



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Estandarización de una técnica de qPCR para la determinar la expresión de TNF- α ,
TGF- β , IL-2 en bovinos lecheros”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARTÍNEZ SALINAS MIGUEL ALDAIR

ASESOR:

DR. ERNESTO MARÍN FLAMAND

COASESOR:

DRA. LUCIA ANGELICA GARCIA CAMACHO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, ABRIL 2024



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



UNAM

CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DE TITULACIÓN

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Estandarización de una técnica de qPCR para determinar la expresión de TNF α , TGF β , IL2 en bovinos lecheros

Que presenta el pasante: **Miguel Aldair Martínez Salinas**
Con número de cuenta: **315283419** para obtener el título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de marzo de 2024.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Marisela Leal Hernández	
VOCAL	M. en C. Ernesto Marín Flamand	
SECRETARIO	M.V.Z. Gustavo Díaz Manríquez	
1er. SUPLENTE	Dra. Itzayana Mejía Flores	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Escobedo Aguirre	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado y financiado por: Proyecto DGAPA-UNAM (PAPIIT IN202023) y la Cátedra de investigación CI2210: Patología Morfológica y Molecular Veterinaria (FESC, UNAM).

Agradecimiento al Técnico Académico MC Francisco Rodolfo González Díaz por el apoyo técnico en el desarrollo experimental de este trabajo.

Agradecimiento al Dr. Alejandro Vargas Ruiz por el aporte de su experiencia y consejos para la elaboración de este trabajo.

Agradecimiento a la Dra. Lucía Angélica García Camacho por su labor, aporte de experiencia y compromiso con este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi mamá, porque sin su inspiración y su enseñanza acerca del valor del esfuerzo y trabajo duro, esto no sería posible.

A mi papá, porque sin sus consejos sobre cómo despejar la mente y mantener fuerte el espíritu, esto no sería posible.

A mi hermana, porque sin la fuerza que muestra todos los días y que me motiva a seguir luchando, esto no sería posible.

A mi hermano, porque sin un hermano menor tan estoico ante las adversidades que me otorgue fuerza, esto no sería posible.

A mis abuelitos, porque sin su amor y buenos deseos, esto no sería posible.

A mi prometida Janette, porque su existencia me hace la vida más fácil y por enseñarme a amar, eres mi inicio y mi para siempre, sin ella, esto nunca habría pasado.

A mi padrino Rogelio, mis primos Roge, Sergio, Nata, Diego y Omar, porque sin la fuerza que muestran para resolver problemas y sus enseñanzas desde hace tantos años, esto no sería posible. A Eimy, Emily y el bebé, espero que algún día este trabajo les sirva de inspiración y jamás se rindan.

A Héctor, porque sin sus enseñanzas sobre el valor de hacer lo que a tu corazón mantenga feliz, esto no sería posible.

A Carlos y Valeria, por que sin mostrarme que los hermanos se pueden encontrar en lugares horribles, esto no sería posible.

Al Dr. Ernesto Marín Flamand, porque sin su paciencia, trabajo, experiencia, entusiasmo, alegría por vivir y gusto por la ciencia, esto no sería posible.

Y finalmente, gracias al equipo médico del Hospital Veterinario Ositos, por ser los primeros y únicos en mostrarme que la ciencia se puede aplicar en la práctica y hacer las cosas mejor para salvar vidas.

RESUMEN.

El virus de la leucemia bovina (BLV) es un Deltaretrovirus de distribución mundial que produce leucosis bovina (LB), promoviendo tres diferentes presentaciones en animales infectados: 1. animales asintomáticos, 2. linfocitosis persistente (LP) y 3. enfermedad linfoproliferativa o linfoma. La infección por BLV genera una respuesta inmune que desencadena la secreción de varias citocinas cuya expresión diferenciada, contribuye a establecer rasgos de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad. Con la finalidad de contribuir al estudio de la respuesta inmune en animales infectados con el BLV, se tomaron muestras de sangre de vacas lecheras provenientes de una explotación con alta prevalencia de LB para la estandarización de protocolos de PCR cuantitativa (qPCR) que determinen la expresión precisa de IL-2, TNF- α y TGF- β . Para ello, se optimizaron la temperatura de alineación y las concentraciones de iniciadores, cloruro de Mg y de templado mediante gradientes de temperatura y curvas de concentración, se obtuvieron los resultados de la estandarización y se implementaron con 15 muestras provenientes de un hato con alta prevalencia de BLV con estatus de positivas y negativas al virus, los resultados indican que a pesar de no mostrar diferencia estadística significativa las vacas negativas obtuvieron una mayor expresión de TNF- α e IL-2 y menor expresión de TGF- β en comparación a las vacas positivas.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	3
Abreviaturas	5
1. Introducción	6
1.1 Leucosis bovina.....	6
1.2 Importancia de la enfermedad, aspectos económicos y epidemiológicos.....	6
1.3 Etiología.....	7
1.4 Patogenia.....	8
1.5 Transmisión.....	9
1.6 Presentaciones de la enfermedad.....	9
1.7 Perfil inmunológico en los animales infectados por BLV	11
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Citocinas.....	12
2.1.1. Factor de necrosis tumoral (TNF).....	13
2.1.2. Factor de crecimiento transformante beta tumoral (TGF-β).....	14
2.1.3. Interleucina 2 (IL-2).....	14
2.2. Técnicas para la detección y cuantificación de citocinas	15
2.2.1 Determinación de la expresión de citocinas por PCR cuantitativa.....	15
2.2.2 Otras técnicas para la detección y cuantificación de citocinas.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos particulares.....	18
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
5.1 Diseño experimental.....	19
5.2 Separación de PBMC y estimulación de células.....	19
5.3 Extracción de ADN y ARN.....	19
5.4 Retrotranscripción.....	19
5.5 PCR punto final.....	20
5.6 Diseño de iniciadores.....	20
5.7 PCR cuantitativa (qPCR).....	21
5.8 Método de cuantificación.....	21
5.9 Estandarización.....	22
5.10 Visualización de reacciones.....	24
5.11 Eficiencia.....	25
5.12 Implementación.....	25
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES	41
9. REFERENCIAS.....	42

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.

μg = Microgramos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leucosis bovina

La leucosis bovina (LB) comenzó a ser estudiada en el año 1953 en Hannover, Alemania, después de la segunda guerra mundial, debido al incremento de casos de tumores en bovinos (Olson & Miller, 1987). Sin embargo, la primera asignación del término de leucosis, se realizó en Lituania, en el área de Klaipeda en 1871, en la descripción de un caso que exhibió esplenomegalia con presencia de nódulos amarillentos en un bovino (Gillet *et al.*, 2007). Posteriormente, la enfermedad se propagó hacia el oeste debido al comercio de ganado bovino europeo en zonas donde aparentemente el virus no existía y se distribuyó mundialmente hasta que llegó a los EE. UU (Kettmann *et al.*, 1994).

En México, las primeras descripciones relacionados con la LB datan de 1967. Desde entonces, se deducía que la enfermedad estaba presente en el territorio mexicano, pero existían pocos estudios sobre la prevalencia de la enfermedad (Monroy *et al.*, 1987) y a la fecha existen múltiples investigaciones que explican los aspectos celulares e inmunológicos de la enfermedad, aunque son limitados los estudios sobre la prevalencia de la enfermedad. La enfermedad se encuentra en la lista de enfermedades que representan un riesgo importante para el comercio internacional de animales y productos de origen animal de la Organización Mundial de Sanidad Animal, (Narayan *et al.*, 2023). A pesar de esto, no se realiza con regularidad el diagnóstico de LB a los bovinos que ingresan de Estados Unidos, lo que ha ocasionado un incremento en los casos (Zavaleta, 2009).

1.2 Importancia de la enfermedad, aspectos económicos y epidemiológicos

La leucosis bovina, es una enfermedad de distribución mundial y a pesar de ser una enfermedad que aparece en la lista de la OMSA, no se ha descrito ampliamente la repercusión en la producción más que la importancia de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, se ha logrado identificar una disminución importante en la producción de leche, entre el 1-2.7% anual en algunas zonas de Michigan (Lendez, 2021).

Respecto a la relación entre el virus de la leucosis bovina y la mastitis, se ha logrado identificar el virus en tejido mamario de las vacas productoras, sin embargo, no se ha logrado

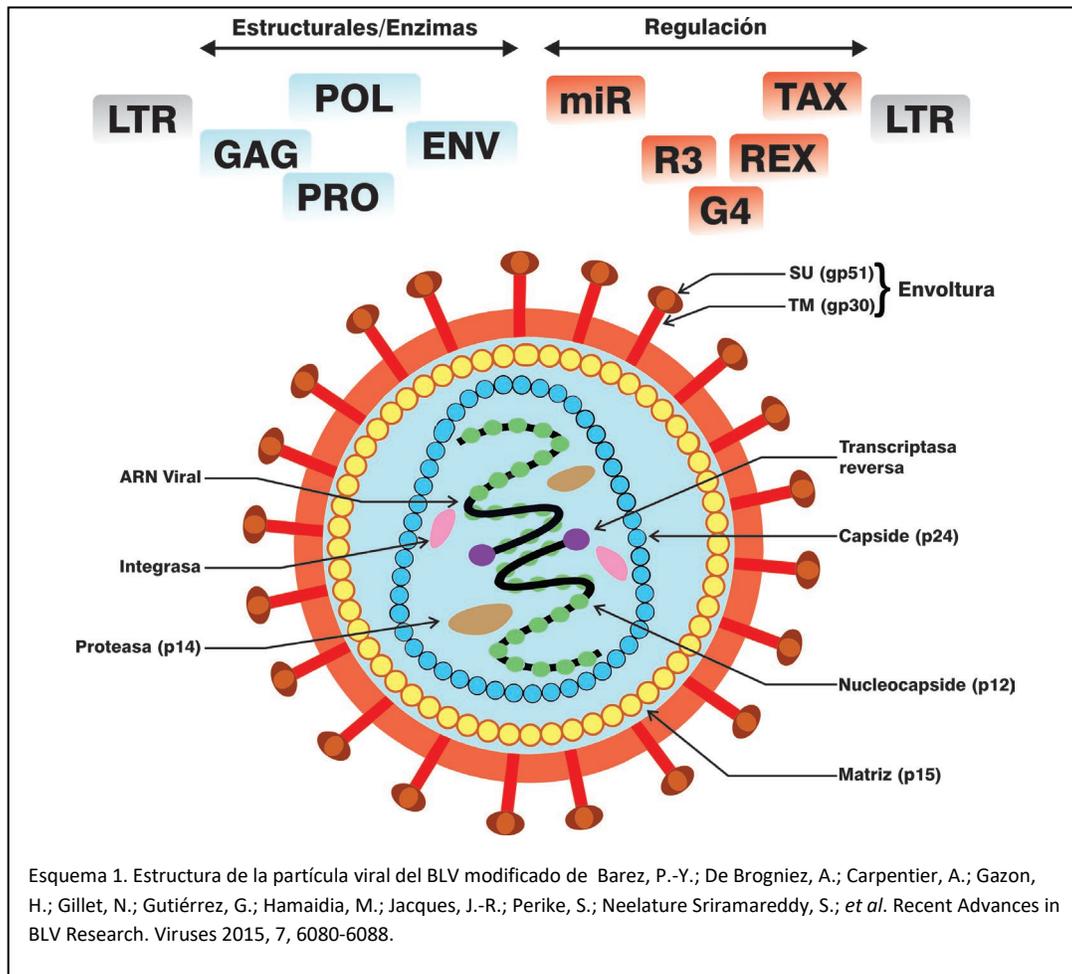
determinar claramente si la mastitis tenga alguna injerencia en la enfermedad, aun así, Yang *et al.* en el 2016, logró identificar una fuerte vinculación entre la infección por el virus de la Leucosis Bovina (BLV) y el aumento en el conteo de las células somáticas en leche. Esto último representa una pérdida económica importante para los productores, ya que existen muchos decomisos del producto lácteo, además de lo obvio que es la presencia de tumores nodulares que, si bien no son tan frecuentes, pueden limitar la venta de la canal o el animal en pie (Gutiérrez *et al.*, 2020).

1.3 Etiología

El agente etiológico es el BLV el cual es un virus ARN oncogénico, que pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, del género *Deltaretrovirus*, conocido por ser un retrovirus tipo C de distribución mundial. El BLV es un virus envuelto icosaédrico con diámetro de 60 A 125 nm que contiene un nucleoide central de 60-90 nm (Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Walker *et al.*, 2022).

El genoma del BLV es monocatenario presentando una secuencia de 8714 nucleótidos, cuyo genoma se organiza de la siguiente manera: (5'LTR)-*gag-pro-pol-env-px*-(3'-LTR) (Esquema 1). Las secuencias terminales repetitivas largas (LTR) que flanquean al genoma están conformados por tres regiones principales: U3, R y U5. El gen *gag* está conformado por una secuencia de 1178 nucleótidos que codifica un polipéptido denominado Pr44 el cual es escindido mediante la acción de la proteasa (p14) codificada en el gen *pro* ubicado entre los genes *gag* y *pol*. La p14 es responsable de la maduración postraduccional del Pr44, dando origen a las principales proteínas no glicosiladas: p12 (Nucleocápside/NC), p24 (Cápside/C) y p15 (Matriz/MA). El gen *pol* es encargado de codificar a la transcriptasa reversa y a la integrasa mismas que participan en la retrotranscripción e integración del material genético del BLV; respectivamente, en el genoma de los animales infectados (Marawan *et al.*, 2021, Aida *et al.*, 2013). Así mismo, el virus posee una envoltura constituida por la bicapa lipídica de la célula hospedera obtenida en la exocitosis en la cual están integradas glicoproteínas (gp) codificadas por el gen *env* que debido a que presentan variaciones y mutaciones en su secuencia producen la glicoproteína principal de superficie (gp51) y la proteína transmembranal (gp30). Dichas glicoproteínas pueden determinar el grado de infección (Zhao & Buehring, 2007). El gen *env* desempeña un papel importante en el aislamiento y

clasificación de diferentes genotipos presentes en una región geográfica (Fechner *et al.*, 1997). Actualmente, se han identificado al menos 11 genotipos diferentes del BLV. Se describe que en Norteamérica el genotipo 4 es el predominante (Marawan *et al.*, 2021). Adicionalmente, el genoma cuenta con una región ubicada entre el gen *env* y el LTR 3' en el cual se codifican los genes Tax, Rex, RIII y GIV, que juegan un papel importante durante el proceso de transcripción (Moratorio, 2012).



