A., & Lewin, H. A. (1992). Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. In *Animal Genetics* (Vol. 23).
- Varmus, H. (1988). Retroviruses. *Science*, 240(4858), 1427–1435. <https://doi.org/10.1126/science.3287617>

- Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., García, M. L., Curtis Hendrickson, R., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Łobocka, M., Oksanen, H. M., Orton, R. J., Robertson, D. L., Rubino, L., ... Zerbini, F. M. (2022). Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Xu, A., van Eijk, M. J. T., Park, C., & Lewin, H. A. (1993). *Polymorphism in BOLA-DRB3 Exon 2 Correlates with Resistance to Persistent Lymphocytosis Caused by Bovine Leukemia Virus* (Vol. 151, Issue 12).
- Yahara, Y., Ohkubo, Y., Kariwa, H., & Takashima, I. (2002). Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Immunofluorescent Antibody (IFA) Test for the Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Antibody in Pigs from Conventional Farms. *Journal of Veterinary Medical Science*, *64*(7), 583–588. <https://doi.org/10.1292/JVMS.64.583>
- Yakobson, B., Brenner, J., Ungar-Waron, H., & Trainin, Z. (1998). Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *64*(3). [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00136-6)
- Yakobson, B., Brenner, J., Ungar-Waron, H., & Trainin, Z. (2000). Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *23*(3). [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(99\)00074-0](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(99)00074-0)
- Yoshida, T., Mukoyama, H., Furuta, H., Kondo, Y., Takeshima, S. N., Aida, Y., Kosugiyama, M., & Tomogane, H. (2009). Association of the amino acid motifs of BoLA-DRB3 alleles with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Animal Science Journal*, *80*(5), 510–519. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00664.x>
- Zanotti, M., Poli, G., Ponti, W., Polli, M., Rocchi, M., Bolzani, E., Longeri, M., Russo, S., Lewin, H. A., & van Eijk, M. J. (1996). Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genetics*, *27*(5), 337–341. <http://europepmc.org/abstract/MED/8930075>
- Zavaleta H, J. N. (2009). *Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de la Leucosis enzoótica bovina (vLEB)* [National Autonomous University of Mexico]. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000652749
- Zhou, H., Hickford, J. G. H., Fang, Q., & Byun, S. O. (2007). Short Communication: Identification of Allelic Variation at the Bovine DRA Locus by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformational Polymorphism. *Journal of Dairy Science*, *90*(4), 1943–1946. <https://doi.org/10.3168/JDS.2006-578>

Apéndice 1: Relationship of Persistent Lymphocytosis, Antibody Titers and Proviral Load with Expression of IL12, IFN γ , IL2, IL4, IL10 and TGF β in Cows Infected with Bovine Leukemia Virus from a High-Prevalence Dairy Complex.

Relationship of persistent lymphocytosis, antibody titers, and proviral load with expression of interleukin-12, interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor- β in cows infected with bovine leukemia virus from a high-prevalence dairy complex

Ernesto Marin-Flamand, Diana Michele Araiza-Hernandez, Alejandro Vargas-Ruiz, Ignacio Carlos Rangel-Rodríguez, Lilia A. González-Tapia, Hugo Ramírez-Álvarez, Ruperto Javier Hernández-Balderas, Lucía Angélica García-Camacho

Abstract

Bovine leukemia virus (BLV) subclinical infection promotes persistent lymphocytosis (PL), which is related to susceptibility and progression to lymphoma. Moreover, lymphocyte counts directly correlate with BLV antibody titers and proviral load, and cell immune responses are considered atypical due to immune suppression. In order to determine the relationship of PL, antibody titers, and proviral load with interleukin (IL)-12, interferon (IFN)- γ , IL-2, IL-4, IL-10, and transforming growth factor (TGF)- β expression in a 3-month interval, 58 cows were selected (30 BLV⁺ and 28 BLV⁻) from a high-prevalence dairy herd to complete 3 monthly blood samplings for the assessment of PL, BLV antibody titers, BLV proviral load, and IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, and TGF- β expression. At sampling conclusion, the BLV-infected cows were grouped according to PL, BLV proviral load, and BLV antibody titers as follows: BLV⁺PL⁺ ($n = 16$) and BLV⁺PL⁻ ($n = 14$); high proviral load (HPL) ($n = 18$) and low proviral load (LPL) ($n = 13$); high antibody titers (HAT) ($n = 17$) and low antibody titers (LAT) ($n = 14$). The BLV⁺PL⁺ cows showed significantly higher proviral load and antibody titers than the BLV⁺PL⁻ group; however, the former suggested spread presumably unrelated to lymphoma outcome, because HPL was observed in PL⁻ cows in the last sampling. Consistent with the data, a higher antibody response strongly indicated BLV susceptibility since it was linked to PL⁺ occurrence and a cytokine profile compatible with immune suppression. Furthermore, a reversion to lower antibody titers was observed in cows with HPL far ahead of time, most likely due to long-term immune suppression. In addition, high expression of IL-10 and TGF- β was associated with reduced IL-12, IFN- γ , IL-2, and IL-4 expression alongside PL, HAT, and HPL in BLV-infected cows, suggesting an IL-10- and TGF- β -induced immune suppression. The IL-10 expression was increasing throughout, implying disease progression, as described. In conclusion, the proliferative expansion of lymphocytes known as PL might enhance a regulatory-rich cell population (Bregs and/or Tregs) that secretes IL-10 and TGF- β , leading to immune suppression. Further studies must be conducted regarding the types of regulatory cells involved in BLV-induced immune suppression.

Résumé

L'infection subcliniqué par le virus de la leucémie bovine (BLV) favorise une lymphocytose persistante (PL), qui est liée à la susceptibilité et à la progression vers le lymphome. De plus, le nombre de lymphocytes est directement corrélé aux titres d'anticorps BLV et à la charge provirale, et les réponses immunitaires cellulaires sont considérées comme atypiques en raison de la suppression immunitaire. Afin de déterminer la relation entre PL, les titres d'anticorps et la charge provirale avec l'interleukine (IL)-12, l'interféron (IFN)- γ , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 et l'expression du facteur de croissance transformant (TGF)- β dans un intervalle de 3 mois, 58 vaches ont été sélectionnées (30 BLV⁺ et 28 BLV⁻) à partir d'un troupeau laitier à forte prévalence pour compléter trois prélèvements sanguins mensuels pour l'évaluation de PL, des titres d'anticorps BLV, de la charge provirale BLV et l'expression d'IL-12, IFN- γ , d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10 et TGF- β . À la fin de l'échantillonnage, les vaches infectées par le BLV ont été regroupées en fonction du PL, de la charge provirale du BLV et des titres d'anticorps du BLV comme suit : BLV⁺PL⁺ ($n = 16$) et BLV⁺PL⁻ ($n = 14$); charge provirale élevée (HPL) ($n = 18$) et charge provirale faible (LPL) ($n = 13$); titres d'anticorps élevés (HAT) ($n = 17$) et titres d'anticorps faibles (LAT) ($n = 14$). Les vaches BLV⁺PL⁺ ont montré une charge provirale et des titres d'anticorps significativement plus élevés que le groupe BLV⁺PL⁻; cependant, le premier suggère une propagation vraisemblablement sans rapport avec l'issue du lymphome, car HPL a été observé chez les vaches PL⁻ lors du dernier échantillonnage. Conformément aux données, une réponse anticorps plus élevée indiquait fortement une sensibilité au BLV puisqu'elle était liée à l'apparition de PL⁺ et à un profil de cytokines compatible avec la suppression immunitaire. De plus, un retour à des titres d'anticorps plus faibles a été observé chez les vaches atteintes de HPL bien avant le temps, probablement en raison d'une immunosuppression à long terme. De plus, une expression élevée d'IL-10

Department of Biological Sciences, College of Superior Studies, National University of Mexico, Cuautitlán-Teoloyucan km 2.5, 54714 Cuautitlán Izcalli, Mexico City, Mexico.

Address all correspondence to Dr. Lucía A. García-Camacho; telephone: (52) 55 56231999; email: luci Angie30@hotmail.com

Received January 6, 2022. Accepted June 18, 2022.

et de TGF- β était associée à une expression réduite d'IL-12, d'IFN- γ , d'IL-2 et d'IL-4 aux côtés de PL, HAT et HPL chez les vaches infectées par le BLV, suggérant une immunosuppression induite par IL-10 et le TGF- β . L'expression d'IL-10 augmentait tout au long, impliquant une progression de la maladie, comme décrit. En conclusion, l'expansion proliférative des lymphocytes connus sous le nom de PL pourrait renforcer une population de cellules riches en régulation (Bregs et/ou Tregs) qui sécrète d'IL-10 et du TGF- β , conduisant à une suppression immunitaire. D'autres études doivent être menées sur les types de cellules régulatrices impliquées dans la suppression immunitaire induite par le BLV.

(Traduit par Docteur Serge Messier)

Introduction

Worldwide, bovine leukemia virus (BLV) causes a long-lasting, slow-growing subclinical infection in cattle that can eventually progress to malignant lymphocyte proliferation (1). Bovine leukemia virus is a *Deltaretrovirus*, which belongs to the *Retroviridae* family, containing typical retroviral genes (*gag*, *pol*, and *env*) codifying for structural and regulatory proteins. *Deltaretrovirus* is commonly associated with non-neoplastic proliferation of lymphocytes, lymphoid neoplasia, and progressive myelopathies (1,2).

A BLV infection typically induces a chronic B-cell proliferative syndrome known as persistent lymphocytosis (PL), which is defined as a sustained increase of lymphocyte absolute numbers above the average for at least 3 mo (3). The target cells for BLV infection are immunoglobulin M (IgM)⁺, CD5⁺, CD11b⁺, and MHCII⁺ B-cells that polyclonally expand to generate PL (4–8). In BLV⁺ animals displaying PL, most of the peripheral blood CD5⁺ B-cells contain BLV provirus (9). Persistent lymphocytosis is usually subclinical and linked to susceptibility, likely as a genetic trait (1,2,10).

Most BLV-infected animals (65 to 70%) remain asymptomatic, but approximately 1/3 develop PL (11). Only a small proportion of infected cattle (5 to 10%) progress to lymphoma (11). Approximately 2/3 of BLV-induced lymphomas are preceded by PL, especially in cattle over 3 y old (12,13). Although PL is a good indicator of BLV infection, it is not necessary to progress to lymphoma; therefore, every single infected animal cannot be identified by observing for PL. Nevertheless, PL provides an excellent association with severity and progression of disease in subclinically infected animals (14).

The BLV antibodies are secreted between 2 and 8 wk post-infection and activity of peripheral blood cytotoxic T-cells specific to tax and *env* epitopes arises at early seroconversion. These responses amplify and persist for life, indicating that the immune system is constantly stimulated during BLV infection (6). Lymphocyte counts directly correlate with BLV antibody titers and viral load (1,15–17), suggesting that antibodies occur in response to high viral load (6,18). In Mexico, substantially higher PL values have been reported, perhaps due to a high prevalence of BLV infection, which is significantly related to high proviral load (HPL) and high antibody titers (HAT) (19,20). In addition, BLV viral load is significantly higher in cows with lymphoma, suggesting that increments of viral load are associated with disease severity (21). The latter may be indicative of disease progression.

Adaptive immunity, however, is composed of archetypical responses effected through particular cytokine profiles. Hence, IFN- γ , IL-2, and IL-12 are representative of type 1 helper (Th1) responses, whereas IL-4 is representative of Th2 responses (22,23). These responses are restrained by IL-10 and TGF- β , which are the

main components of regulatory responses (24–26). The BLV⁺ infected cows with PL have demonstrated lower Th1 and Th2 cytokine expression than BLV⁺ PL⁻ and uninfected animals, depicting an atypical immune response that is relevant to disease pathogenesis (22,27–29). Conversely, the expression of regulatory cytokines (IL-10 and TGF- β) have been higher in BLV⁺/PL⁺ cows compared to BLV⁺/PL⁻ animals (23–26,30). Such profiles are evidence of a strong immune suppression induced by BLV.

The mechanisms causing PL to occur in BLV infection have not been fully elucidated but it is acknowledged that PL promotes inappropriate Th1 and Th2 responses (23). Because of this, the aim of this work is to achieve a comprehensive cytokine profile through the evaluation of IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, and TGF- β expression to determine its relationship with PL, antibody titers, and proviral load during a 3-month interval.

Materials and methods

Experimental design

One hundred and fifty-five cows having had second to third pregnancies (between 2- to 3-years-old) from production units in a dairy complex with a high prevalence of BLV located in central Mexico were sampled to determine their BLV infection status by final point polymerase chain reaction (PCR) using *env* gene specific primers. Thirty positive (BLV⁺) and 28 negative (BLV⁻) animals were selected. In the selected animals, 3 monthly blood samplings (S1, S2, and S3) were taken to determine lymphocyte counts, BLV antibody titers, and BLV proviral load as well as IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, and TGF- β expression through routine hematological methods, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and quantitative PCR (qPCR), respectively. All samplings were taken in the morning, after milking, during the fall season (September to November). At the third month, PL was assessed to group animals as follows: BLV⁺PL⁺ ($n = 16$), BLV⁺PL⁻ ($n = 14$), and BLV⁻ ($n = 28$). In addition, upper limit interval values were established to group for proviral load and antibody titers as follows: HPL ($n = 17$), low proviral load (LPL) ($n = 13$), and BLV⁻ ($n = 28$) groups; HAT ($n = 17$), low antibody titers (LAT) ($n = 13$), and BLV⁻ ($n = 28$), respectively.

Hematology

The total leukocyte and differential counts were done using automatic methods (Abacus Junior Vet; Diatron, Budapest, Hungary) and manually using Wright-stained blood smears to calculate the absolute lymphocyte numbers (31) from each monthly sample. The consecutive lymphocyte counts were evaluated to comply with the

Table I. Primers designed for amplification in conventional polymerase chain reaction (PCR) and quantitative PCR.

Primer	Sequence	Annealing temperature (°C)	Product length (bp)	Gen Bank position/accession number
BLVenv/F-5852	ACGCTTGATCACAGCAATTA	52	674	5852-6525/K_02120
BLVenv/R-6525	TCTCTGCGCTACACTCAGTC			
BLVpol/F-6473	GGCGATTTCTTGCAGCTGTGCTAA	60	199	6473-6671/AF_033818
BLVpol/R-6671	AACCTCTGAGCCACAACCTTCCTT			
HPRT/F-182	TTGCCGACCTGTTGGATTAC	50	229	182-410/AF_176419
HPRT/R-410	TTGACCAAGGCAAGCAAAGT			
IFN- γ /F-983	CCACTACTTTGATGGCATGT	60	106	983-1088/NM_174086
IFN- γ /R-1088	TGAAGCGCCAGGTATAAGG			
IL-12/F-643	AGCTTGGAGCACAGGGAGTA	60	110	643-752/NM_174645
IL-12/R-752	TGCACAGCTTCTACCACGA			
IL-2/F-245	GCCCAAGGTTAACGCTACAG	60	104	245-348/NM_180997
IL-2/R-348	GGTTCAGGTTTTTGCTTGA			
IL-4/F-77	CCTACCAGCTGATCCAGTG	60	114	77-190/NM_173921
IL-4/R-190	TGAGGATGTTTCAGCGTTTTG			
L10/F-455	CTCCAAGAGAGGGGTGTCT	60	127	445-571/NM_174088
L10/R-571	TCACCATCCTGGAGGTCTTC			
TGF- β /F-1193	TGCTTCAGCTCCACAGAAAA	60	146	1193-1338/NM_001166068
TGF- β /R-1338	TCCAGGCTCCAGATGTAAGG			

3 mo apart requirement for the determination of PL, using a reference value of 7500 cells/ μ L in accordance with reference values for second and third pregnancy cows (1,32–36).

DNA extraction

Peripheral blood mononuclear cells were obtained through gradients (Histopaque-1077; Sigma, St. Louis, Missouri, USA) to extract DNA by means of commercial kits following the manufacturer's instructions (One-4-All Genomic DNA Miniprep Kit; Bio Basic, Markham, Ontario). The DNA was eluted in 200 μ L of molecular grade water and quantified by spectrophotometry (NanoDrop Lite; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) to be stored in 50 ng/ μ L aliquots at -20°C .

Indirect ELISA

The BLV antibody titers were determined by indirect ELISA using a commercial kit following the manufacturer's instructions (BLV antibody test kit; VMRD, Pullman, Washington, USA). Each sample in triplicate was placed in a 96-well BLV gp51-coated microplate, including 1 positive control serum and 2 negative sera provided by the manufacturer, to detect gp51 specific antibodies using a bovine anti-IgG peroxidase conjugate. Then, the samples were revealed to read the optical density in an absorbance microplate reader (ELx800; BioTek, Winooski, Vermont, USA). The validation of the ELISA test was performed according to the OIE international procedures by means of the inhibition percentage (IP) estimation according to following premises: i) the optical density average of the negative control must be ≤ 0.800 ; and ii) the IP value of the samples must not

be $\geq 25\%$ among triplicates (37). The samples with IP values $< 35\%$ and $\geq 40\%$ were considered negative and positive, respectively. The sample-to-positive ratio (S/P) was determined, as described (38), and the S/P upper limit interval value (1.992 S/P) was determined at 1 standard deviation above the mean, using the first sample.

Primer design

Published sequences were selected from GenBank to design specific primers for each BLV env gene, pol gene, IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, and TGF- β , using the Primer3 Input program (v3.0.0; Whitehead Institute for Biomedical Research, Boston, Massachusetts, USA) (39). In addition, the sets of primers were aligned and edited with the BioEdit program (v7.2.5; Ibis Biosciences, Carlsbad, California, USA) (40). All primer pairs are listed in Table I.

Final-point PCR

To determine the cow BLV status, PCR was performed in a thermocycler (Mastercycler Gradient Thermal Cycler; Eppendorf, Hamburg, Germany) in 50- μ L reactions using the env gene specific primers and Master Mix 1 \times (MyTaq; Bioline, London, England) containing 2.5 U Taq DNA polymerase, PCR buffer 1 \times , magnesium chloride 1.5 mM, 0.2 mM of each deoxynucleotide, 50 pM of each primer, and 50 ng of DNA template. Optimized amplification conditions determined *via* temperature gradients and ranges of concentrations for magnesium chloride, primers, and cDNA template were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 40 s, and elongation at 72°C for 50 min, ending with a 7-minute final extension at 72°C . The PCR

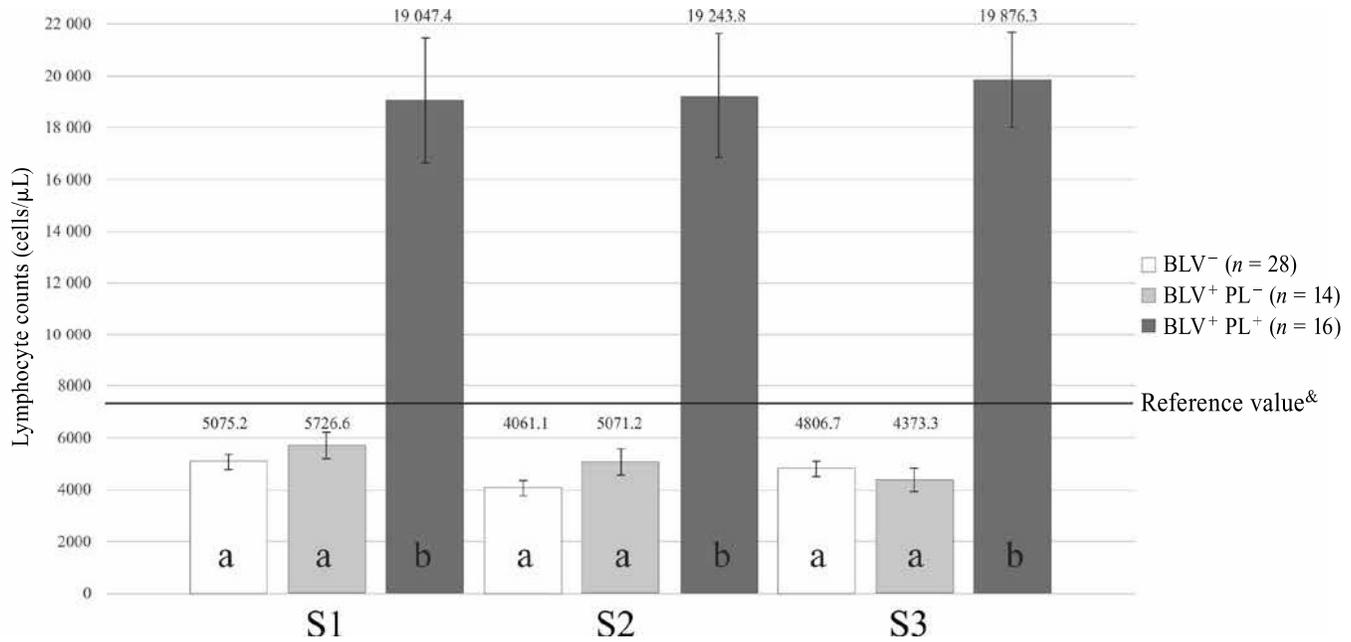


Figure 1. Lymphocyte counts (mean ± standard error) in 3 sampling groups (S1, S2, S3) according to persistent lymphocytosis (PL) occurrence. Groups with same literals are not significantly different ($P < 0.05$). A reference value of 7500 cells/ μ L is used for lymphocyte counts.