1.4 Patogenia

El virus infecta principalmente a los linfocitos B $CD5^+$ IgM^+ y en menor medida puede infectar a otras células tales como los monocitos y los macrófagos, ya que se ha detectado la presencia de ARN mensajero en estas células (de Brun *et al.*, 2019). Dentro de las células infectadas se lleva a cabo una retrotranscripción que conduce a la obtención de ADN bicatenario a partir de la cadena simple de ARN viral, esto se realiza mediante la acción de

la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente, el ADN obtenido ingresa al núcleo de la célula blanco y se integra al genoma del hospedero aleatoriamente, conformando un provirus (Moratorio, 2012; Kettmann *et al.*, 1980). Este mecanismo de integración permite que alrededor de dos semanas post-infección, las células infectadas sean perfectamente detectables en sangre, comenzado un ascenso detectable a la tercera semana que propicia un pico de carga proviral entre las semanas 4 a 8 post infección. Acto seguido, el sistema inmune elimina masivamente las células infectadas y el virus comienza a infectar otros tejidos, observándose un descenso acelerado en la cantidad de células infectadas detectables que permite que la carga proviral disminuya significativamente. Sin embargo, la replicación de las células infectadas permite la propagación del virus, dado que, este mecanismo no requiere de una transcripción reversa. Durante la expansión de linfocitos infectados se replican alrededor de uno a cinco provirus que se encuentran entremezclados en el material genético de los linfocitos. Dicha expansión conduce al desarrollo de la manifestación clínica denominada linfocitosis persistente (LP) que se presenta entre el 20% y 30% de los animales infectados. Se describe que sólo 1% al 5% de los animales con LP desarrollan linfoma de células B (Bulla, *et al.*, 2018, Gillet, *et al.*, 2013, Gutiérrez *et al.*, 2020).

1.5 Transmisión

El virus se transmite mediante linfocitos infectados, aproximadamente se requieren 1500 linfocitos infectados (0.1µl de sangre) para infectar a otro animal (Mammerickx *et al.*, 1988). La enfermedad se puede transmitir de manera horizontal o vertical mediante transferencia de linfocitos infectados de animales portadores hacia animales sanos. Estas células se transmiten principalmente por medio de fluidos tales como sangre, leche, exudados vaginales, etc., sea por contacto directo o por causas iatrogénicas como el descorne, aplicación de medicamento, castraciones, palpaciones rectales, extracciones de sangre, así como, debido a una incorrecta desinfección del instrumental utilizado, causando el contacto directo de sangre entre los animales (Gutiérrez *et al.*, 2020).

1.6 Presentaciones de la enfermedad.

La enfermedad provocada por el BLV promueve tres presentaciones principales. La primera es la presentación asintomática que se observa en la mayoría de los animales infectados (Gutiérrez *et al.*, 2020). Pero en el transcurso de los años, aproximadamente el 30% de los

animales infectados presentan un incremento en la cantidad de Linfocitos T/B circulantes en sangre lo que se le conoce como linfocitosis persistente (LP), que corresponde a un incremento estable de los linfocitos circulantes en sangre periférica (PBMC) (Schwartz & Lévy, 1994). Se considera que la LP representa una proliferación benigna de linfocitos B no transformados (Gutiérrez *et al.*, 2020). La mayor parte de estos linfocitos B son CD5⁺ IgM⁺, MHC-II⁺ CD11b⁺, mismo fenotipo relacionado con la población de linfocitos B reguladores (Guillet *et al.*, 2013). La última manifestación clínica de la LB que sólo se da en el 1-5% de los animales (Gutiérrez *et al.*, 2020) es la enfermedad tumoral, misma que se observa como la emergencia de un linfoma multicéntrico que se presenta entre los primeros 1 a 8 años postinfección (Schwartz & Lévy, 1994), por lo que no es común encontrar animales de menos de un año presentando tumores por este virus. La enfermedad tumoral deriva de una acumulación de linfocitos infectados por el virus en algunos órganos (Favila, 2010). Sin embargo, para que se desarrolle un tumor se requieren factores malignos, tales como la mutación de la proteína p53 de la célula hospedera, aunado a la acción del TNF- α y la fosforilación del antígeno leucocitario bovino (BoLA) clase II (Aida *et al.*, 2013). La signología durante el curso de la enfermedad depende del lugar donde se desarrollen los tumores. Por tanto, es muy variable por lo que requiere establecer un diagnóstico diferencial. Los tumores son clasificados mediante el curso de aparición, la localización anatómica, el patrón de distribución de la población y la relación etiológica con el BLV. Inicialmente, se observa un aumento en el tamaño de los nodos linfáticos superficiales (linfopatía superficial). Posteriormente, se pueden observar crecimiento de tumores en nodos linfáticos prefemorales, supramamarios, preescapulares y maxilares (Kahrs, 2001; Grimoldi *et al.*, 1983).

Los signos clínicos en bovinos con linfoma están relacionados con el órgano afectado. Pueden ser: adenopatías externas, adenopatías internas, paresia del tren posterior, afección respiratoria, exoftalmos bilateral o unilateral y afección cardiovascular por daño en la pared de la aurícula derecha, lo que provoca insuficiencia cardíaca congestiva que puede llegar a ocasionar la muerte del animal. También pueden presentar signos inespecíficos como fiebre, adelgazamiento, disminución del apetito, diarreas persistentes y disminución en la producción de leche (Radostits & Arundel, 2002). Como hallazgos a la necropsia se ha encontrado agrandamiento de nodos linfáticos y tumores que corresponden a la misma acumulación de linfocitos transformados en distintos órganos, entre ellos los riñones, bazo,

útero, corazón e hígado, mientras que los pulmones raramente se ven afectados. (Gillet, *et al.*, 2013).

1.7 Perfil inmunológico en los animales infectados por BLV

La respuesta inmune puede clasificarse con respecto a los distintos patrones de producción de citocinas, éstos, mediados por la subpoblación de linfocitos T CD4+, los linfocitos Th1 producen, principalmente IL-12, INF- γ , IL-2 y TNF- α mientras que los linfocitos Th2 producen entre otras, IL-4, IL-13 e IL-5 (Abbas *et al.*, 2020; Yakobson *et al.*, 2000a), así mismo, la inmunidad mediada por células o inmunidad celular es considerada efectiva en el control de la infección y replicación de los retrovirus (Wang *et al.*, 1995).

La respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral, son importantes para la protección del bovino contra una infección natural por el BLV (Kabeya *et al.*, 2001).

Los bovinos que manifiestan linfocitosis persistente, que se define como una elevación crónica en el número de linfocitos circulantes (Taylor *et al.*, 1992), presentan una inmunidad humoral caracterizada por un incremento en la expresión de IL-10 y una respuesta celular de acción corta caracterizada por expresión de IL-12, Ésto puede sugerir que el desequilibrio entre estas citocinas puede favorecer la progresión de la linfocitosis persistente (Yakobson *et al.*, 2000a). La IL-10 puede inhibir la producción y actividad principalmente de IFN- γ e IL-2 (Franceschi *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que la interacción de la IL-2 con su receptor favorece el control de la magnitud y duración de la respuesta inmune mediada por linfocitos T y aumenta la actividad de las citocinas expresadas por células NK (Yakobson *et al.*, 2000a).

Por otro lado, se ha demostrado que en ovinos infectados con BLV, se expresa TNF- α en animales que comienzan a eliminar células infectadas con el virus, mientras que una expresión negativa se presenta en animales que manifiestan una replicación de las células infectadas (Kabeya *et al.*, 2001). En bovinos infectados que no desarrollan linfocitosis persistente se manifiesta una expresión de IL-12 e IFN- γ y de manera opuesta se observa una disminución en su expresión en animales que presentan LP (Gillet *et al.*, 2007). Los bovinos que manifiestan LP presentan un incremento de IL-10 (Gillet *et al.*, 2013; Yakobson *et al.*, 2000b; Favila *et al.*, 2014).

Tabla 1. Expresión de genes de TNF y su relación con la susceptibilidad al BLV. (Modificada de Kabeya *et al.*, 2001).

Susceptibilidad a BLV	TNF- α	TNF- RI ^(a)	TNF-RII ^(b)
Resistente	Aumento en la expresión ^(c)	Sin cambios en la expresión ^(c)	Sin cambios en la expresión ^(c)
Susceptible	Disminución en la expresión	Disminución en la expresión	Sin cambios en la expresión

a) Receptor tipo I de TNF- α

b) Receptor tipo II de TNF- α

c) Cambios en la expresión de ARNm después de la infección por BLV

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Citocinas.

Las citocinas son un grupo de moléculas polipeptídicas encargadas de la regulación de procesos inmunitarios. Las citocinas actúan dependiendo de la interacción con el receptor específico ubicado en la membrana celular, que desencadenará reacciones biológicas relacionadas con la activación, proliferación o diferenciación de las células involucradas con la respuesta inmune. A menudo, las citocinas se producen en cascada, es decir, una citocina estimula a cualquier célula para que produzca más citocinas, amplificando el tipo de respuesta inmune. Éstas pueden actuar de forma local estimulando a la misma célula (autócrina), en células cercanas (paracrina) y en células lejanas (endocrina) (Oliveira, *et al.*, 2011).

Al final de la década de los ochenta, se describió que las células encargadas de producir algunas de estas citocinas son los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés). De esta manera, se identificaron dos tipos de respuestas con base al perfil de citocinas secretadas. La respuesta Th1 se caracteriza por la secreción de interferón γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) siendo éste el más representativo de la respuesta. Por otro lado, en la respuesta Th2 las citocinas distintivas son IL-4, IL-13 e IL-5 (Botella *et al.*, 2002).

2.1.1. Factor de necrosis tumoral (TNF)

Fue descubierta en el año de 1893 por William Coley, mediante un estudio que demostró que algunos pacientes que desarrollaban cáncer y posteriormente una enfermedad bacteriana desencadenaban un proceso de necrosis tumoral. Fue hasta 1975 cuando se demostró correctamente que algunas endotoxinas bacterianas inducían al sistema inmune a secretar una sustancia que tiene actividad antitumoral (Baldomir *et al.*, 2020).

Esta molécula está formada por dos distintas fracciones, el TNF- α y el TNF- β , ambas fracciones desarrollan funciones similares. El primero de ellos resultó tener una estructura igual a la catequina, sustancia que tiene un papel importante en la coagulación intravascular diseminada y la segunda de ellas tiene una estructura similar a la linfotoxina humana. (Baldomir *et al.*, 2020).

El TNF- α estimula reacciones agudas, es producido por monocitos, fibroblastos y células epiteliales. Existen algunos otros grupos celulares que requieren de una estimulación previa para secretar el TNF tales como linfocitos T, macrófagos y algunas células de músculo liso (Campbell *et al.*, 2003).

Existen receptores R1 (p55) y R2 (p75) para el TNF, el primero presenta un dominio de muerte que regula la apoptosis, mientras que el segundo tipo de receptores carecen de dominios de muerte, aunque pueden inducir la apoptosis mediante la estimulación del receptor R1. Los receptores forman dímeros de superficie en la célula que se unen a la molécula de TNF- α trimérica iniciando así, la transducción de señales (Salazar, 2009).

El TNF- α tiene dos isoformas, una monomérica y otra trimérica. La trimérica puede presentarse como un elemento transmembranal, la cual es separada por la enzima convertidora de TNF- α (TACE) generando de esta manera la forma soluble de la molécula. La forma soluble es capaz de unirse a ambos receptores de TNF- α , mientras que la forma transmembranal se va a unir únicamente al receptor R2 (p75) para comenzar con envío de señales. Las dos formas de presentación se encuentran involucradas en la respuesta inmune, de esta manera, una señalización excesiva por parte de estos receptores podría dar lugar a

inflamación severa, choque cardiogénico o daño celular y tisular (Fragoso, et al., 2014; Salazar, 2009).

2.1.2. Factor de crecimiento transformante beta tumoral (TGF- β)

Es un regulador de las actividades celulares, identificado inicialmente como un producto de células transformadas por el virus de sarcoma murino, estas células pueden generar activación de genes oncogénicos o inactivación de genes antineoplásicos. Es conocido por su función de inducir reversiblemente la transformación e inhibir la proliferación de fibroblastos normales. Existen varias isoformas del TGF- β designadas como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5 (Peralta *et al.*, 2001).

Esta molécula tiene gran cantidad de funciones, entre ellas, está la inhibición en la proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide, endotelial y de varias estirpes de celulares potencialmente neoplásicas, además de estimular la proliferación de fibroblastos normales o células no epiteliales. El TGF- β liberado en bajas concentraciones funciona similar a una citocina proinflamatoria (Th1) que puede ayudar a reclutar linfocitos T, neutrófilos y monocitos al sitio de inflamación, mientras que a concentraciones altas participa en la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular, inhibe la producción de TNF- α e IFN- γ . También es capaz de suprimir la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos y células natural killer (NK), de esta forma su papel resulta muy importante durante la respuesta inmune (Monteon *et al.*, 2008; Peralta *et al.*, 2001).

El TGF- β es una proteína homodimérica sintetizada por diferentes estirpes celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales de piel y vasos sanguíneos, células de placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales (Lyons & Moses, 1990).

2.1.3. Interleucina 2 (IL-2)

La interleucina 2 participa en las respuestas Th1, es producida por linfocitos T estimulando, además, la producción de estos mismos linfocitos. Sus funciones dependen de los receptores a los que se unen. Una vez que se estimula el linfocito, la IL-2 es liberada al torrente

sanguíneo, elevando así la cantidad de IL-2 en sangre (Filella *et al.*, 2002). La IL 2 está involucrada directamente con procesos de proliferación y es un importante inductor de la apoptosis (Barros *et al.*, 2011), ésta tiene la capacidad de actuar en las mismas células que la producen, por lo que se puede considerar un factor de crecimiento autócrino. Aunque su acción también puede darse en linfocitos T en la periferia y de esta manera cumple también con una función parácrina (Barrios, 2013).

2.2. Técnicas para la detección y cuantificación de citocinas

2.2.1 Determinación de la expresión de citocinas por PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN. Este proceso aprovecha la actividad de la enzima que se encarga de sintetizar el ADN (ADN polimerasa) en las células, de este modo es posible la amplificación de ADN. Cuando el material biológico es ARN, ya sea para determinar la expresión génica o la presencia de virus RNA, para su amplificación se requiere de la conversión del ARN a ADN complementario (ADNc) mediante una reacción de transcripción reversa (RT) (Tamay *et al.*, 2013).

Además del templado (ADN genómico o ADNc), la PCR requiere de elementos específicos que permitirán una correcta amplificación tales como, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), iniciadores previamente diseñados y agua libre de nucleasas. El elemento central para la amplificación es la utilización de una polimerasa termoestable dado que el proceso se lleva a cabo en reacciones térmicas secuenciales denominadas ciclos, mismos que se llevan a cabo en tres etapas: desnaturalización, hibridación y amplificación (Díaz, *et al.*, 2008).

-Desnaturalización: El fundamento de esta etapa es el uso de altas temperaturas (95 °C) para lograr la separación de las cadenas de ADN, la temperatura se mantiene durante 20-30 segundos, aunque el tiempo depende completamente de la secuencia del templado, recordando que la unión G=C requiere más energía para romperse comparada con la unión A-T (Tamay *et al.*, 2013).

-Hibridación: Cuando la temperatura disminuye los iniciadores se alinean al templado en los extremos 3', la temperatura de hibridación va a depender igualmente de la concentración de los iniciadores, el número de bases y el porcentaje de G y C. Pero regularmente la temperatura de hibridación oscila entre los 45 °C y 65 °C entre 30 segundos y 1 minuto (Díaz *et al.*, 2008).

-Amplificación o extensión: Ésta etapa consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN a partir del extremo 3' del primer mediante la acción de la enzima ADN polimerasa que utiliza los dNTP's. La temperatura de amplificación es generalmente de 72° al ser la temperatura ideal en la que la Taq polimerasa comúnmente utilizada alcanza su pico de actividad. El tiempo de la etapa depende de la longitud del fragmento a amplificar, la Taq polimerasa añade 500 a 1000 nucleótidos aproximadamente por minuto. (Díaz *et al.*, 2008).

La técnica de PCR cuantitativa (quantitative PCR [qPCR], por sus siglas en inglés) o PCR en tiempo real, se basa en los principios descritos para la PCR convencional (denominada de punto final) pero difiere en el método de detección de los productos amplificados misma que se realiza en el momento de la intercalación de fluoróforos durante la reacción. De este modo, la fluorescencia emitida es proporcional al incremento en las moléculas de ADN, siendo detectada por un termociclador especializado que se encarga de cuantificar e incluso graficar la expresión del ADN blanco. Estas últimas dos características representan grandes ventajas de la qPCR, ya que el producto de amplificación es monitoreado en tiempo real, mientras la reacción se está llevando a cabo, sin que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. Esta técnica es ampliamente utilizada para medir expresión génica (Tamay *et al.*, 2013).

2.2.2 Otras técnicas para la detección y cuantificación de citocinas.

Existen otras técnicas de biología molecular para la detección de citocinas expresadas por bovinos infectados por el BLV. La técnica de RT-PCR competitiva resulta útil para la detección y cuantificación de IFN- γ , IL-2, IL-10 durante la fase inicial de la enfermedad en bovinos infectados (Yakobson *et al.*, 2000).

La utilización de cultivos celulares teñidos con anticuerpos de IL-10 y TGF- β y su posterior cuantificación mediante el uso de citometría de flujo ha funcionado para la evaluación en la

expresión de las citocinas mencionadas en linfocitos T CD4b, CD25high, Foxp3b, WC1b y TCRb (Ohira *et al.*, 2016).

Mediante la utilización de un densitómetro es posible obtener la expresión de ARNm de IL-4 y para mantener las lecturas de densitometría se puede utilizar autorradiografías a diferentes tiempos de exposición (Trueblood *et al.*, 1998). La técnica de RT-PCR semicuantitativa puede ser utilizada para comparar los niveles de expresión de ARNm de Citocinas (IFN- γ , IL-2 e IL-4) en células mononucleares de sangre periférica en bovinos que presentan diferentes manifestaciones de la enfermedad de LB (Amills *et al.*, 2002), asimismo, puede ser utilizada para detectar la presencia de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ en células mononucleares obtenidas de linfonodos de bovinos que presentan diferentes etapas de la infección por BLV (Keefe *et al.*, 1997). El perfil inmunológico presente durante la infección con BLV incluye también la expresión de citocinas por células dendríticas, mismo nivel que puede ser detectado y evaluado mediante una técnica de ELISA, en la que se logran obtener los niveles de IL-6, IL-10, IL-12(p40) e IL-12(p70) (Iwan *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Evaluar y entender la respuesta inmune que se desencadena en bovinos infectados con el virus de la leucosis bovina es muy importante para comprender la patogenia de la enfermedad y, de este modo, conseguir el desarrollo de estrategias que favorezcan el control y prevención. La enfermedad causada por el BLV es de suma importancia en México causando graves problemas y pérdidas a los productores que trabajan con bovinos. Por lo anterior, es necesario contar con una técnica confiable y repetible para medir la expresión de citocinas relacionadas con la enfermedad y la respuesta inmune.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Optimizar las condiciones de amplificación de una técnica de qPCR para la determinación de la expresión de TNF- α , TGF- β y IL-2, en bovinos lecheros.

4.2. Objetivos particulares

- a) Diseñar iniciadores específicos para amplificación de TNF- α , TGF- β y IL-2 en bovinos lecheros.
- b) Determinar la temperatura óptima de hibridación de los iniciadores para la amplificación de TNF- α , TGF- β y IL-2 en bovinos lecheros.
- c) Determinar la concentración óptima de magnesio para la amplificación de TNF- α , TGF- β e IL-2 en bovinos lecheros.
- d) Determinar la concentración óptima de iniciadores para la amplificación de TNF- α , TGF- β e IL-2 en bovinos lecheros.
- e) Determinar la concentración óptima de templado y la concentración mínima de detección de TNF- α , TGF- β y IL-2 en bovinos lecheros.
- f) Determinar la eficiencia de la reacción en qPCR para la determinación de la expresión de TNF- α , TGF- β e IL-2 en bovinos lecheros.
- g) Desarrollar ensayos de implementación en reacciones de qPCR para la determinación de la expresión de TNF- α , TGF- β e IL-2 en bovinos lecheros.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño experimental

Se muestrearon al azar 60 vacas de segundo y tercer parto procedentes de un hato con alta prevalencia de LEB ubicado en el Centro agropecuario e industrial de Tizayuca (CAIT) se determinó el estatus de infección por el BLV. Posteriormente, se seleccionaron 15 vacas BLV⁻ y 15 vacas BLV⁺, para conformar la población experimental

5.2 Separación de PBMC y estimulación de células

Para la obtención de PBMC se utilizó la diferencia de gradientes. Se diluyeron las muestras colocando 500 µl de sangre con 500 µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) en un microtubo de 1.5 ml estéril. Dicha mezcla se colocó en 500 µl de solución con densidad de 1.077 ± 0.001 (HISTOPAQUE 1077, Sigma, Saint Louis Missouri, USA) en un microtubo de 1.5 ml estéril. Los tubos se centrifugaron a 400 xg durante 30 min a temperatura ambiente. La interfase resultante se separó, esta interfase contiene las células mononucleares y se realizaron tres lavados consecutivos con PBS durante 10 minutos a 400 xg. las células fueron destinadas para la extracción de ADN y ARN.

5.3 Extracción de ADN y ARN

A partir de las PBMC obtenidas se realizó la extracción de ADN mediante kits comerciales (One-4-All Genomic DNA Mini-Preps Kit Bio basic, Canadá) y Trizol (tiocianato de guanidina/fenol-cloroformo, USA). Así como la extracción de ARN mediante kits 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.

5.4 Retrotranscripción.

Con el fin de obtener ADN complementario se realizaron reacciones de 20 µl. Se realizó la incubación de 50 µg de ARN con 20 pmol (0.5 µg) de iniciador Oligo (dT) (Promega Corp.,

Madison WI., USA) y 5 µl de agua grado biología molecular c.b.p. La mezcla se incubó a 70°C durante 5 minutos seguido de una incubación a 4°C por 5 minutos en termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). A la mezcla inicial (5 µl), se le adicionó buffer 1x, 1.6 mM de MgCl₂, 0.03 mM de dNTP, 20 U de inhibidor, 1 U de enzima RT (ImProm-II™ Reverse Transcription System, Promega, USA) y 15 µl de agua grado biología molecular c.b.p. Se homogenizó e incubó a 37°C en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) durante 60 minutos. La concentración de ADNc se ajustó en alícuotas de 50 ng y se congelaron a -20°C hasta su utilización en protocolos de qPCR.

5.5 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 2) 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.

5.6 Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores específicos para IL-2, TNF- α y TGF- β a partir de secuencias obtenidas del GenBank, utilizando el programa Primer3, generando iniciadores que amplifican productos de 100-150 pares de bases (Tabla 2).

Tabla 2. Iniciadores diseñados para amplificación en PCR punto final y qPCR.

Iniciador	Secuencia	Producto (pb)	Temperatura de alineación	Posición/ núm. de acceso Gen bank
TNF- α Fw	TGACGGGCTTTACCTCATCT	133	60 °C	580-693/ NM_173966.3
TNF- α Rv	GGCAGACAGGATGTTGACCT			
TGF- β Fw	TGCTTCAGCTCCACAGAAAA	146	60 °C	1193-1338/ NM_001166068
TGF- β Rv	TCCAGGCTCCAGATGTAAGG			
IL-2 Fw	GCCCAAGGTTAACGCTACAG	104	60 °C	245-348 / NM_180997
IL-2 Rv	GGTTCAGGTTTIGCTTGGA			

5.7 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 μ l, 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 continuó 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.

5.8 Método de cuantificación

Se utilizó el método de cuantificación relativa mediante la comparación del punto de CP cruce (cross-point) conocido como CP de la muestra desconocida con una muestra calibradora (muestras provenientes de PBMC de una vaca no infectada) (Pfaffl, 2001; Raymaekers *et al.*, 2009). Todas las cuantificaciones de las muestras desconocidas y de la muestra calibradora fueron normalizadas con un control interno. En este estudio se utilizó el gen constitutivo 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 "calibrador"=Promedio de la Ct del calibrador-HPRT

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

Cuantificación relativa = $\text{Log}_{10} 2^{-\Delta \Delta C_p}$

5.9 Estandarización

Para la estandarización de la temperatura se realizó una mezcla que incluía el 62.5 μl del mix comercial para PCR, 5 μl del iniciador forward y 5 μl del iniciador reverse, 5 μl de templado y finalmente 47.5 μl de agua, para obtener una mezcla de 125 μl , misma que fue dividida en 5 microtubos de 0.2 ml que fueron sometidos al proceso de PCR punto final. Este procedimiento se realizó de la misma manera para el gradiente de IL-2, TNF- α y TGF- β (Tabla 3).

Reactivo	58 °C	59 °C	60 °C	61 °C	62 °C
Mix PCR	12.5 μl				
Iniciador Fw	1 μl				
Iniciador Rv	1 μl				
Muestra (cDNA)	1 μl				
H ₂ O	9.5 μl				
Total	25 μl				

Para la estandarización de la concentración de iniciadores, se realizaron tres mezclas, mismas que contenían cada una 12.5 μl del mix comercial de PCR y 1 μl de templado. Para la mezcla cuya concentración deseada era 12.5 μl mmol, se agregó 0.5 μl de iniciador forward y 0.5 μl de iniciador reverse, posteriormente se añadió agua c.b.p. 25 μl . Para realizar la mezcla cuya concentración deseada era 25 mmol, se añadió 1 μl de cada iniciador y posteriormente se agregó agua c.b.p. 25 μl y finalmente para la mezcla cuya concentración deseada era de 50 mmol, se añadieron 2 μl de cada iniciador y se agregó agua c.b.p. 25 μl . Estas tres mezclas, realizadas en microtubos de 0.2 ml, se sometieron a una reacción de PCR punto final. Este

procedimiento se realizó de la misma manera para el gradiente de IL-2, TNF- α y TGF- β (Tabla 4).

Tabla 4. Gradiente de concentración de iniciadores para la reacción de PCR de IL-2, TNF- α y TGF- β .

Reactivo	12.5 mmol	25 mmol	50 mmol
Mix PCR	12.5 μ l	12.5 μ l	12.5 μ l
Iniciador Fw	0.5 μ l	1 μ l	2 μ l
Iniciador Rv	0.5 μ l	1 μ l	2 μ l
Muestra (cDNA)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	10.5 μ l	9.5 μ l	7.5 μ l
Total	25 μ l	25 μ l	25 μ l

Para la estandarización del gradiente de templado, se realizaron cuatro mezclas en microtubos de 0.2 ml, éstas contenían cada una 12.5 μ l del mix comercial de PCR, 1 μ l del iniciador forward y 1 μ l del iniciador reverse. Para la preparación de la mezcla cuya concentración de templado deseada era 12.5 μ l se agregó 0.25 μ l de templado y agua c.b.p. 20 μ l. La mezcla cuya concentración final debía ser 25 mmol fue adicionada con 0.5 de templado y agua c.b.p. 20 μ l. Para terminar la preparación de la mezcla cuya concentración de templado deseada era de 50 mmol se agregó 1 μ l de templado y agua c.b.p. 20 μ l. Finalmente para la última mezcla cuya concentración de templado deseada era de 75 mmol se añadió 1.5 μ l de templado y agua c.b.p. 20 μ l. Las cuatro mezclas fueron sometidas al procedimiento de PCR punto final. Este procedimiento se realizó de la misma manera para el gradiente de IL-2, TNF- α y TGF- β (Tabla 5).

Para la estandarización del gradiente de magnesio, se realizaron tres mezclas en microtubos de 0.2 ml, estas contenían cada una 12.5 μ l del mix comercial de PCR, 1 μ l del iniciador forward, 1 μ l del iniciador reverse y 1 μ l de templado. Para la preparación de la mezcla cuya concentración de magnesio deseada era 1.5 nmol únicamente se agregó agua c.b.p. 25 μ l. La mezcla cuya concentración final debía ser 2 nmol fue adicionada con 0.5 μ l de magnesio y agua c.b.p. 25 μ l. Para terminar la preparación de la mezcla cuya concentración de templado deseada era de 2.5 nmol se agregó 1 μ l de magnesio y agua c.b.p. 25 μ l. Las tres mezclas

fueron sometidas al procedimiento de PCR punto final. Este procedimiento se realizó de la misma manera para el gradiente de IL-2, TNF- α y TGF- β (Tabla 6).

Tabla 5. Gradiente de concentración de templado para la reacción de PCR de IL-2, TNF- α y TGF- β .

Reactivo	12.5mmol	25 mmol	50 mmol	75 mmol
Mix PCR	12.5 μ l	12.5 μ l	12.5 μ l	12.5 μ l
Iniciador Fw	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Iniciador Rv	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Muestra (cDNA)	0.25 μ l	0.5 μ l	1 μ l	1.5 μ l
H ₂ O	7.75 μ l	7.5 μ l	7 μ l	6.5
Total	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Tabla 6. Gradiente de concentración de magnesio para la reacción de PCR de IL-2, TNF- α y TGF- β .