products were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Quantitative PCR

The validation for relative quantification was performed following standard criteria (41,42). Quantitative PCR was performed in triplicate using the BLV pol gene, IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, and TGF- β specific primers in 20- μ L reactions containing 50 ng of template, 25 pmol of each primer and SensiFAST SYBR Lo-ROX Master Mix 1 \times (Bioline) in a real-time thermocycler (Stratagene Mx3005P QPCR Systems; Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) as follows: initial denaturation at 95°C for 2 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 5 s, annealing at 60°C for 10 s, and elongation at 72°C for 10 s. To calculate the relative proviral load, each sample and a calibrating sample (BLV-uninfected cow DNA) were normalized with a constitutive gene (hypoxanthine phosphoribosyltransferase), as previously described (43). The upper limit interval value for proviral load was 2.5 [$2^{-\Delta\Delta C_p \log 10}$] in accordance with the criteria used for the antibody titers.

Data analysis

The differences among groups classified according to PL, antibody titers, and proviral load were statistically analyzed by analysis of variance and Tukey's test to relate with lymphocyte counts. To determine the relationship of pairwise parameters, Student's *t*-test for independent samples was used.

Results

Persistent lymphocytosis

In the current work, the BLV prevalence observed in the dairy complex was high (73%) and the occurrence of PL in BLV-infected

animals was 53% (16/30). The lymphocyte counts in the BLV⁺PL⁺ group were significantly higher (approximately 3-fold) than those of the BLV⁺PL⁻ and the BLV⁻ groups. Persistent lymphocytosis status was consistent for all groups during the 3-month study (Figure 1). In addition, the antibody titers and proviral load of the BLV⁺PL⁺ and BLV⁺PL⁻ groups were significantly different in all instances (Figure 2). However, both groups depicted a gradual increase of the BLV proviral load over time, surpassing the upper limit interval point in the BLV⁺PL⁻ group in the last monthly sample (Figure 2 B).

Antibody titers

The HAT group animals had the highest lymphocyte counts throughout the experiment, which was statistically different compared to those of the LAT and the BLV⁻ groups (Figure 3 A). Moreover, gradual increases of proviral load that exceeded the upper limit interval value were observed in the last sampling in both the HAT and LAT groups (Figure 3 B). However, this finding showed no significant difference. Serologically, the uninfected animals remained negative throughout the 3-month experiment.

Proviral load

According to the proviral load, the lymphocyte counts were significantly higher in the HPL group than the LPL and BLV⁻ groups (Figure 4 A). The antibody titers showed no significant difference between groups (Figure 4 B). However, lower antibody titers were discovered in the HPL group compared to the LPL group in the last sampling (S3). In each sampling, no BLV specific amplification by qPCR was observed in the uninfected cows.

Cytokine expression

The cytokine expression in the experimental population was compared by PL, proviral load, and antibody titers. Concerning IFN- γ expression, BLV⁺PL⁺ and HAT showed significantly lower expression

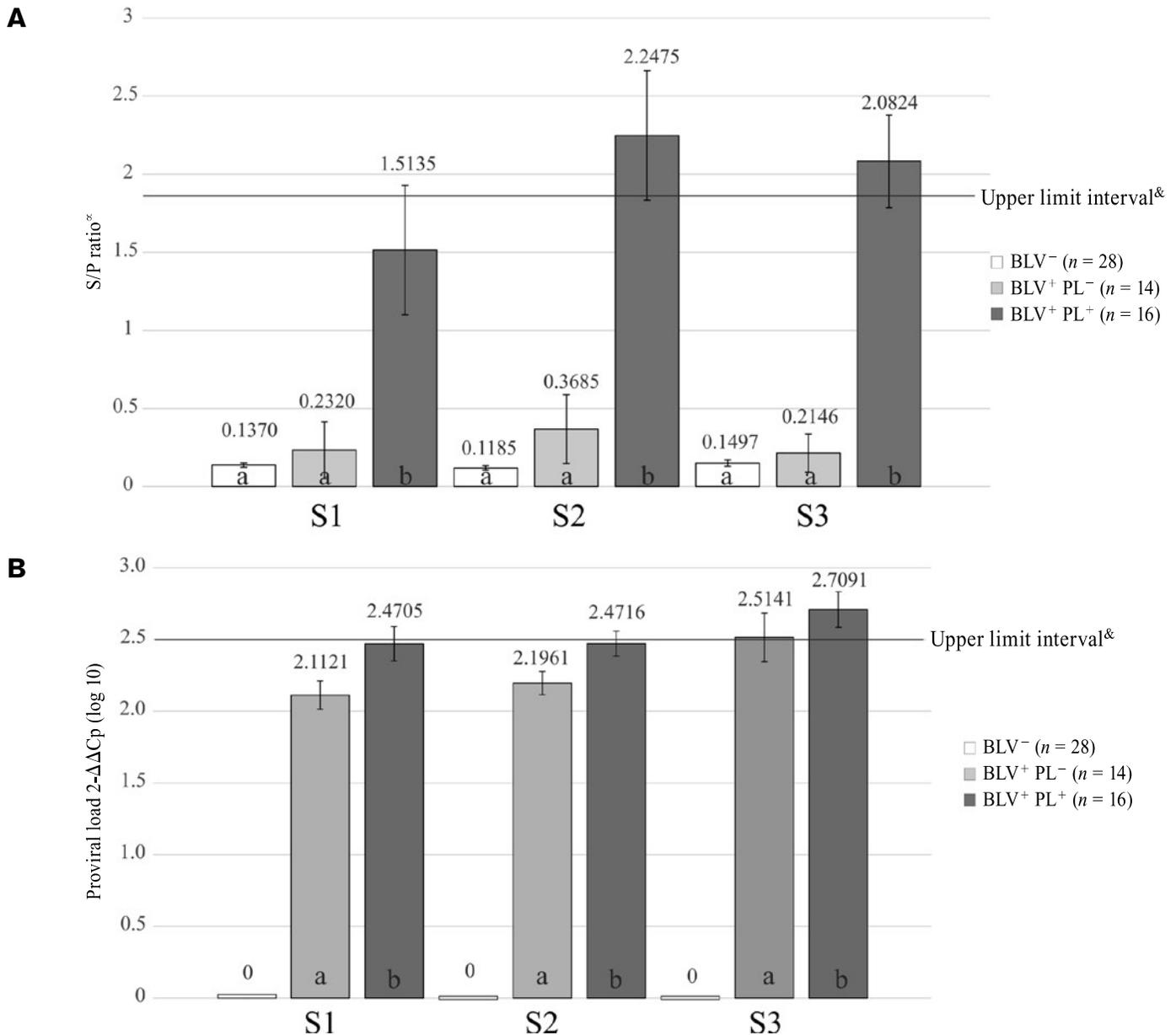


Figure 2. Groups according to persistent lymphocytosis (PL) occurrence. A — Bovine leukemia virus (BLV) antibody titers. B — BLV proviral load. Data are presented as mean \pm standard error. Groups with same literals are not significantly different ($P < 0.05$). The upper limit interval value for BLV proviral load and BLV antibody titers at 1 standard deviation above the mean is $1.992 \times$ sample-to-positive (S/P) ratio and 2.5 [$2-\Delta\Delta C_p$ (log 10)], respectively.

than the BLV⁻ group throughout the experiment (Figures 5 A and B). Although the HPL group depicted lower expression of this cytokine than the BLV⁻ group, this finding was only significant at S1 and S3 (Figure 5 C).

The IL-12 expression (Figure 6) in the BLV⁺PL⁺, HAT, and HPL groups was significantly lower than that of their uninfected counterparts, except in the last sampling, according to antibody titer. Also, the BLV⁺PL⁻ group exhibited significant lower IL-12 expression than the BLV⁻ group in S2 and S3 (Figure 6 A).

Interleukin-2 expression was significantly lower in BLV⁺PL⁻ and BLV⁺PL⁺ than in BLV⁻ in all the samplings (Figure 7 A) and HAT and LAT had significantly lower IL-2 expression than the BLV⁻ group in S1 and S3 (Figure 7 B). However, IL-2 expression was significantly

lower in the LPL group compared to the BLV⁻ group and in the HPL group, IL-2 was only significantly lower in S1, whereas in S2 and S3, this group showed no significant difference with the BLV⁻ group (Figure 7 C).

Likewise, the lowest expression of IL-4 was seen in the BLV⁺PL⁺ and HPL groups, which were statistically significant compared to the BLV⁻ group in S2 and S3 for PL (Figure 8 A) and S2 for proviral load (Figure 8 C). In the groups based on antibody titers, IL-4 expression was only significantly lower for the LAT group in S2 (Figure 8 B).