Reactivo	1.5 nmol	2 nmol	2.5 nmol
Mix PCR	12.5 μ l	12.5 μ l	12.5 μ l
Iniciador Fw	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Iniciador Rv	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Mg	0 μ l	0.5 μ l	1 μ l
Muestra (cDNA)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	9.5 μ l	9 μ l	8.5 μ l
Total	25 μ l	25 μ l	25 μ l

5.10 Visualización de reacciones

Para visualizar los productos obtenidos durante las reacciones de PCR, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con solución buffer de carga (TBE, Promega Corp. Madison, WI, USA) y tinción con 2.5 μ l de bromuro de etidio (Promega Corp. Madison, WI, USA). En cada uno de los pozos para correr en gel, se añadieron 5 μ l de Buffer

de muestra (Glicerol 50% v/v, Na₂ EDTA 2H₂O 100mM, duodecil sulfato de sodio 1% w/v, azul de bromofenol 0.1% w/v) y 10 µl de la muestra previamente obtenida de la reacción de PCR y para la visualización del tamaño de amplificación se utilizó un marcador de peso molecular. Cada electroforesis se realizó con un protocolo de 85 Votls, 500 mA durante 90 minutos, una vez terminada la corrida se observaron en un transiluminador de luz UV (Apollo, Instrumentation, Claremont CA, USA).

5.11 Eficiencia

Para obtener la eficiencia de la reacción se graficaron los CT obtenidos con respecto a la dilución de cDNA correspondiente (en ng), donde se obtuvo una curva de calibración cuya pendiente permitió calcular la eficiencia de la reacción de amplificación mediante la ecuación:

$$E = 10^{-1/m}$$

Donde: E=eficiencia de la amplificación; m= pendiente

Al obtener el resultado de la ecuación podemos determinar si el resultado es mayor o igual a 1 se concluye que la reacción es eficiente (Pfaffl, 2001).

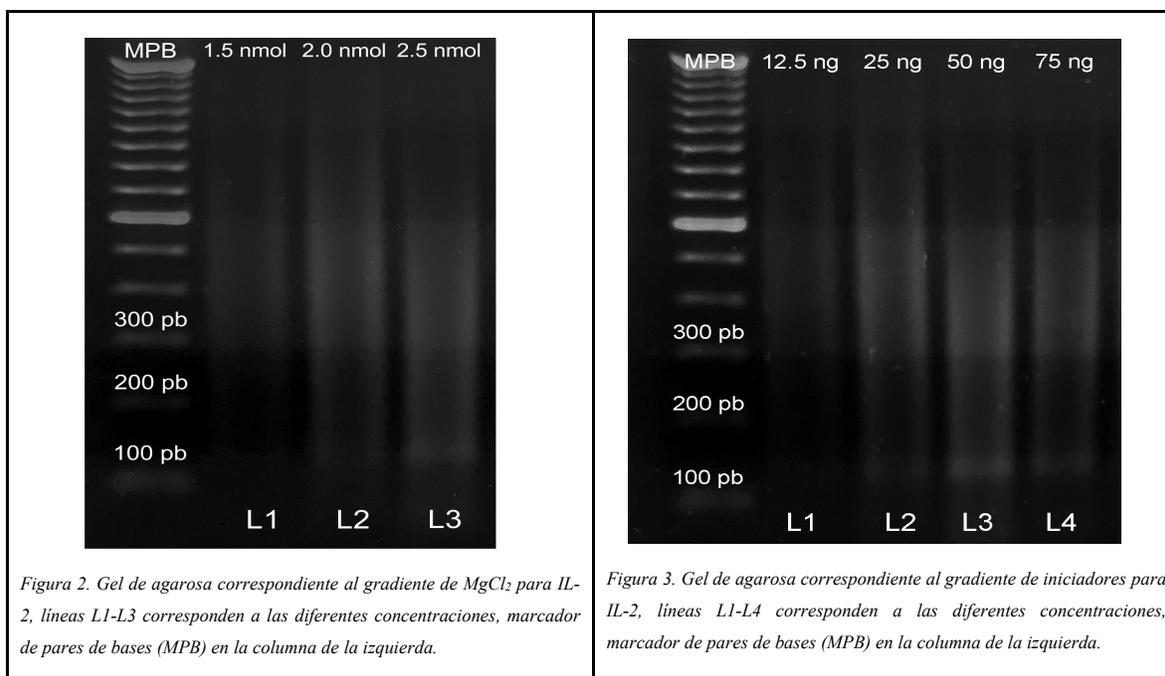
5.12 Implementación

Una vez establecidas las condiciones óptimas de amplificación la qPCR se evaluó en el grupo de muestras para obtener la expresión de las citocinas, se seleccionaron 15 vacas BLV(-) y 15 vacas BLV(+), para conformar la población experimental

6. RESULTADOS

6.1 Estandarización

Se visualizaron los resultados de las reacciones de PCR en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, de las reacciones realizadas para determinar la concentración ideal de magnesio para la reacción de IL-2 se observa que la banda (104 pb) más clara y definida se muestra a una concentración de 2.5 nmol (Figura 2), a menor concentración, las bandas comienzan a difuminarse. En la figura 8 se observa el resultado de la reacción para TNF- α , en éste, se observan bandas (133 pb) bien delimitadas a concentraciones de 1.5 nmol y 2.0 nmol, mientras que a una concentración de 2.5 nmol se observa una banda más clara y definida. El resultado de la misma reacción para el caso de TGF- β , se obtuvo una banda (146 pb) poco definida a una concentración de 1.5 nmol, la banda mejor obtenida se observa a una concentración de 2.5 nmol (Figura 14).



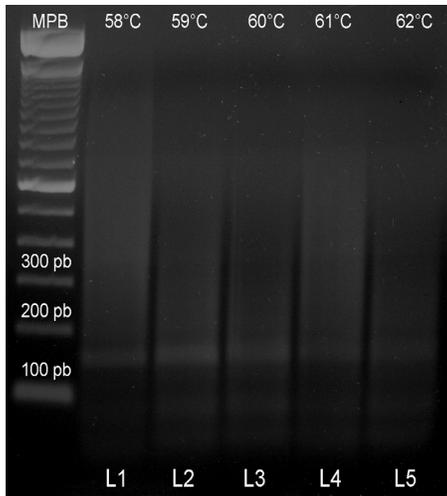


Figura 4. Gel de agarosa correspondiente al gradiente de temperatura para IL-2, líneas L1-L5 corresponden a las diferentes concentraciones, marcador de pares de bases (MPB) en la columna de la izquierda.

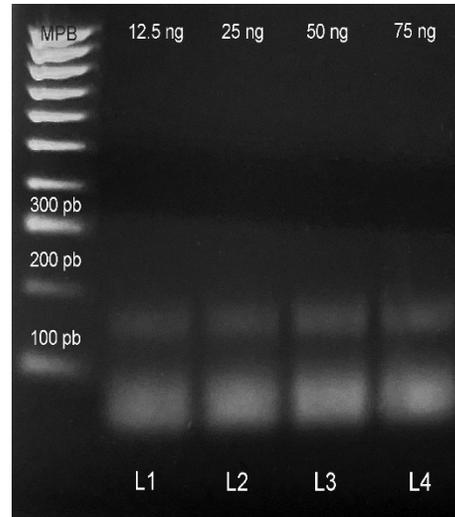


Figura 5. Gel de agarosa correspondiente al gradiente de templado para IL-2, líneas L1-L4 corresponden a las diferentes concentraciones, marcador de pares de bases (MPB) en la columna de la izquierda.

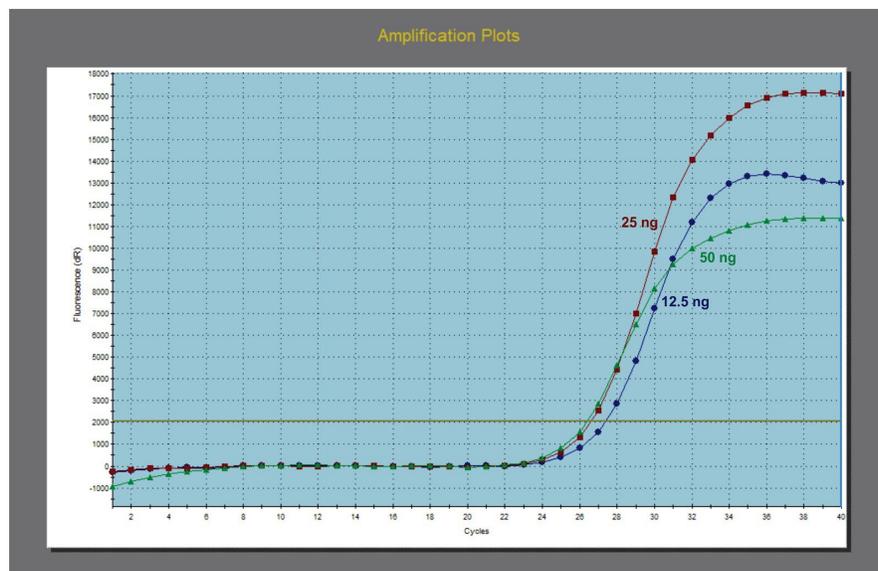
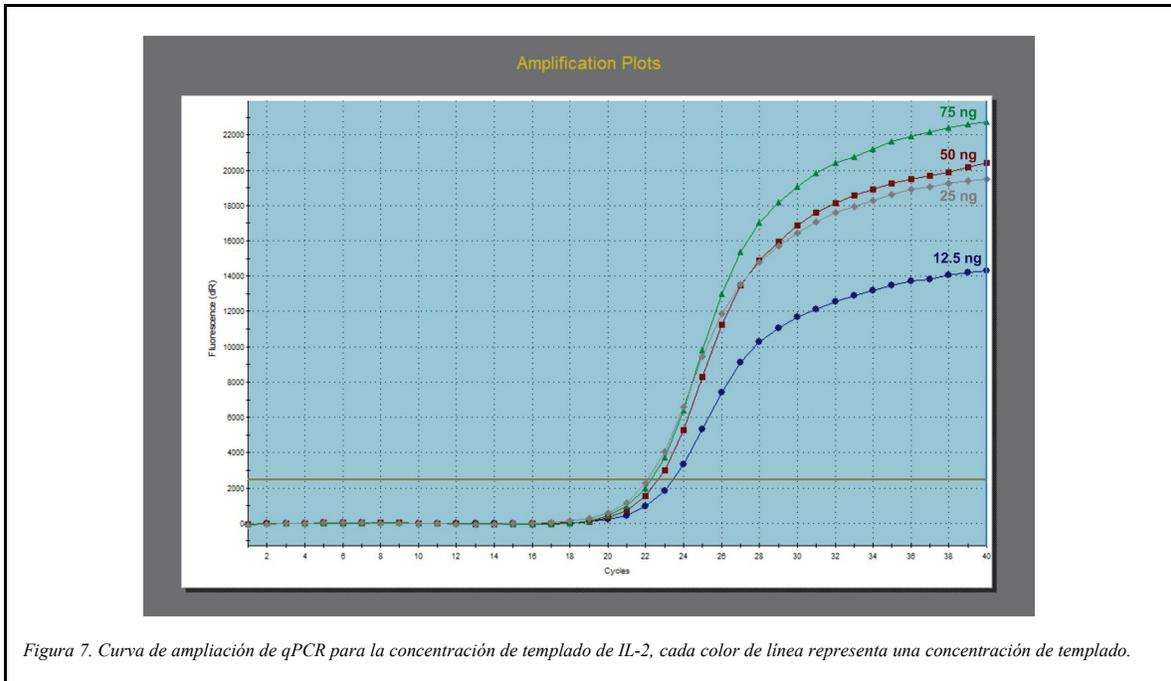


Figura 6. Curva de ampliación de qPCR para la concentración de iniciadores de IL-2, cada color de línea representa una concentración de iniciadores.



Con respecto a los resultados para la determinar de la concentración ideal de iniciadores, se puede observar en la figura 3 del gel realizado IL-2 se observa una banda (104 pb) bien definida y clara a una concentración de 50 ng. En el gel realizado para visualizar la misma reacción en TNF- α (Figura 9), se observa que la banda (133 pb) con mejor definición y más clara se observa una concentración de 50 ng. Por otro lado en la figura 15 se observan los resultados de la reacción para TGF- β se observan bandas claras (146 pb) a concentraciones de 25 ng y 50 ng, y una concentración de 12.5 ng no se distingue claramente la banda, a la concentración más alta de 75 ng se observa una banda más intensa pero poco definida.

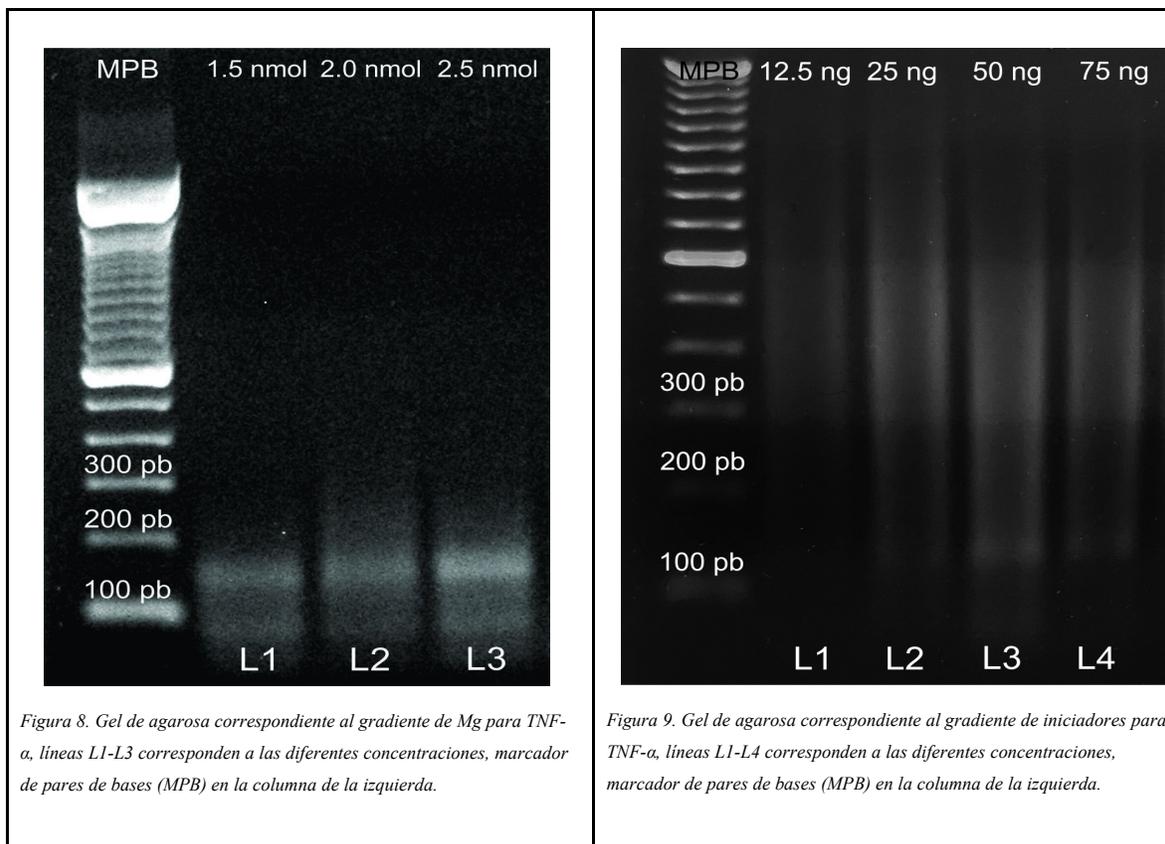
Adicionalmente, los gels realizados para determinar la mínima concentración detectable de templado nos muestran que para el caso de IL-2, es posible observar bandas (104 pb) en todas las concentraciones usadas, sin embargo, a una concentración de 50 ng, se visualiza una banda clara y definida, por lo tanto, esta concentración se escogió como mínima detectable para evitar falsos negativos (Figura 5). Para la reacción de TNF- α , se observa que a la concentración de 12.5 ng no se obtiene ninguna banda y con la concentración de 25 ng, 50 ng y 75 ng, se obtienen bandas (133 pb) perfectamente distinguibles y bien delimitadas, aunque las que se perciben con mayor claridad son las dispuestas en 50 ng y 75 ng por lo que la concentración mínima detectable se fijó en 50 ng (Figura 11), para el caso del TGF- β se pudo observar que la concentración en la cual se observa una banda (146 pb) definida y

clara es a 50 ng, mientras que a 12.5 ng y 25 ng, no son suficientemente claras por lo que como en los casos anteriores la concentración mínima detectable se fijó en 50 ng.