Interestingly, the expression of IL-10 had significantly higher values for BLV⁺PL⁺ than BLV⁻ in each sampling (Figure 9 A), whereas the HAT and HPL groups were only significantly higher than the other groups in S2 and S3 (Figures 9 B and C). The TGF- β expression

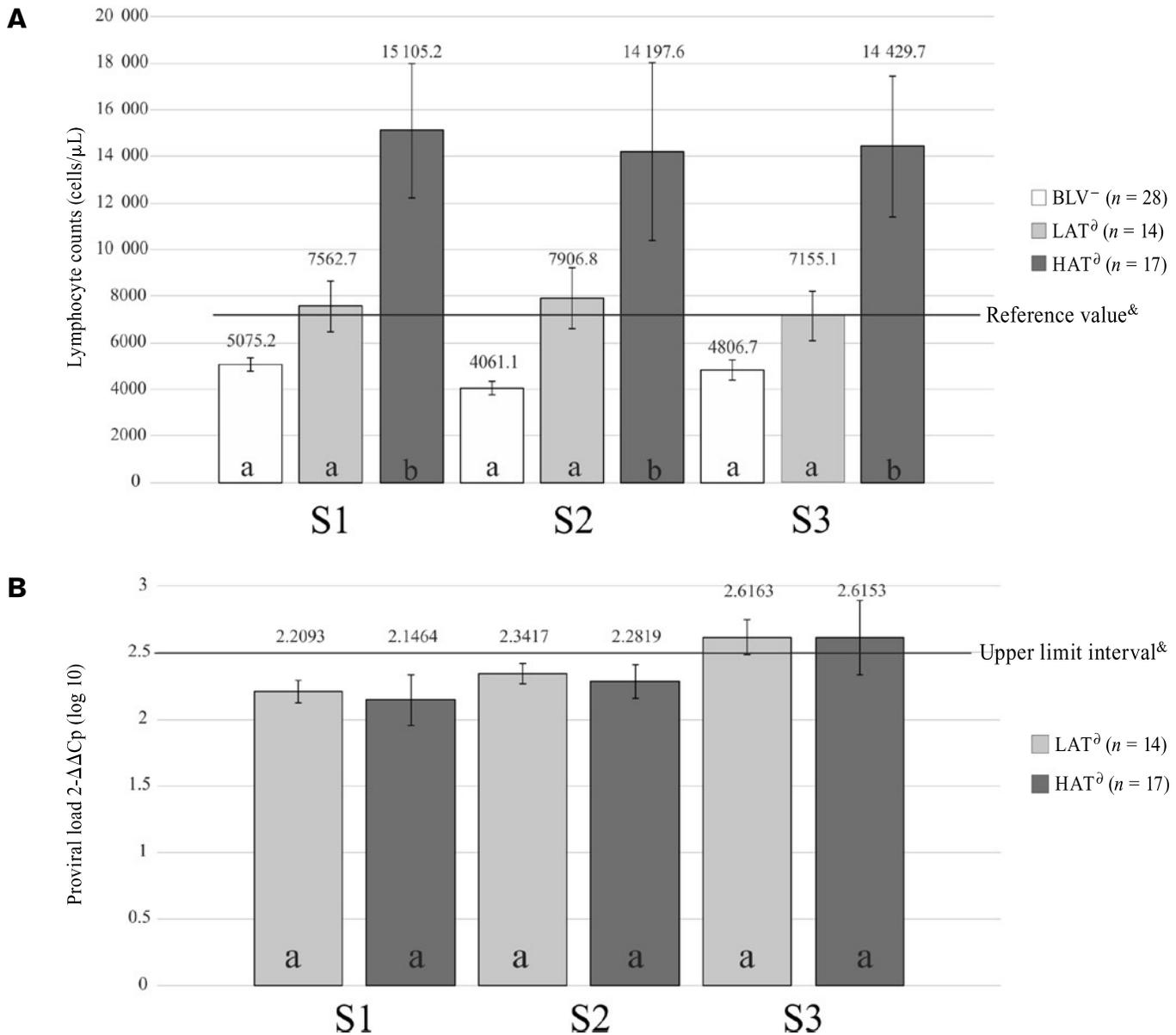


Figure 3. Groups according to bovine leukemia virus (BLV) antibody titers. A — Lymphocyte counts. B — BLV proviral load. Data are presented as mean \pm standard error. Groups with same literals are not significantly different ($P < 0.05$). A reference value of 7500/ μ L is used for lymphocyte counts. The upper limit interval value for BLV proviral load at 1 standard deviation above the mean is 2.5 [2- $\Delta\Delta$ Cp (log 10)].

^Δ Low antibody titers (LAT) and high antibody titers (HAT).

was significantly higher in the BLV⁺PL⁺ and HAT groups than the BLV⁻, BLV⁺PL⁻, and LAT groups in S2 and S3 (Figures 10 A and B). The values of TGF- β according to the proviral load were not significant in most cases but displayed the same trend (Figure 10 C).

Discussion

In BLV infection, PL denotes a polyclonal expansion of target cells (IgM⁺, CD5⁺, CD11b⁺, MHCII⁺, and B-cells), which is the main criteria for disease susceptibility (1,2,14,44,45). In the current study, the proportion of BLV-infected cows with PL was higher (53%) than previously described, which is approximately 1/3 of BLV-infected cows (6,46). Also, the PL values were extremely high compared to

those previously reported, which ranged from 9000 to 17 000 lymphocytes/ μ L (11,13). Both findings are likely related to the high BLV prevalence in the herd as well as genetic traits linked to BoLA alleles (15). In this study, BLV-infected cows with PL had significantly higher proviral load and antibody titers than the BLV⁺PL⁻ group.

Conversely, HAT and HPL were significantly linked to high lymphocyte counts, demonstrating that these 3 parameters no doubt are strongly related, as previously described (1,17,45,47). Moreover, BLV proviral load has been reported to be closely related to lymphocyte counts in peripheral blood, lymph nodes, and spleen samples (45). However, considering the PL status, the proviral load appears to point toward progression since it depicted a gradual increase throughout the experiment. Regardless, the BLV proviral load of

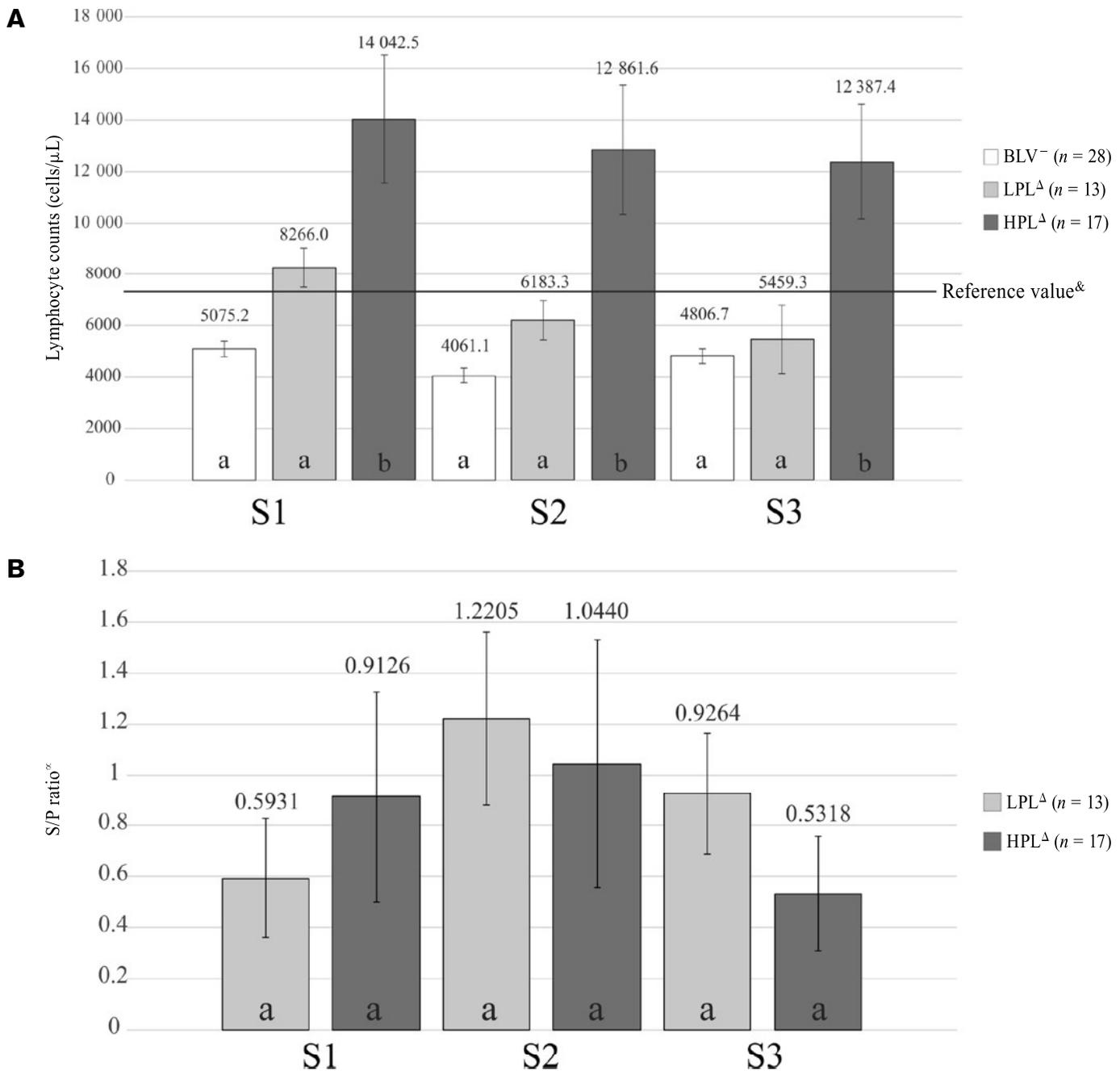


Figure 4. Groups according to bovine leukemia virus (BLV) proviral load. **A** — Lymphocyte counts. **B** — BLV antibody titers. Data are presented as mean \pm standard error. Groups with same literals are not significantly different ($P < 0.05$). A reference value of 7500/ μ L is used for lymphocyte counts. The upper limit interval value for BLV antibody titers at 1 standard deviation above the mean is $1.992 \times$ sample-to-positive ratio.

^Δ Low proviral load (LPL) and high proviral load (HPL).

the PL⁻ group was statistically significant lower than that of the PL⁺ group. Moreover, the lymphocyte counts of the PL⁻ group were steady and remarkably lower than that of the PL⁺ group (Figure 2 A). This scenario suggests that it is unlikely to associate high BLV load with progression to lymphoma, as stated (21), since BLV⁺PL⁻ cows portrayed a sustained proviral load, which surpassed the upper limit interval value in S3 (Figure 2 B) and PL is considered a precedent for lymphoma in most cases (3). Moreover, the BLV⁺PL⁻ group depicted an IFN- γ and IL-4 expression (Figures 5 A and 8 A) compared to the

uninfected group that may be related to immune competence, since those cytokines are the archetype for Th1 and Th2 responses (48). Assessing BLV proviral load in a herd is relevant since most cows are subclinically infected and prone to infect their cohorts. The predictive value of retroviral load is acknowledged in several species. In humans, low and steady levels of plasmatic HIV-2 RNA load have been associated with survival (49) and infectivity has increased considerably in individuals with high HIV-2 proviral load (50). Overall, the high and persistent BLV proviral load observed in the

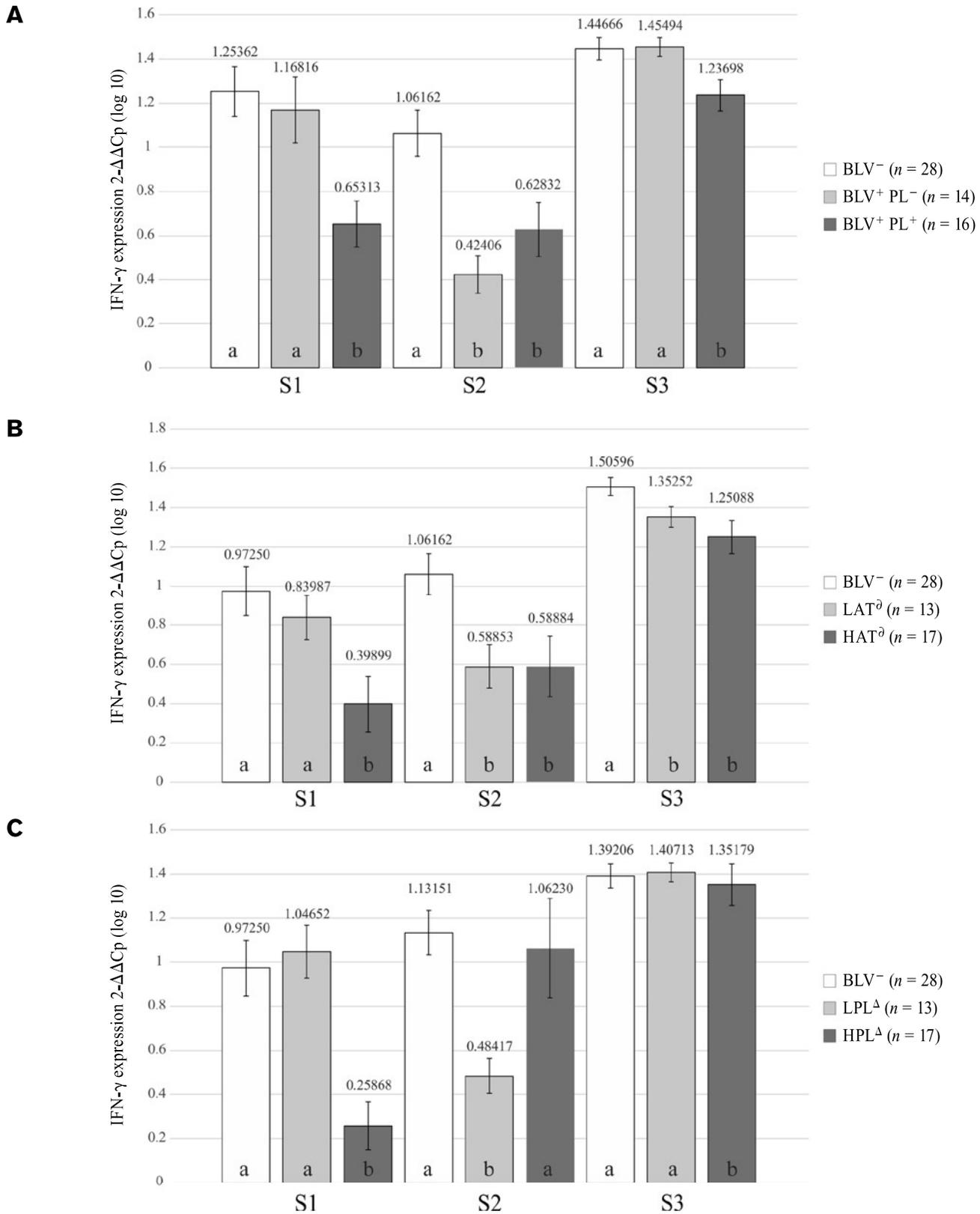


Figure 5. IFN- γ expression. A — Groups according to persistent lymphocytosis (PL). B — Groups according to bovine leukemia virus (BLV) antibody titers. C — Groups according to BLV proviral load. Data are presented as mean \pm standard error. Groups with the same literals are not significantly different ($P < 0.05$).

^Δ Low antibody titers (LAT) and high antibody titers (HAT).
^Δ Low proviral load (LPL) and high proviral load (HPL).

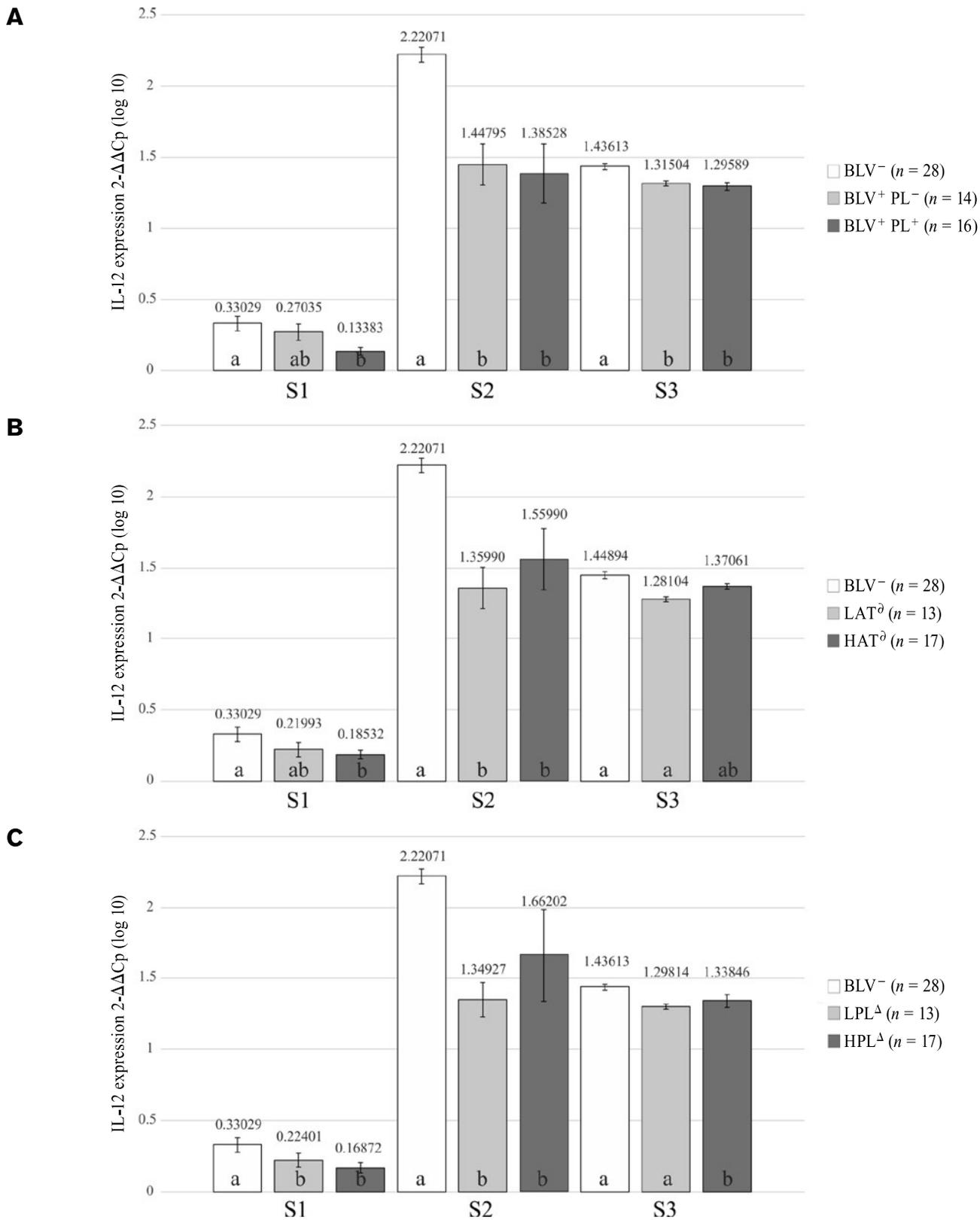


Figure 6. IL-12 expression. A — Groups according to persistent lymphocytosis (PL). B — Groups according to bovine leukemia virus (BLV) antibody titers. C — Groups according to BLV proviral load. Data are presented as mean ± standard error. Groups with the same literals are not significantly different ($P < 0.05$).

^d Low antibody titers (LAT) and high antibody titers (HAT).
^A Low proviral load (LPL) and high proviral load (HPL).