Para los geles de las reacciones para determinar la temperatura óptima, en el caso de IL-2, la temperatura en la que se observan mejor definidas las bandas (104 pb) fue de 59 °C y 60 °C (Figura 4), para el caso de TNF- α (Figura 10), observamos un caso similar donde a 59°C y 60 °C se observan bandas (133 pb) definidas, así mismo sucede con TGF- β (Figura 15), donde las bandas (146 pb) más claras y definidas son a 59 °C y 60 °C.

Para las curvas de amplificación en las reacciones de qPCR observamos que el gráfico (Figura 6) que corresponde a las reacciones para determinar la concentración ideal de iniciadores para IL-2 la línea que corresponde a 50 ng obtiene la CT más baja y una forma sigmoidea característica y deseable en la reacción, así mismo para las reacciones de (Figura 12) línea (marrón) y (Figura 17) línea (verde) a la misma concentración.

Para las curvas de amplificación en las reacciones de qPCR para determinar la concentración mínima detectable se observa que, para IL-2 (Figura 7), TNF- α (Figura 13) y TGF- β (Figura 18), todas las concentraciones probadas fueron detectables por el equipo.



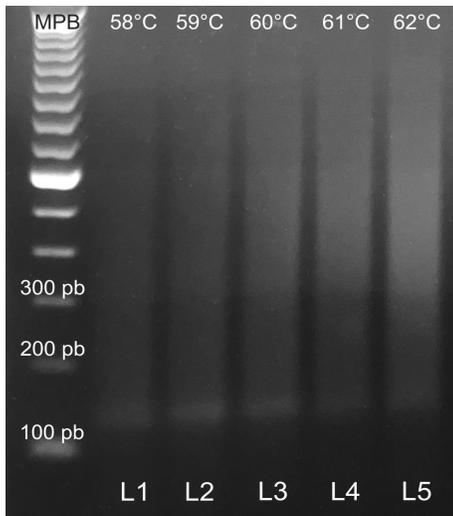


Figura 10. Gel de agarosa correspondiente al gradiente de temperatura para TNF- α , líneas L1-L5 corresponden a las diferentes concentraciones, marcador de pares de bases (MPB) en la columna de la izquierda.

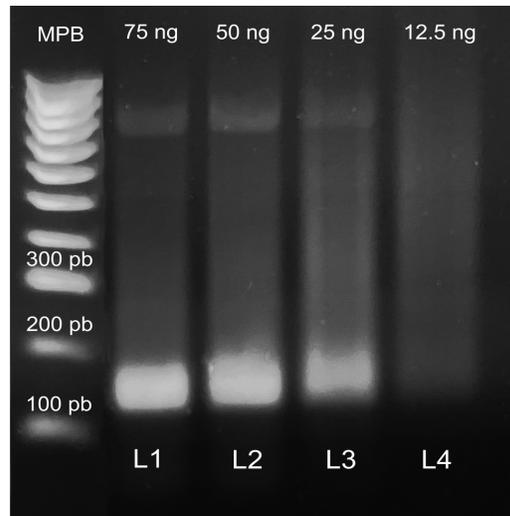


Figura 11. Gel de agarosa correspondiente al gradiente de templado para TNF- α , líneas L1-L5 corresponden a las diferentes concentraciones, marcador de pares de bases (MPB) en la columna de la izquierda.

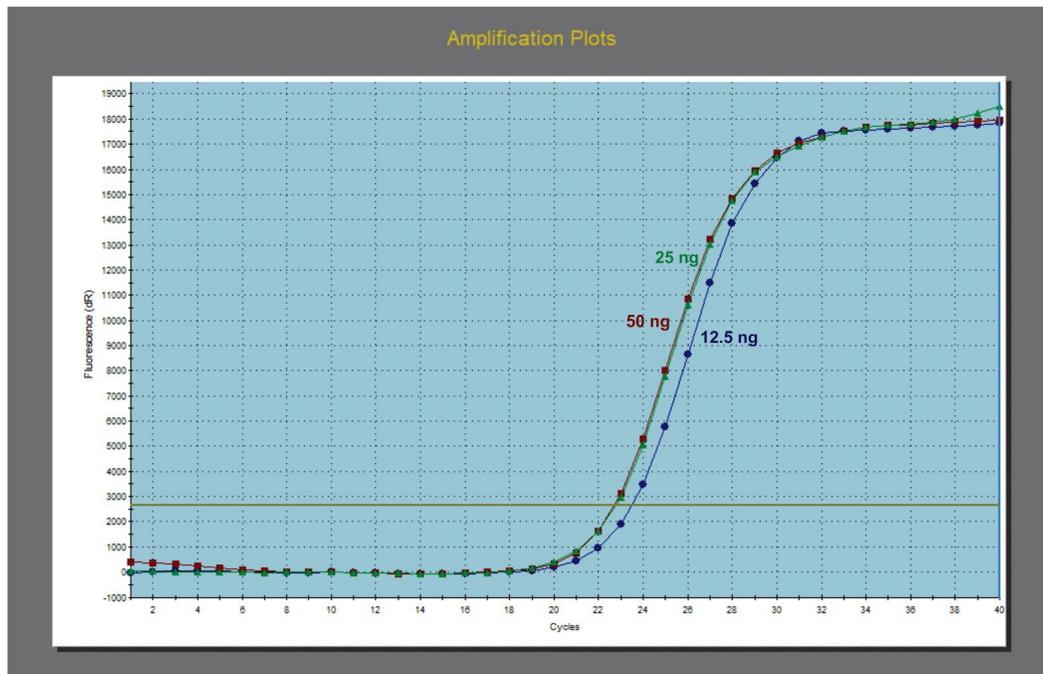


Figura 12. Curva de ampliación de qPCR para la concentración de iniciadores de TNF- α , cada color de línea representa una concentración de iniciadores.

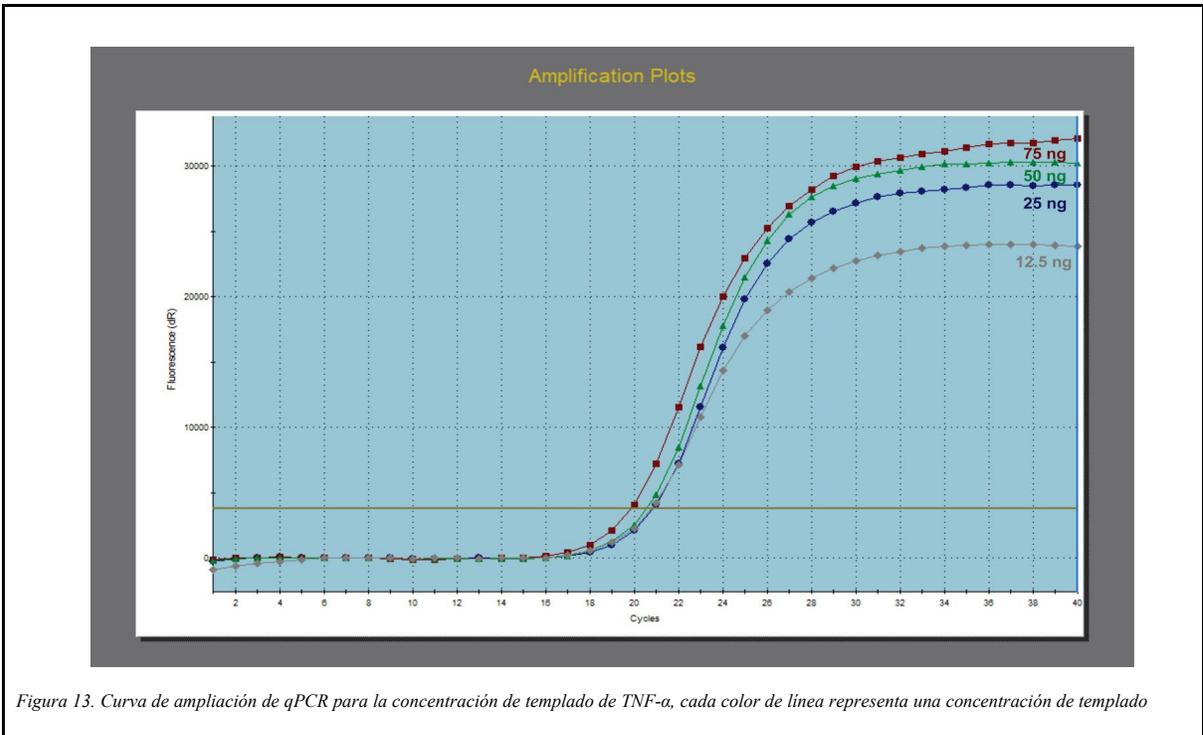


Figura 13. Curva de ampliación de qPCR para la concentración de templado de TNF- α , cada color de línea representa una concentración de templado

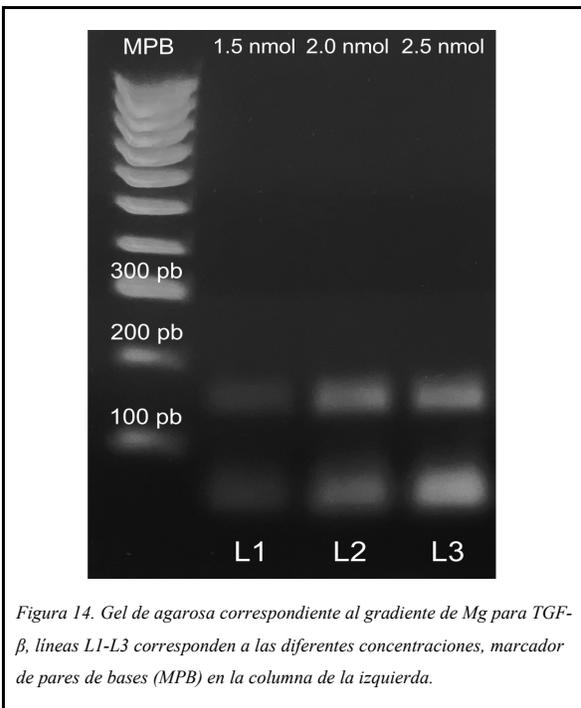


Figura 14. Gel de agarosa correspondiente al gradiente de Mg para TGF- β , líneas L1-L3 corresponden a las diferentes concentraciones, marcador de pares de bases (MPB) en la columna de la izquierda.

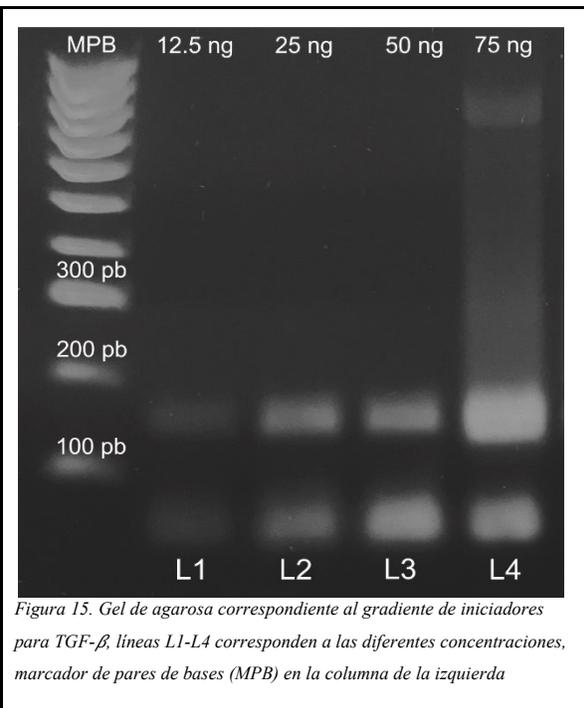


Figura 15. Gel de agarosa correspondiente al gradiente de iniciadores para TGF- β , líneas L1-L4 corresponden a las diferentes concentraciones, marcador de pares de bases (MPB) en la columna de la izquierda

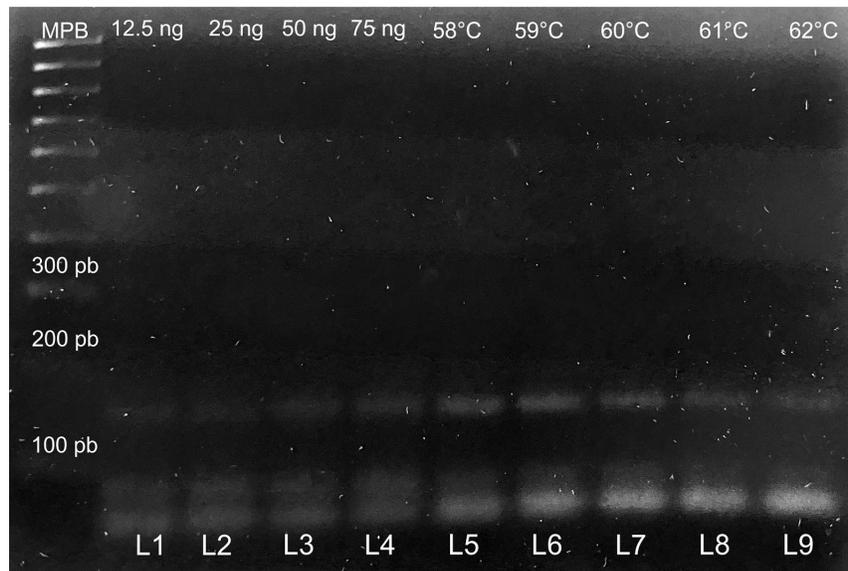


Figura 16. Gel de agarosa correspondiente al gradiente de temperatura y templado para TGF- β , líneas L1-L4 corresponden a las diferentes concentraciones de templado, líneas L5-L9 corresponden a las diferentes temperaturas, marcador de pares de bases (MPB) en la columna de la izquierda.