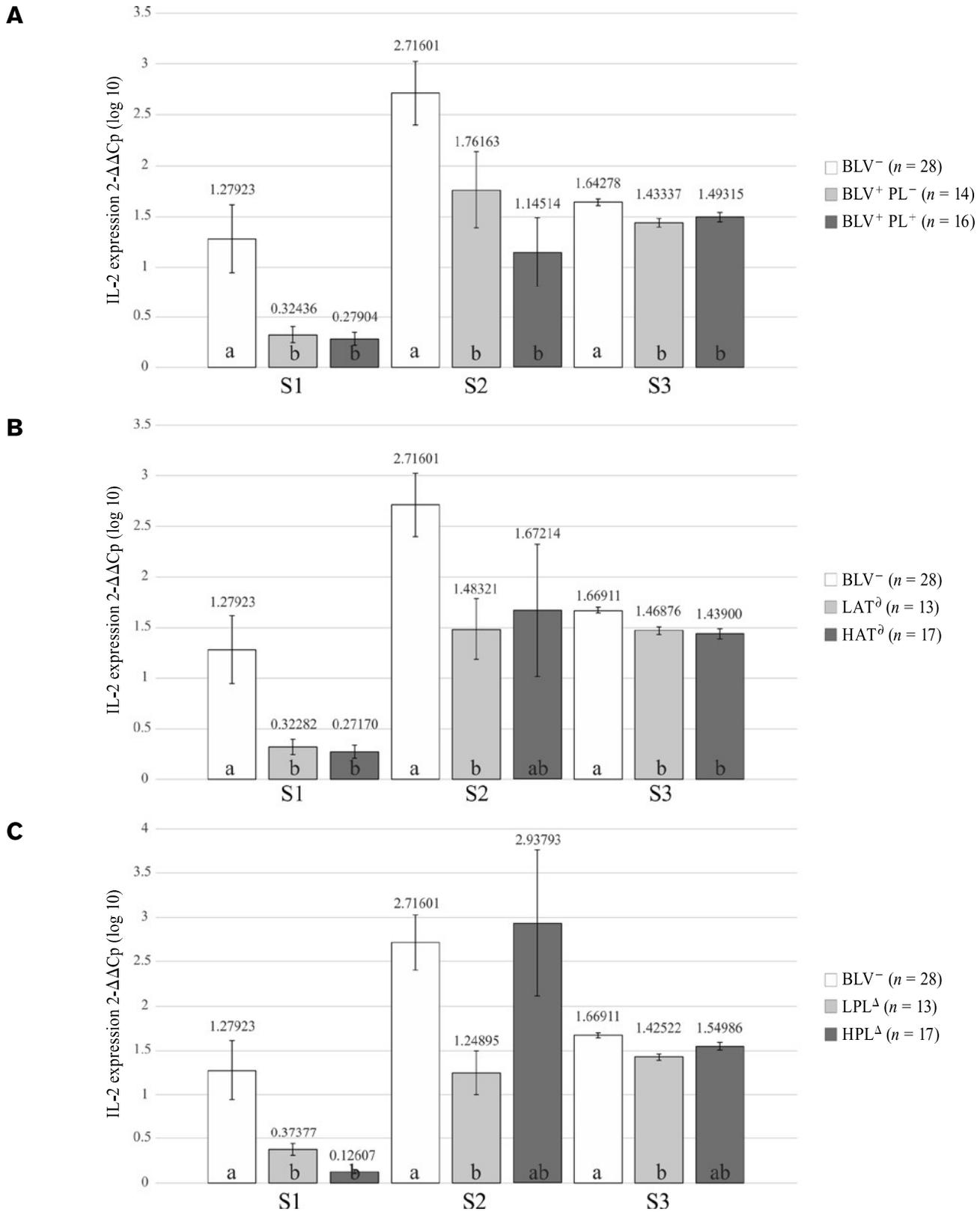


Figure 7. IL-2 expression. A — Groups according to persistent lymphocytosis (PL). B — Groups according to bovine leukemia virus (BLV) antibody titers. C — Groups according to BLV proviral load. Data is presented as mean ± standard error. Groups with same literals are not significantly different ($P < 0.05$).

^Δ Low antibody titers (LAT) and high antibody titers (HAT).

^Δ Low proviral load (LPL) and high proviral load (HPL).

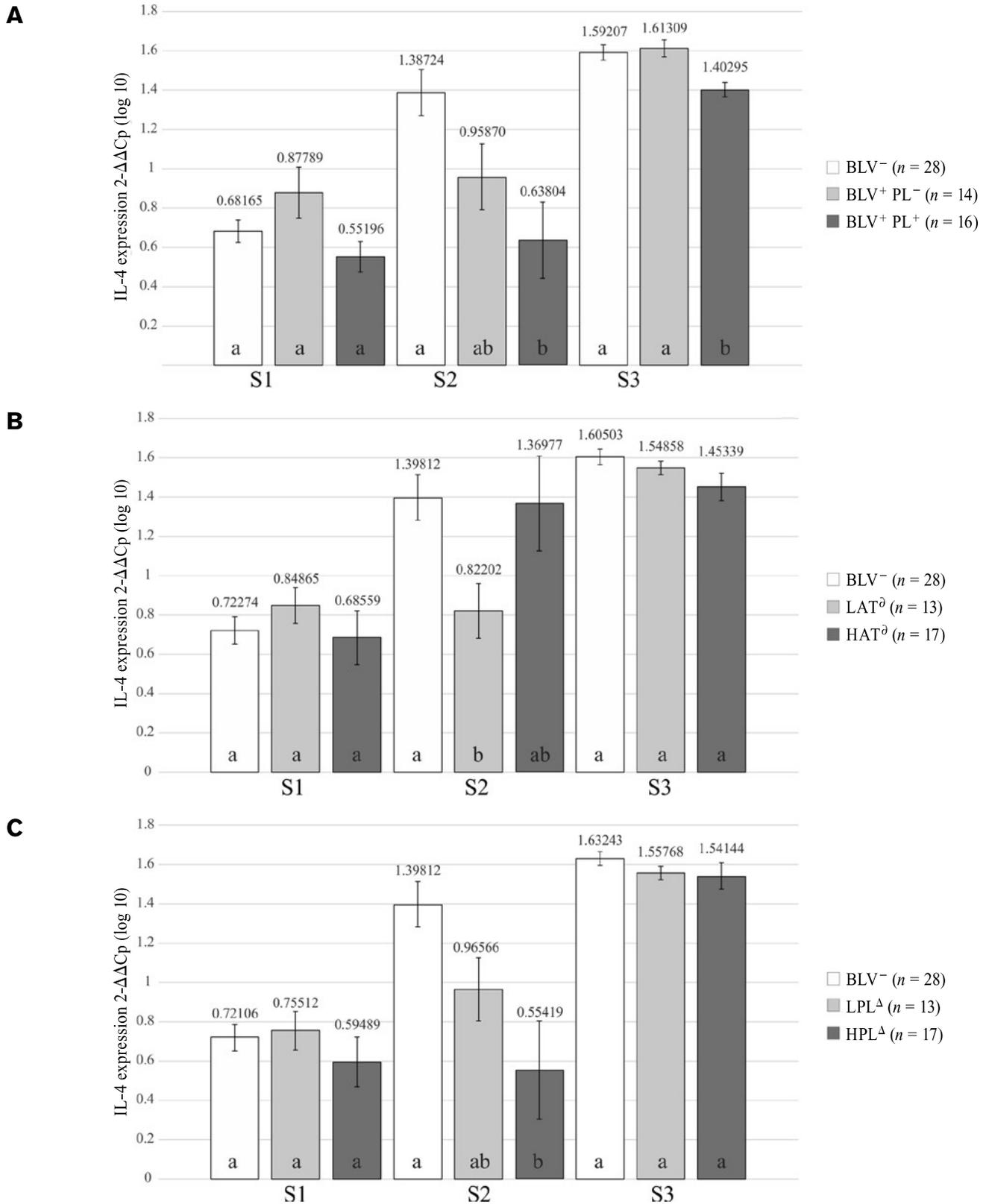


Figure 8. IL-4 expression. A — Groups according to persistent lymphocytosis (PL). B — Groups according to bovine leukemia virus (BLV) antibody titers. C — Groups according to BLV proviral load. Data are presented as mean ± standard error. Groups with same literals are not significantly different ($P < 0.05$).

^Δ Low antibody titers (LAT) and high antibody titers (HAT).

^Δ Low proviral load (LPL) and high proviral load (HPL).

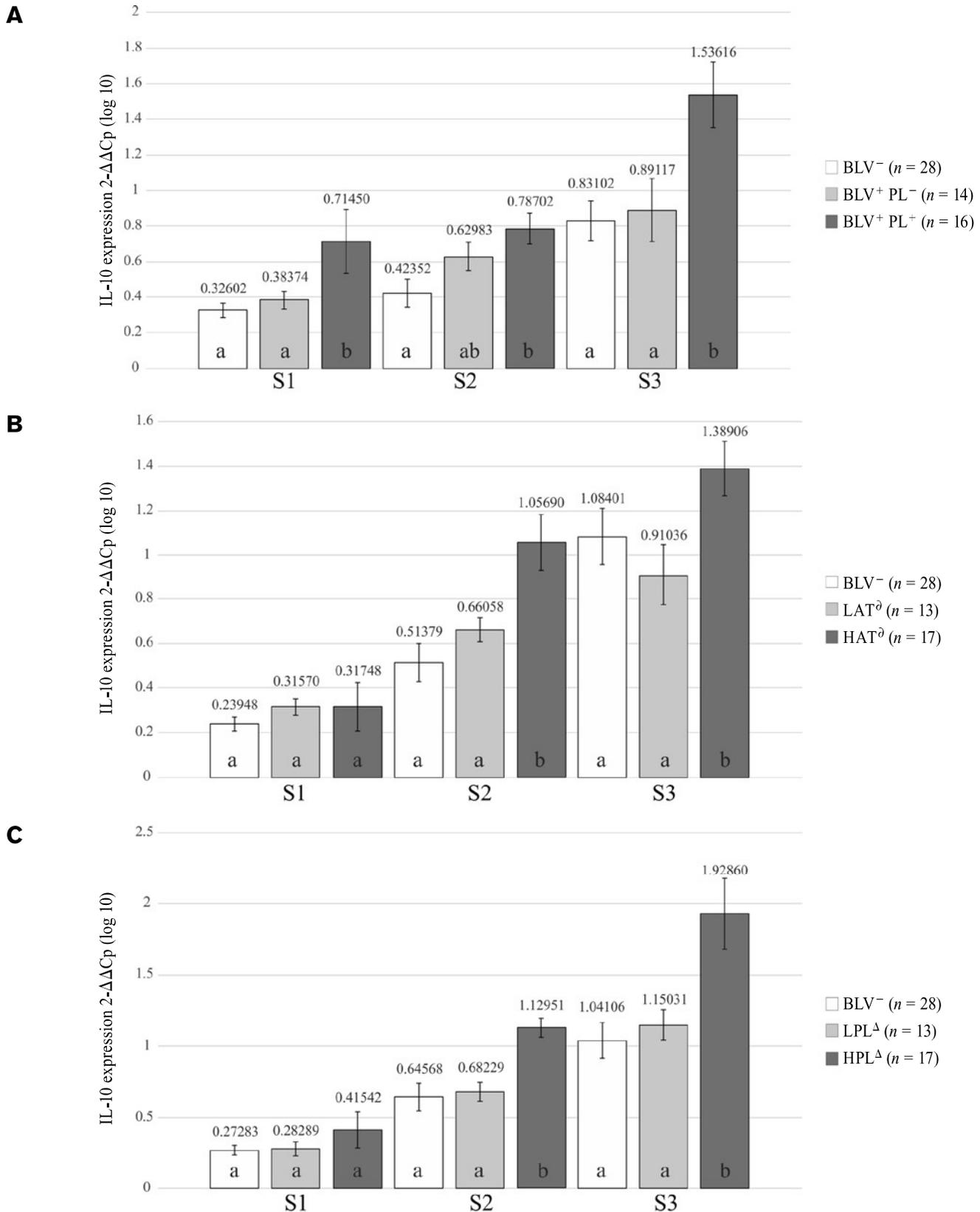


Figure 9. IL-10 expression A — Groups according to persistent lymphocytosis (PL). B — Groups according to bovine leukemia virus (BLV) antibody titers. C — Groups according to BLV proviral load. Data are presented as mean ± standard error. Groups with the same literals are not significantly different ($P < 0.05$).

^Δ Low antibody titers (LAT) and high antibody titers (HAT).

^Δ Low proviral load (LPL) and high proviral load (HPL).

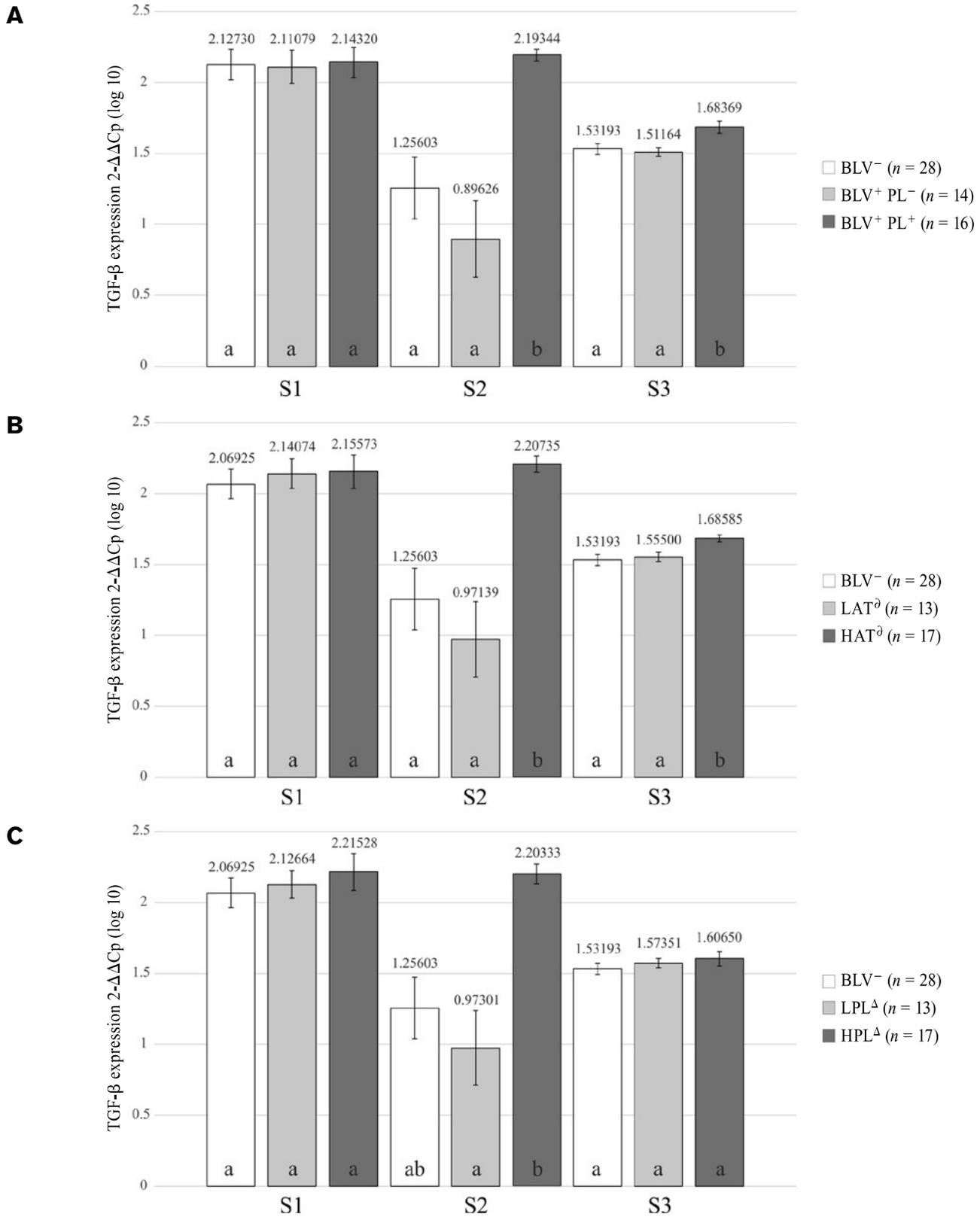


Figure 10. TGF-β expression. A — Groups according to persistent lymphocytosis (PL). B — Groups according to BLV antibody titers. C — Groups according to BLV proviral load. Data are presented as mean ± standard error. Groups with the same literals are not significantly different ($P < 0.05$).

^Δ Low antibody titers (LAT) and high antibody titers (HAT).

^Δ Low proviral load (LPL) and high proviral load (HPL).

experimental cows might have contributed to the rise in BLV prevalence in the dairy complex, which increased from 66% (20) to 73% within a decade, presumably due to an increased infectivity. Because BLV infection promotes substantial economic losses due to immune suppression, implementation of BLV proviral load upper limit interval values might prove to be useful in screening disease progression and infectivity in subclinically infected animals. Moreover, regular BLV proviral load assessment will uncover additional BLV⁺ positive animals, which, thus far, may have been below the limits of detection, particularly in dairy herds where an increment in prevalence is observed, like in the present work.

Given that the BLV⁺PL⁻ and BLV⁻ groups maintained their statuses in the 3-month period despite belonging to a high-prevalence herd, it is quite possible that these animals possessed genetic resistance traits as well as a stronger immune competence that prevented PL occurrence and BLV infection, respectively.

It is well-documented that BLV antibody titers are directly related to lymphocyte counts and proviral load (19,51,52). This agrees with the data depicted in herein, since the lymphocyte counts in the HAT group and the antibody titers in PL⁺ cows were significantly higher than those of their corresponding groups. According to these findings, the antibody response soundly indicates BLV susceptibility rather than protective immunity in PL⁺ animals, which is consistent with other studies (53,54). In addition, it has been reported that a strong humoral response might be related to cytokine imbalance due to a short-lived IL-12 and IFN- γ secretion that turns into a prolonged high expression of IL-10 (23,24,30,54,55). The data presented in this study agree with this, because a similar cytokine profile was seen in the HAT group cows as well as in animals with PL⁺ and HPL, reinforcing that high production of antibodies seems to be unrelated to protection. Interestingly, the HPL group showed lower antibody titers than those of the LPL group in S3. Although this outcome was not statistically significant, it contravenes the paradigm of a direct relationship between humoral response and BLV proviral load, in which the former degree rests on BLV stimulation (6). The lower antibody secretion might be related to immune suppression conceivably effected *via* IL-10, since its expression was consistently high in this particular group throughout the experiment. This suppression might be achieved through IL-10-secreting regulatory B-cells (Bregs) which change the cytokine profile required for plasma cell differentiation (56) and induce the secretion of anti-inflammatory isotypes such as IgG4 (57). Besides, it is reported that systemic IgA induced by IL-10 possesses anti-inflammatory features (58). In cattle, immunoglobulin secretion has also shown polarization according to cytokine stimulation, in which Th1 (IL-12 and IFN- γ) and Th2 (IL-4 and IL-13) cytokines induce secretion of IgG2 and IgG1, respectively. Also, co-stimulation of bovine CD5⁺ B-cells with TGF- β and IL-10 favors secretion of IgA (59). Consequently, it is possible that isotypes with anti-inflammatory potential were secreted *via* IL-10 stimulation in the HPL group, which were not detected by the ELISA since it only detects total IgG, giving a low antibody titer reading. In any case, the results are compatible with an aberrant humoral response.

Overall, the Th1 cytokine profile observed in this work revealed that the BLV⁺PL⁺, HAT, and HPL groups showed significant lower expression of IFN- γ , IL-12, and IL-2) than the BLV⁻ group in most

instances. Moreover, the expression of these cytokines was also lower than that of the BLV⁻ group in the BLV⁺PL⁻, LAT, and LPL groups in S2/S3, S2, and S1/S2, respectively. These findings comply with previous studies that reported lower IFN- γ , IL-12, and IL-2 expression in BLV infected animals, particularly cows with PL (22,23,29,30). Conversely, it has been described that IFN- γ and IL-4 portray similar patterns of expression in both BLV⁺ and BLV⁻ (60), which matches with the data presented herein, because IL-4 was significantly lower in the BLV⁺PL⁺ and HPL groups [S2 and S3 (Figure 8 A) and S2 (Figure 8 C), respectively] than in the BLV⁻ group. Altogether, it is indicative of suppression of the Th1 and Th2 responses, most likely induced by IL-10, since it showed significant high expression throughout the experiment, particularly in animals with PL, HAT, and HPL. This scenario has been reported previously in BLV-infected animals with PL, in which Th1 and Th2 responses markedly declined in front of high and sustained IL-10 expression. Furthermore, high IL-10 expression in BLV-infected cows has been related to lymphosarcoma outcome. Such findings call for an IL-10-mediated immune suppression that leads to disease progression (22,24,30,61).