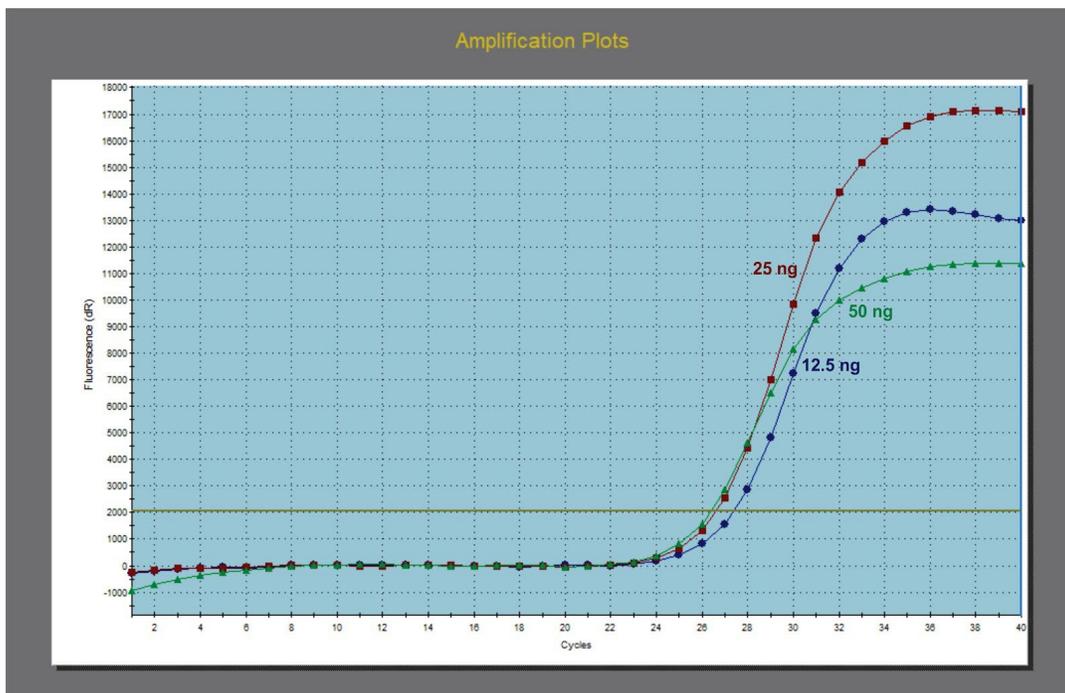
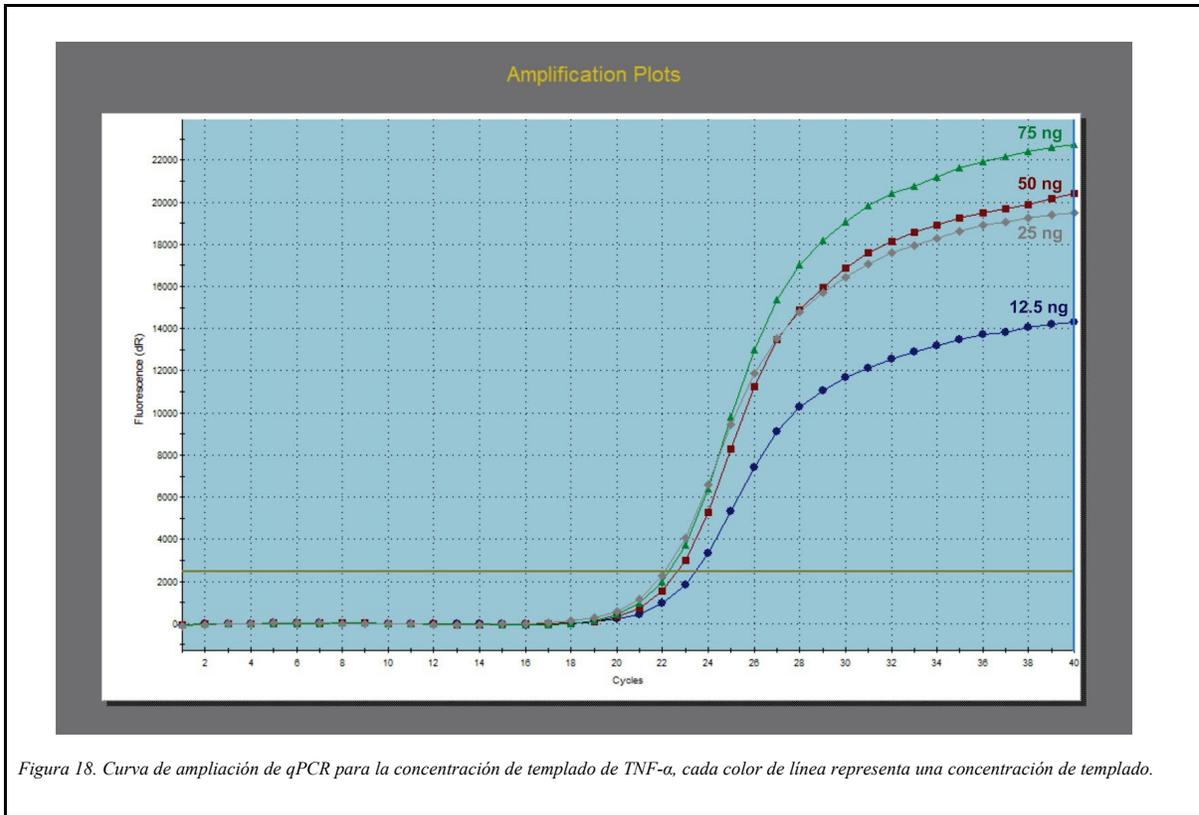


Figura 17. Curva de ampliación de qPCR para la concentración de iniciadores de TGF- β , cada color de línea representa una concentración de iniciadores.



6.2. Curvas de eficiencia

Después de realizar las curvas de templado y proceder a hacer la curva de calibración (Figura 19, 20 y 21), para obtener la pendiente (m) se realizaron los cálculos para determinar la eficiencia de cada citocina, los resultados de estos cálculos se muestran en la tabla 6 donde observamos que todas las eficiencias de las citocinas son mayores a 1 (>1) lo que muestra una relación positiva, indicando que las reacciones son eficientes.

Citocina	Eficiencia
TNF- α	1.098909187
IL-2	1.030889687
TGF- β	1.056044284

Tabla 6. Eficiencia de la reacción de qPCR de cada citocina.

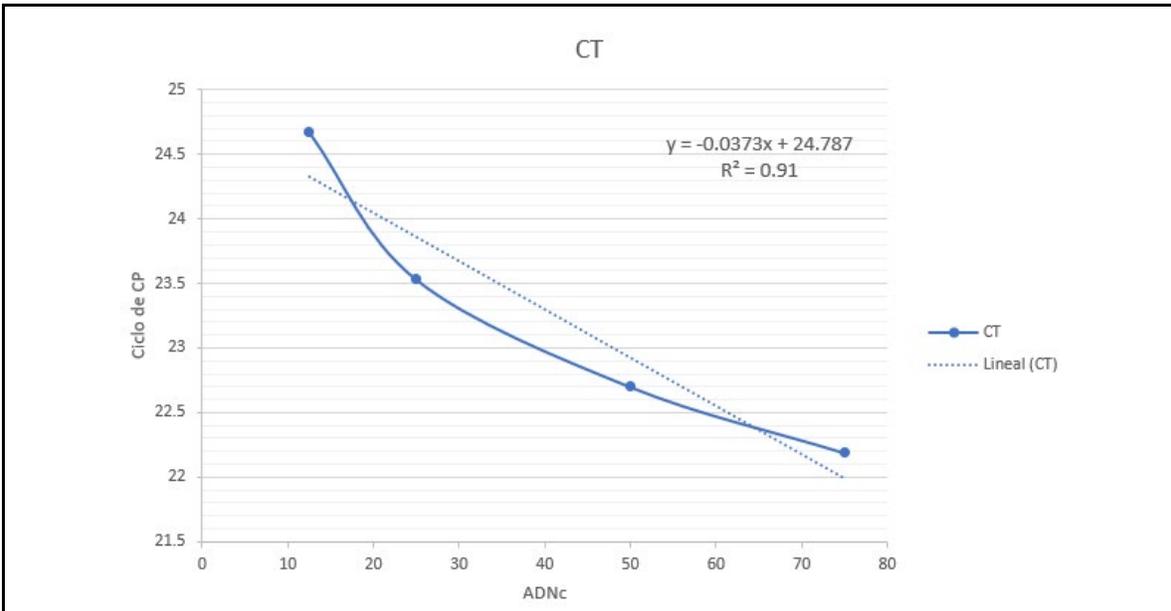


Figura 19. Curva de eficiencia para TNF- α .

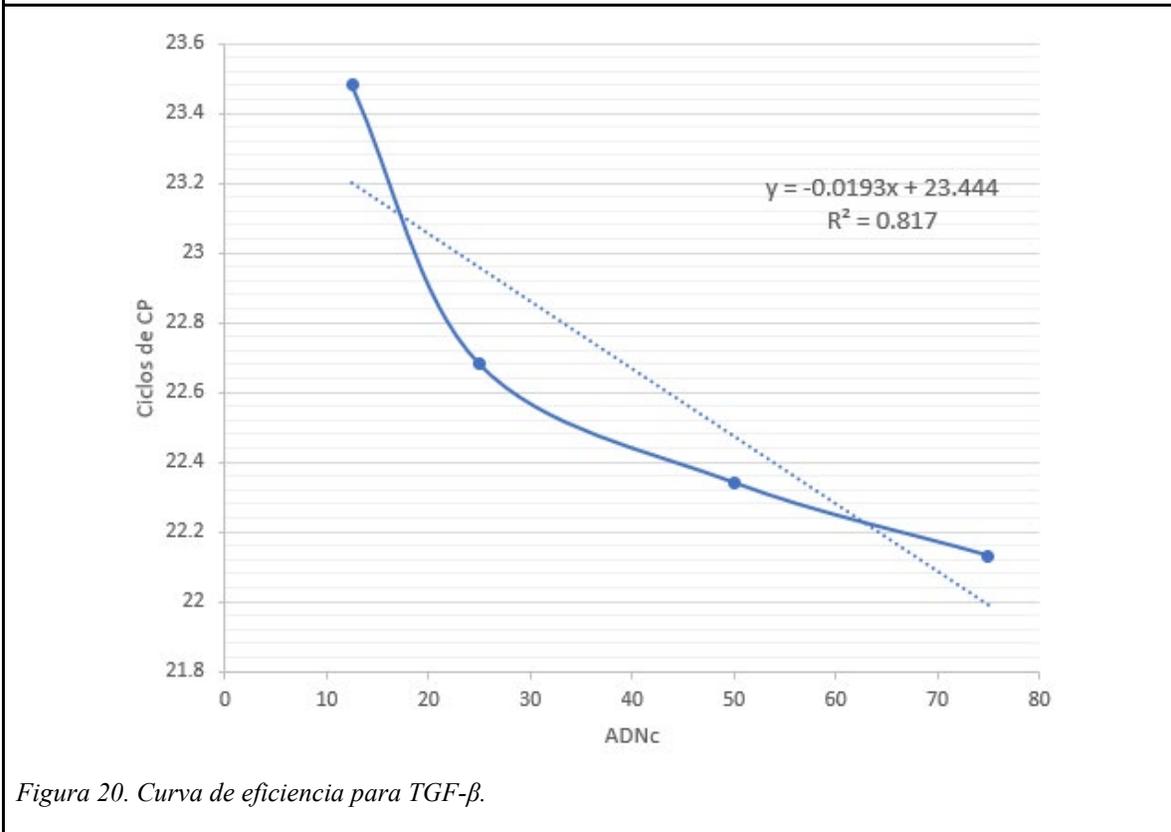
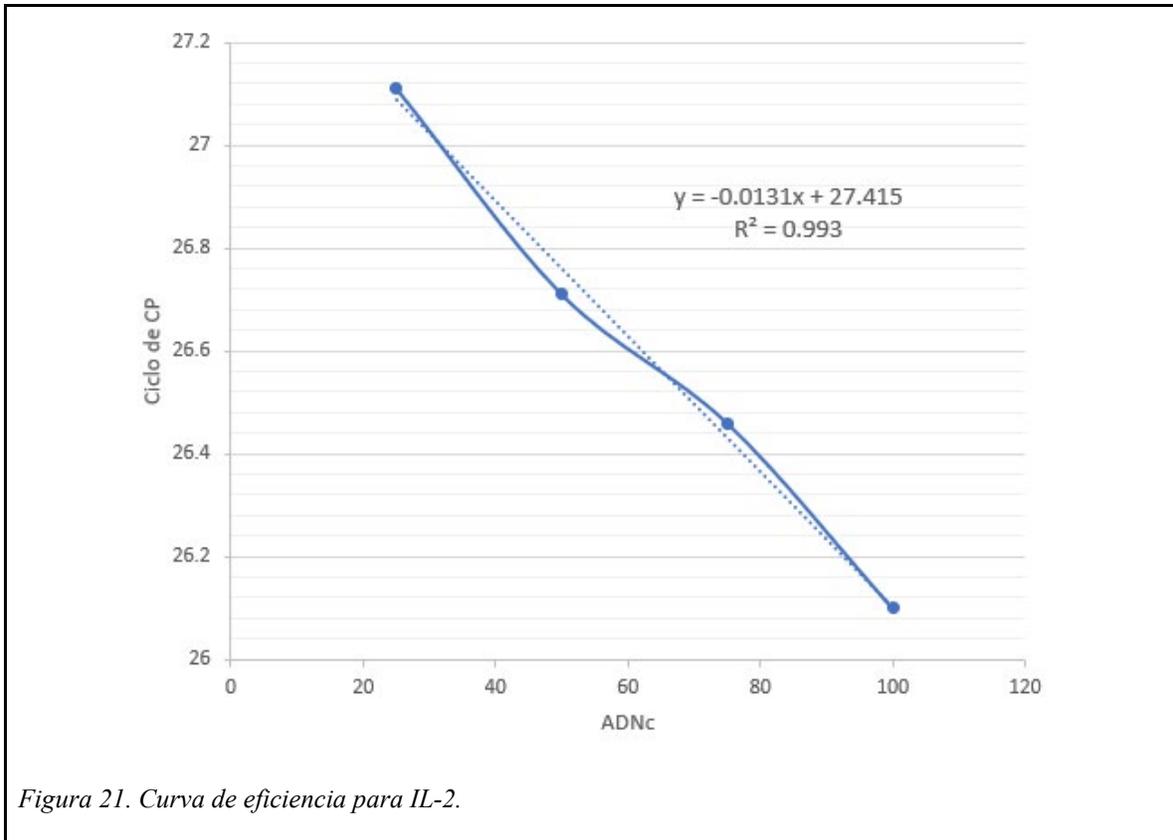


Figura 20. Curva de eficiencia para TGF- β .