With regard to TGF- β , high expression has been reported in BLV⁺PL⁺ cows compared to those that are BLV⁻. This demonstrates a strong association with PL since peripheral blood lymphocytes in PL animals portrayed marked TGF- β expression and significant increase in TGF- β -secreting Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T-cells (Tregs) (25,26,59). Furthermore, TGF- β -secreting Tregs were associated with the deregulation of Th1 cytokines and natural killer cell activity (25).

There is clear evidence, therefore, that an increase in TGF- β expression in BLV-infected animals with PL greatly contributes to immune suppression, which is in keeping with the data presented herein, demonstrating that TGF- β expression is significantly higher in infected animals with PL and HAT compared to uninfected cows and BLV⁺PL⁻ and LAT in S2 and S3 (Figures 9 A and C). Because the BLV target cell phenotype (IgM⁺, CD5⁺, and MHC II⁺) is similar to that of Bregs, it is possible that polyclonal expansion of lymphocytes resulting in PL occurrence might increase the population of Bregs, which in turn promotes a significant secretion of IL-10 and TGF- β . As such, Bregs create a vigorous immune suppressive ground. Moreover, it is acknowledged that Breg activity takes place ahead of time to induce Tr1, Th3, and FoxP3⁺ Treg cells, but Bregs leaves the area as soon as Tregs become effective, thus an immune suppressive environment is maintained (62,63).

The results of this study provide further support regarding IL-10's and TGF- β 's potential role in immune suppression in subclinically BLV-infected cows. However, the hypothesis concerning the contribution of Bregs in BLV infection as well as the dynamics in Treg expansion that leads to profound inhibition of Th1 and Th2 responses must be thoroughly validated.

Overall, the occurrence of PL in BLV-infected cattle was the best criteria to assess susceptibility and immune suppression, because it consistently detected significant differences in BLV-infected cows. Furthermore, it seems that high antibody titers in BLV-infected cows were not protective since they were associated with PL, HPL, and a cytokine profile associated with susceptibility and immune suppression, suggesting an aberrant humoral response. In addition,

a significant decrease of IL-12, IFN- γ , IL-2, and IL-4 expression was associated with a significant increase of IL-10 and TGF- β in BLV-infected cows with PL, HAT, and HPL.

These findings are indicative of inhibition of Th1 and Th2 responses compatible with immunosuppression. In accordance with the data presented herein, the immune suppression likely is mediated by an IL-10 and TGF- β regulatory response. The participation of the putative regulatory cells (Bregs and Tregs) must be further validated to establish their relationship with immunosuppression in BLV infection.

Acknowledgments

The authors thank MVZ. Heber Martinez Estrella for his assistance in the sampling of animals. The authors are grateful to CONACYT for the first author's Doctor in Science fellowship, Grant No. 255293. This work was financially supported by the DGAPA-UNAM (PAPIIT IN228416) and FESC-UNAM (PIAPI 2022) grants.

References

- Juliarena MA, Gutierrez SE, Ceriani C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res* 2007;68:1220–1225.
- 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.
- Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA, Kenyon SJ. Persistent lymphocytosis in cattle: Its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann Rech Vet* 1978;9:851–857.
- Cantor GH, Pritchard SM, Dequiedt F, Willems L, Kettmann R, Davis WC. 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* 2001;75:1689–1696.
- Konnai S, Usui T, Ikeda M, *et al.* Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. *Virology* 2005;339:239–248.
- Gillet N, Florins A, Boxus M, *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 2007;4:18.
- Florins A, Boxus M, Vandermeers F, *et al.* Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;125:1–7.
- Lavanya M, Kinet S, Montel-Hagen A, *et al.* 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.
- Heenemann K, Lapp S, Teifke JP, Fichtner D, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW. Development of a bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay. *J Vet Diagn Invest* 2012;24:649–655.
- Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC, Esteban EN. Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci* 2016;99:4586–4589.
- Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol* 1993;151:6977–6985.
- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, *et al.* Bovine leukaemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. In: Johnson RT, Lyon G, eds. *Virus Infections and the Developing Nervous System*. Dordrecht, Netherlands: Springer Dordrecht, 1988:37–56.
- Llames 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.
- Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, *et al.* Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 2011;151:255–263.
- Juliarena MA, Poli M, Sala L, *et al.* Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genet* 2008;39:432–438.
- Jimba M, Takeshima S, Matoba K, Endoh D, Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology* 2010;7:91.
- Ohno 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 Res* 2015;210:283–290.
- Juliarena MA, Poli M, Ceriani C, *et al.* 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.
- Favila DR. 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) [Master's thesis]. Mexico City, Mexico: National Autonomous University of Mexico, 2014.
- Zavaleta JNH. Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB) [Master's thesis]. Mexico City, Mexico: National Autonomous University of Mexico, 2009.
- Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol* 2013;4:328.
- 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.
- Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z. Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;64:207–218.
- Pyeon D, O'Reilly KL, Splitter GA. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic

- animals infected with bovine leukemia virus. *J Virol* 1996; 70:5706–5710.
25. Ohira K, Nakahara A, Konnai S, *et al.* Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF- β secretion from regulatory T cells. *Immun Inflamm Dis* 2016;4:52–63.
 26. Sajiki Y, Konnai S, Goto S, *et al.* The suppression of Th1 response by inducing TGF- β 1 from regulatory T cells in bovine mycoplasmosis. *Front Vet Sci* 2020;7:609443.
 27. Farias MVN, Lendez PA, Marin M, *et al.* Toll-like receptors, IFN- γ and IL-12 expression in bovine leukemia virus-infected animals with low or high proviral load. *Res Vet Sci* 2016;107:190–195.
 28. Keefe RG, Choi Y, Ferrick DA, Stott JL. Bovine cytokine expression during different phases of bovine leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;56:39–51.
 29. Pyeon D, Splitter GA. Regulation of bovine leukemia virus tax and pol mRNA levels by interleukin-2 and -10. *J Virol* 1999;73: 8427–8434.
 30. Jakobson 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 Immunol Microbiol Infect Dis* 2000;23:197–208.
 31. Stoddart MJ, ed. *Mammalian Cell Viability*. 1st ed. vol 740. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2011.
 32. Hutchinson HC, Ruggiero VJ, Norby B, Sporer KRB, Bartlett PC. Diagnostic measures of disease progression in cattle following natural infection with bovine leukemia virus. *Pathogens* 2021;10:987.
 33. Takezawa S, Maezawa M, Tsuzuku S, Kawakami J, Oouci Y, Inokuma H. Abnormal clonalities of B-lymphocytes in bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *J Vet Med Sci* 2021;83:1928–1932.
 34. Akagami M, Oya S, Kashima Y, Seki S, Ouchi Y, Hayama Y. A hematologic key for bovine leukemia virus screening in Japanese black cattle. *J Vet Diagn Invest* 2019;31:568–571.
 35. Batmaz H, Carli KT, Kahraman M, Cetin C, Kennerman E. Serological and haematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey. *Vet Rec* 1995;136:42–44.
 36. Lewin HA, Wu MC, Nolan TJ, Stewart JA. Peripheral B lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *J Dairy Sci* 1988;71:2526–2534.
 37. Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech* 1993;12:435–450.
 38. Yahara Y, Ohkubo Y, Kariwa H, Takashima I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescent antibody (IFA) test for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibody in pigs from conventional farms. *J Vet Med Sci* 2002;64:583–588.
 39. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, *et al.* Primer3 — New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e115.
 40. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95–98.
 41. Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal* 2009;23:145–151.
 42. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
 43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–408.
 44. Abt DA, Marshak RR, Kulp HW, Pollock RJ, Jr. Studies on the relationship between lymphocytosis and bovine leukosis. *Bibl Haematol* 1970:527–536.
 45. Somura Y, Sugiyama E, Fujikawa H, Murakami K. Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch Virol* 2014;159:2693–2697.
 46. Alvarez I, Gutiérrez G, Gammella M, *et al.* Evaluation of total white blood cell count as a marker for proviral load of bovine leukemia virus in dairy cattle from herds with a high seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus. *Am J Vet Res* 2013;74:744–749.
 47. Kobayashi T, Inagaki Y, Ohnuki N, Sato R, Murakami S, Imakawa K. Increasing bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leukosis: A prospective study in Japan. *Prev Vet Med* 2019;178:104680.
 48. Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: A key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today* 1992;13: 379–381.
 49. Berry N, Jaffar S, van der Loeff MS, *et al.* Low level viremia and high CD4% predict normal survival in a cohort of HIV type-2-infected villagers. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1167–1173.
 50. Gueudin M, Damond F, Braun J, *et al.* Differences in proviral DNA load between HIV-1- and HIV-2-infected patients. *AIDS* 2008;22:211–215.
 51. Itohara S, Oikawa I, Terui S, Mizuno Y. Infectivities of bovine leukemia virus in peripheral blood lymphocytes from naturally infected cattle and their relation to persistent lymphocytosis and antibody titers. *Nihon Juigaku Zasshi* 1985;47:807–810.
 52. Gutiérrez G, Carignano H, Alvarez I, *et al.* Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Vet Res* 2012;8:187.
 53. Teutsch MR, Lewin HA. Aberrant expression of immunoglobulin mRNA in bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;53:87–94.
 54. Frie MC, Coussens PM. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2015;163:103–114.
 55. Sordillo LM, Hicks CR, Pighetti GM. Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;207: 268–273.
 56. Rosser EC, Blair PA, Mauri C. Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. *Mol Immunol* 2014;62:296–304.
 57. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, *et al.* IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:1204–1212.

58. Monteiro RC. Immunoglobulin A as an anti-inflammatory agent. *Clin Exp Immunol* 2014;178:108–110.
59. Estes DM, Brown WC. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;90:1–10.
60. Trueblood ES, Brown WC, Palmer GH, Davis WC, Stone DM, McElwain TF. B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *J Virol* 1998;72:3169–3177.
61. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929–979.
62. Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine* 2013;80:18–22.
63. Nouël A, Pochard P, Simon Q, *et al.* B-cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in a CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun* 2015;59:53–60.