6.3 Implementación

Para la implementación de las reacciones se utilizó la población experimental la cual presentó los siguientes resultados, para la expresión de IL-2 (Figura 22), los animales BLV(-) presentaron mayor expresión de esta citocina en comparación con el grupo BLV(+), sin mostrar diferencia estadística significativa entre los dos grupos ($p < 0,05$), este comportamiento se repitió para TNF- α (Figura 23) el cual también presentó mayor expresión en el grupo BLV(-), sin presentar diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), por el contrario la expresión de TGF- β (Figura 24), se comportó de forma inversa teniendo un mayor expresión en el grupo BLV(+), sin embargo, tampoco mostró diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los dos grupos.

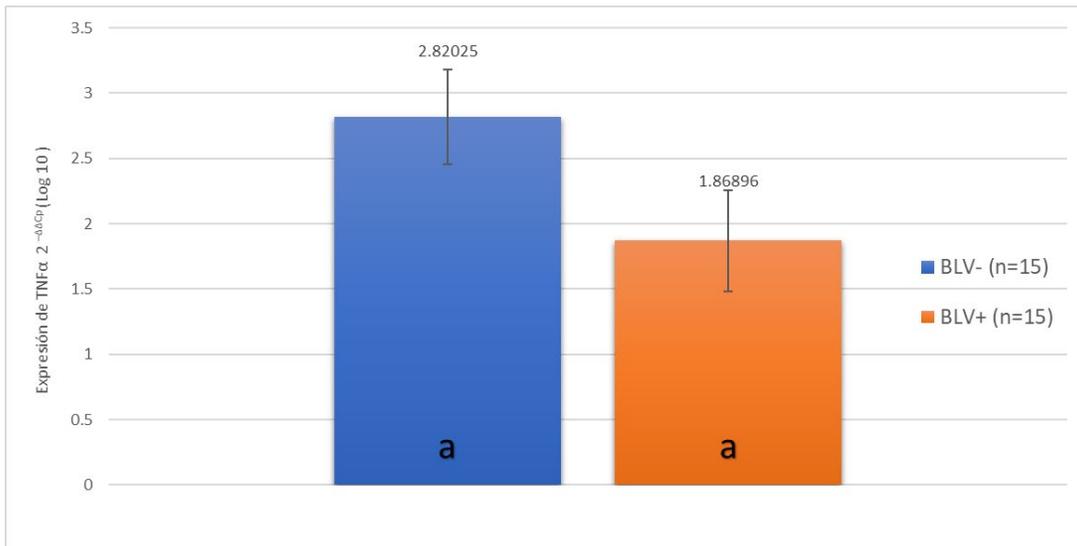


Figura 23. Expresión de TNF- α . Grupos según infección por BLV. Media, \pm error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

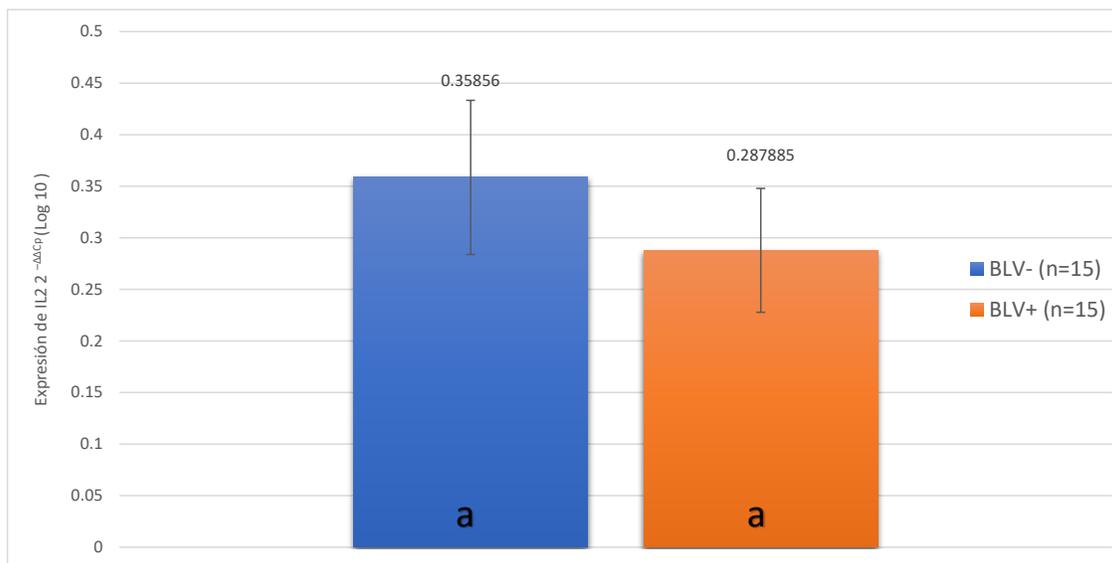


Figura 22. Expresión de IL-2. Grupos según infección por BLV. Media, \pm error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

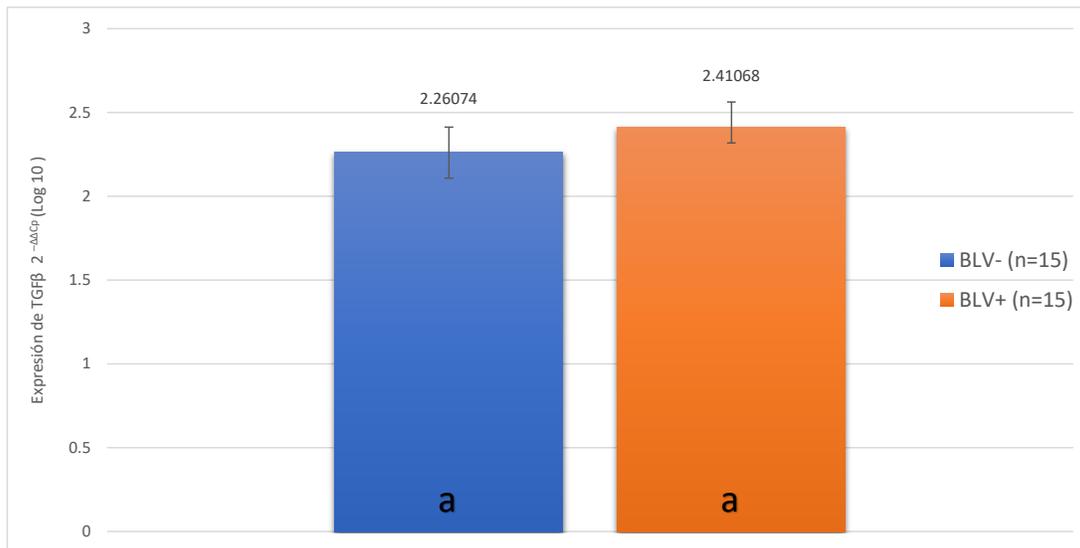


Figura 24. Expresión de TGF- β . Grupos según infección por BLV. Media, \pm error estándar. Los grupos con los mismos literales no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

7. DISCUSIÓN

La expresión de citocinas es un parámetro cuantificable que nos ayuda a determinar el tipo y magnitud de la respuesta inmune, a lo largo de los años se han utilizado diversas técnicas que se consideran eficientes para su detección y cuantificación, estas técnicas deben ser confiables y repetibles para evitar errores en el proceso experimental.

En este trabajo, el diseño de iniciadores fue exitoso ya que se lograron obtener los productos de los tamaños esperados y la repetibilidad, eficiencia y umbral de detección fueron más que aceptables ya que la técnica de PCR punto final ha estado sujeta a innovación desde su implementación, uno de los principales obstáculos de esta técnica, es la limitación que existe respecto a la cuantificación numérica de la expresión deseada, misma limitación que fue la principal razón por la que comenzara a implementarse la qPCR o PCR en tiempo real. Thornton & Basu en 2015, mencionan que la qPCR presenta una gran cantidad de ventajas por sobre otras técnicas que detectan ADN, la principal, es la posibilidad de visualizar la amplificación del producto deseado en tiempo real, pero para que esto suceda de manera óptima es necesario un diseño correcto de iniciadores para la reacción. Mencionan que existen diferentes programas informáticos que no representan un gasto económico importante, además existen herramientas basadas en la web que permiten realizar el diseño de iniciadores de manera gratuita, como el Primer3® (Untergasser *et. al.*, 2012), mismo que para el presente proyecto resultó eficiente y útil. Tamay, *et. al.*, 2013, menciona que para obtener reacciones eficientes de qPCR los productos obtenidos en el diseño de iniciadores deben tener un tamaño que oscile entre los 15-25 pares de bases, tener un porcentaje de G-C no mayor de 55 % y mantener una temperatura de alineación entre los 58-62 °C, por lo que los productos diseñados en este trabajo cumplen con los parámetros antes mencionados.

Para el caso de TNF- α , se obtuvieron resultados con bandas definidas a una temperatura de hibridación de 59°C y 60 °C, se obtuvieron bandas claras a una concentración de 50ng y 75ng de templado, 50ng de primers y con una concentración mínima de 2nmol de MgCl₂ éstos resultados difieren de Lendez *et al*, 2010, quienes para lograr la amplificación de TNF- α bovino, tuvieron que emplear una concentración de 200 ng de templado, mientras que

Reséndiz, *et al.*, 2013, utilizaron una concentración de 100 ng de ADNc para la detección de TNF- α en cerdos infectados con circovirus porcino tipo 2.

En el caso de IL-2 se obtuvieron como resultados bandas definidas con una temperatura de hibridación entre 50°C y 60 °C , una concentración de 50 ng de iniciador, 50 ng de templado, 2.5 nmol de MgCl₂ y el límite de detección de la técnica fue de 12.5 ng para las reacciones de qPCR, estos resultados difieren con el trabajo realizado por Fellman, *et. al.*, 2019, en el que para la detección de IL-2 mediante una técnica de qPCR en perros que fueron sometidos a tratamiento inmunosupresor de ciclosporina y dexametasona, emplearon una concentración de ADNc utilizado como templado, de 30 ng para cada reacción de PCR.

Los resultados de TGF- β , nos arrojaron bandas definidas a una temperatura de alineación de 58 °C y 59 °C, una concentración de iniciadores de 25 ng y 50 ng, un límite de detección a una concentración de 25 ng de templado y bandas definidas con una concentración de 50 ng y 75 ng de templado. Así como bandas claras con una concentración de 2 nmol de MgCl₂, resultados que coinciden con el trabajo realizado por Gil, 2019, quien para medir la expresión de TGF- β en animales infectados con rotavirus realizó una prueba de qPCR en la cual empleó una concentración de 50 ng de ADNc como templado para la reacción.

La implementación de ELISA para la detección de citocinas también ha sido de gran utilidad, Kraychete, *et al.*, 2009, por ejemplo empleó esta técnica para medir las concentraciones plasmáticas de citocinas proinflamatorias en pacientes con dolor crónico, la técnica dió buenos resultados y permitió que el estudio concluya, sin embargo, existen algunas limitaciones respecto a la utilización de ensayos basados en ELISA, ya que esta técnica es altamente dependiente de la calidad de los reactivos utilizados, así como del fabricante del kit. Aunado a esto último, la técnica de ELISA limita la cantidad de citocinas que se pueden evaluar, llevando el diseño experimental a sólo una molécula inflamatoria por reacción (Leng, *et al.*, 2008). La técnica de ELISPOT es útil para la detección de proteínas secretadas por diferentes células en el proceso inflamatorio y caracterizar las células secretoras dentro de una población celular determinada, Kurien, *et al.*, en 2015 realizó un experimento basado en una técnica de ELISPOT para la identificación de células T secretoras de citocinas específicas y aunque se trata de una técnica que cumple con las características deseables de ser repetible y confiable, al estar basada en el mismo principio que la técnica de ELISA, tiene

prácticamente las mismas desventajas. Favre, *et al.*, en 1997 realizaron un estudio para comparar la medición de citocinas utilizando varias técnicas de biología molecular, entre ellas, utilizaron la técnica de PCR semicuantitativa, la cual, es una técnica que se basa en el fundamento de la PCR punto final con el agregado de realizar cuantificación realizando una comparación visual de la intensidad de la banda mostrada en el gel. Esta técnica suele ser menos costosa que una qPCR, además de más simple debido a que no requiere una cuantificación específica, sin embargo; es mucho menos sensible que la técnica de qPCR y no nos proporciona información en tiempo real acerca de la amplificación del ADN.

Una técnica de qPCR debe ser estandarizada, repetible y confiable, por lo que para el presente estudio, se realizó una curva de eficiencia, misma que indica que la prueba tiene una eficiencia de 1.09 para la reacción de TNF- α , 1.03 en el caso de IL-2 y 1.05 para TGF- β . Una reacción de qPCR debe tener una eficiencia que sea mayor a 1 para considerarla repetible y confiable. Estos resultados son comparables con el trabajo realizado por Peinnequin, *et al.*, 2004, en el que se cuantificó la expresión de citocinas proinflamatorias de ratas utilizando qPCR, entre las citocinas detectadas, se encuentra TNF- α y se realizó también una curva de eficiencia, en la que se obtuvo un resultado de 1, por lo que se muestra que es muy importante realizar la curva de eficiencia para determinar que la reacción sea confiable.

En el caso de TGF- β , se obtuvieron resultados que si bien, no muestran una diferencia estadística, si se puede vislumbrar una tendencia de aumento en la expresión en los bovinos infectados con BLV. Dicha tendencia se ha observado y relacionado anteriormente con una respuesta inmunitaria atenuada en bovinos infectados y principalmente en animales que manifiesten linfocitosis persistente, la cuál se puede visualizar con la disminución en la expresión de TNF- α e IL-2 previamente descritas (Ohira *et al.*, 2016).

La estandarización de una técnica de qPCR para detectar citocinas proinflamatorias en bovinos infectados con el virus de la leucosis bovina es esencial para diversos aspectos de la investigación y el diagnóstico de esta enfermedad. Garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados de la qPCR es crucial para contribuir a la cuantificación precisa de citocinas proinflamatorias y proporcionar información valiosa sobre la respuesta inmunitaria del animal frente a la infección. Los datos obtenidos también son relevantes para la investigación epidemiológica, facilitando comparaciones entre diferentes estudios y

contribuyendo a la comprensión de la prevalencia de la infección. En última instancia, la estandarización de la qPCR en este contexto, no sólo mejora la calidad del diagnóstico, sino que también informa el desarrollo de estrategias de control y prevención más efectivas para limitar la propagación de la leucosis bovina. Favila en 2010 demostró que también se puede utilizar una técnica de PCR para determinar la presencia del virus en sangre de animales infectados, además de mostrar una correlación positiva entre la detección mediante PCR y ELISA, aún así, menciona y recalca que un proyecto de estandarización, incluso en la detección únicamente del virus es importante, para evitar errores y diferencias entre las condiciones utilizadas para la amplificación.

8. CONCLUSIONES

El presente proyecto ha logrado exitosamente optimizar las condiciones de amplificación de la técnica de qPCR para la detección precisa de la expresión de TNF- α , TGF- β e IL-2 en bovinos lecheros. Se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación de TNF- α , TGF- β e IL-2, mejorando la selectividad y eficiencia del proceso. La temperatura óptima de hibridación de los iniciadores se identificó, proporcionando condiciones ideales para la amplificación específica de los genes de interés. Se estableció la concentración óptima de magnesio para garantizar una amplificación eficiente y fiable de TNF- α , TGF- β e IL-2 en bovinos lecheros. La concentración óptima de iniciadores se determinó, asegurando una amplificación eficaz y específica de las secuencias de interés. Se identificó con precisión la concentración óptima de templado y la concentración mínima de detección para TNF- α , TGF- β e IL-2, permitiendo la detección sensible de la expresión génica incluso en niveles bajos. La eficiencia de la reacción en qPCR se evaluó con éxito, proporcionando una comprensión cuantitativa de la expresión de TNF- α , TGF- β e IL-2 en bovinos lecheros.

Finalmente, los hallazgos se implementaron con éxito en ensayos prácticos de qPCR, validando la aplicabilidad, confiabilidad y repetibilidad de la metodología propuesta para determinar la expresión de las citocinas mencionadas en bovinos lecheros en un entorno práctico.

9. REFERENCIAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2020). *Cellular and Molecular Immunology - 10th Edition*. Saunders/Elsevier.

Aida, Y., Murakami, H., Takagashi, 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, 64111.

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), 1-9.

Baldomir, T., López, R., García, D., Lucila, M., & Menéndez, E. (2020). *Actualización sobre el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)*. *Morfovirtual 2020 V Congreso virtual de Ciencias Morfológicas V Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal*. Recuperado el 12 de octubre de 2023, recuperado de <https://orcid.org/0000-0002-1881-9933>.

Barrios, M. (2013). *Expresión del complejo COX 3 en células de las líneas de cancer cervico uterino CALO e INBL, cultivadas en presencia de IL-2*. Tesis de licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza.

Barros, C., Sakata, R., Machado, A., Gerola, L., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 137(2).

Botella, R., Escudero, M., O'Connor, J. E., Dasi, F., Fenollosa, B., Nagore, E., Sanmartín, O., Sevilla, A., & Guillén, C. (2002). Estudio del patrón de citocinas (Th1/Th2) producido por linfocitos T periféricos y del existente en tejido tumoral de pacientes con melanoma en diferentes estadios. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 93(1-2), 87-101. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(02\)79214-4](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(02)79214-4).

Bulla, D., García, D., & Pulido, M. (2018). *Leucosis bovina enzoótica, revisión sistemática de literatura | Pensamiento y Acción*. Leucosis Bovina Enzoótica, Revisión Sistemática de Literatura.

Campbell, I. K., Roberts, L. J., & Wicks, I. P. (2003). Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology*, 81(5), 354–366. Recuperado de: <https://doi.org/10.1046/J.0818-9641.2003.01185.X>.

de Brun, L., da Silva, V., Silva, R. O. S., Lobato, F. C. F., Puentes, R., de Brun, L., da Silva, V., Silva, R. O. S., Lobato, F. C. F., & Puentes, R. (2019). Respuesta inmune humoral contra toxoides de *Clostridium perfringens* en vaquillonas Holando seropositivas el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212), 79–85. Recuperado de: <https://doi.org/10.29155/VET.55.212.6>.

Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S. (2008). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, (53-59). México, INEEC.

Favila, R. (2010). *Estandarización y valoración de la técnica de RT-PCR para la detección del virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB)*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Favila, 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)*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Favre, N., Bordmann, G., & Rudin, W. (1997). *Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR*. *Journal of Immunological Methods*, 204(1), 57–66. Recuperado de: [doi:10.1016/s0022-1759\(97\)00033-1](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00033-1).

Fechner, H., Blankenstein, P., Looman, A. C., Elwert, J., Geue, L., Albrecht, C., Kurg, A., Beier, D., Marquardt, O., & Ebner, D. (1997). Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, 237(2), 261–269. Recuperado de: <https://doi.org/10.1006/VIRO.1997.8784>.

Fellman, C. L., Archer, T. M., Wills, R. W., & Mackin, A. J. (2019). Effects of cyclosporine and dexamethasone on canine T cell expression of interleukin-2 and interferon-gamma. *Veterinary*

immunology and immunopathology, 216, 109892. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109892>.

Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Med. integral* (Ed. impr.); 39(2):63-71, Recuperado de: <https://ibecs.isciii.es/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=IBECS&lang=e&nextAction=lnk&exprSearch=10620&indexSearch=ID>.

Fragoso, J. M., Alarcón, G. V., Morales, S. J., Hernández, O. D. R., & Bello, J. R. (2014). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 150(4), 334-344

Franceschi, D. A., Viel, D. O., Sell, A. M., Tsuneto, L. T., & Visentainer, J. E. (2009). Optimization of the PCR-SSP methodology in the identification of TNF and IL-2 genetic polymorphisms. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31, 241-246.

Gil Perdomo, J. (2019). *Evaluación del TGF-beta durante la infección por rotavirus heterólogo en un modelo murino neonatal de inhibición de la citocina con Galunisertib*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Gillet, N. A., Gutiérrez, G., Rodríguez, S. M., de Brogniez, A., Renotte, N., Alvarez, I., Trono, K., & Willems, L. (2013). Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection. *PLOS Pathogens*, 9(10), e1003687. Recuperado de: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003687>.

Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burtreau, 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), 1–32. Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18/FIGURES/3>.

Grimoldi, M. G., Poli, G., Sartorelli, P., Caldora, C., Oldani, L., & Locatelli, A. (1983). Karyotype Analysis of Lymphocytes from Cattle at Different Stages of Bovine Leukaemia Virus Infection.

British Veterinary Journal, 139(3), 240–246. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)30491-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)30491-8).

Gutiérrez, E., Lützelshwab, C., Barrios, C., & Juliarena, M. (2020). Leucosis bovina: una visión actualizada. *Rev Inv Vet Perú*, 31(3), 16913. Recuperado de: <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16913>.

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>

Iwan, E., Szczotka, M., & Kocki, J. (2017). Cytokine profiles of dendritic cells (DCs) during infection with bovine leukaemia virus (BLV). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20(2), 221–231. Recuperado de: <https://doi.org/10.1515/PJVS-2017-0027>.

Kabeya, H., Ohashi, K., & Onuma, M. (2001). Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(7), 703–708. Recuperado de: <https://doi.org/10.1292/JVMS.63.703>.

Kahrs RF. (2001). *Viral Diseases of Cattle*, 2nd ed. Iowa State University. Press Ames.

Keefe, R. G., Ferrick, D. A., & Stott, J. L. (1997). Cytokine transcription in lymph nodes of cattle in different stages of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59(3–4), 271–283. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00083-4).

Kettmann, R., Burny, A., Callebaut, I., Droogmans, L., Mammerickx, M., Willems, L., & Portetelle, D. (1994). Bovine Leukemia Virus. *The Retroviridae*, 39–81. Recuperado de: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1730-0_2.

Kettmann, R., Cleuter, Y., Mammerickx, M., Meunier-Rotival, M., Bernardi, G., Burny, A., & Chantrenne, H. (1980). Genomic integration of bovine leukamia provirus: Comparison of persistent lymphocytosis with lymph node form of enzootic bovine leukosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5 I), 2577–2581. Recuperado de: <https://doi.org/10.1073/PNAS.77.5.2577>.

Kraychete, D. C., Sakata, R. K., Issy, A. M., Bacellar, O., Jesus, R. S., & Carvalho, E. M. (2009). Proinflammatory cytokines in patients with neuropathic pain treated with Tramadol. *Revista brasileira de anestesiologia*, 59, 297-303.

Kurien, B.T., Scofield, R.H. (2015). Western Blotting: An Introduction. In: Kurien, B., Scofield, R. (eds) *Western Blotting. Methods in Molecular Biology*, vol 1312. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5

Lendez, P. A., Passucci, J. A., Juliarena, M. A., Gutierrez, S. E., Dolcini, G. L., & Ceriani, M. C. (2010). Polimorfismo del promotor del gen TNF-a (p-TNF-a) bovino y su asociación con la resistencia del huésped a la diseminación del virus de la leucosis. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(11), 1-10. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63616933008.pdf>. Enero, 2024.

Lendez P. A. (2021, junio). Estudio de parámetros inmunológicos y moleculares asociados al desarrollo de alta o baja carga proviral en animales infectados con el virus de la leucosis bovina (BLV). Tesis de doctorado. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Leng, S. X., McElhaney, J. E., Walston, J. D., Xie, D., Fedarko, N. S., & Kuchel, G. A. (2008). ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(8), 879-884.

Lyons, R. M., & Moses, H. L. (1990). Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *European journal of biochemistry*, 187(3), 467-473. Recuperado de: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15327>.

Mammerickx, M., Palm, R., Portetelle, D., & Burny, A. (1988). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to sheep: latency period of the tumoral disease. *Leukemia*, 2(2), 103-107. Recuperado de: <https://europepmc.org/article/med/2830439>. Diciembre, 2023.

Marawan, M. A., Alouffi, A., el Tokhy, S., Badawy, S., Shirani, I., Dawood, A., Guo, A., Almutairi, M. M., Alshammari, F. A., & Selim, A. (2021). Bovine Leukaemia Virus: Current

Epidemiological Circumstance and Future Prospective. *Viruses*, 13(11), 2167. Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/V13112167>.

Monroy, J., Larios, F., Madewel, B., & Trigo, F. (1987). Estudio seroepizootiológico de la leucosis bovina en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 25(2), 151–154. Recuperado de: <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/3455>.
Noviembre, 2023.

Monteon, A. L., & Ligonio, A. R. (2008). El papel inmunorregulador del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en las infecciones parasitarias. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 8(1), 38. Recuperado de: https://www.uv.mx/rm/num_antteriores/revmedica_vol8_num1/articulos/papel.pdf. Enero, 2024.

Moratorio. (2012). *Aspectos genómicos y evolutivos del virus de la leucosis bovina*. Tesis de doctorado. Universidad de la República.

Narayan, K. G., Sinha, D. K., & Singh, D. K. (2023). World Organization for Animal Health (WOAH)/Office International Des Epizooties (OIE). In *Veterinary Public Health & Epidemiology: Veterinary Public Health-Epidemiology-Zoonosis-One Health* (pp. 181-184). Singapore: Springer Nature Singapore.

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. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(1), 52–63. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/IID3.93>.

Oliveira, C. M. B. D., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61, 260-265. Recuperado de: <https://www.scielo.br/j/rba/a/xZBcm3rwxnknt94Gz9yq5Lq/?format=pdf&lang=es>. Enero, 2024.

Olson, C. and Miller, J., A. Burny A. Burny, M. Mammerrickx M. Mammerrickxeditors, 19872200504, English, Miscellaneous, Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus, (3–11), History and terminology of enzootic bovine leukosis.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarençon, D., ... & Multon, E. (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC immunology*, 5, 1-10. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2172-5-3>. Diciembre, 2023.

Peralta, O., Lagunas, A., & Madrid, V. (2001). Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *salud pública de méxico*, 43(4), 340-351. Recuperado de: <https://www.scielosp.org/pdf/spm/v43n4/5901.pdf>. Noviembre, 2023.

Radostits, O. M., & Arundel, J. H. (2002). *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. España. McGraw Hill Interamericana.

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>

Reséndiz, M., Montalvo Corral, M., Flores Mendoza, L., Ramírez Mendoza, H., Segalés, J., & Hernández, J. (2013). Cytokine expression in growing pigs co-infected with porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinaria México OA*, 43(1). Recuperado de: <https://veterinariamexico.fmvz.unam.mx/index.php/vet/article/view/303>. Septiembre, 2023.

Salazar, M. (2009). El factor de necrosis tumoral-alfa (FNT- α) en la patogénesis de la artritis reumatoide y el riesgo de tuberculosis con infliximab (un agente ANTI-FNT- α). *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 66(590), 345-351. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=29902>. Enero, 2024.

Schwartz, I., & Lévy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary research*, 25(6), 521-536. Recuperado de: <https://hal.science/hal-00902257/document>. Septiembre, 2023.

Tamay, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentals of polymerase chain reaction (PCR) and PCR on real time. *Medigraphic.Com*, 2, 70–78. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=44427>. Noviembre, 2023.

Taylor, B. C., Stott, J. L., Thurmond, M. A., & Picanso, J. P. (1992). Alteration in lymphocyte subpopulations in bovine leukosis virus-infected cattle. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 31). Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0165242792900855>. Enero, 2024.

Thornton, B., Basu, C. (2015). Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design. In: Basu, C. (eds) PCR Primer Design. *Methods in Molecular Biology*, vol 1275. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13

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), 3169–3177. Recuperado de: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.4.3169-3177.1998/FORMAT/EPUB>.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(15):e115. doi: 10.1093/nar/gks596. Epub 2012 Jun 22. PMID: 22730293; PMCID: PMC3424584.

Wang, B., Boyer, J. D., Ugen, K. E., Srikantan, V., Ayyaroo, V., Agadjanyan, M. G., Williams, W. v, Newman, M., Coney, L., & Carrano, R. (1995). Nucleic acid-based immunization against HIV-I: induction of protective in vivo immune responses. *AIDS (London, England)*, 9 Suppl A, S159-70. Recuperado de: <http://europepmc.org/abstract/MED/8819582>. Octubre, 2023.

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>

Yakobson, B., Brenner, J., Ungar-Waron, H., & Trainin, Z. (2000a). Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. In *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* (Vol. 23). Recuperado de: www.elsevier.com/locate/cimid. Octubre, 2023.

Yakobson, B., Brenner, J., Ungar-Waron, H., & Trainin, Z. (2000b). 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), 197–208. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(99\)00074-0](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(99)00074-0).

Yang, Y., Fan, W., Mao, Y., Yang, Z., Lu, G., Zhang, R., ... & Wang, C. (2016). Bovine leukemia virus infection in cattle of China: association with reduced milk production and increased somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3688-3697.

Zavaleta, J. (2009). *Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de la Leucosis enzoótica bovina (vLEB)*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

