



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

Susceptibilidad *in vitro* de las células de membrana  
sinovial de feto caprino (MSFC) a la infección del virus de  
la Leucosis Enzoótica Bovina (VLEB).

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

**ANA SILVIA GONZÁLEZ MÉNDEZ**

**ASESORES**

**DRA. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO  
DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO.

2011



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**

Con especial dedicatoria para mi padre Juan Antonio González Arzate†, quien a pesar de no estar con nosotros nos enseñó a continuar y superar todos los obstáculos para poder sobresalir. Gracias por tu breve tiempo que nos brindaste, pero hermoso, los consejos y el amor que nos diste.

A mi madre Ma. Luisa, sin ti y tu gran apoyo no podríamos haber salido adelante, gracias por haberte superado; por esos momentos y consejos que me diste. Gracias!

A mis sobrinos: Bruno, Fernando y Rubén, les dedico esta tesis, espero que les ayude de inspiración para continuar con sus estudios y alcanzar sus sueños.

A todos y cada uno de los asesores y sinodales, para que continúen formando profesionistas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que apoyaron este trabajo desde el principio, gracias por creer en mí.

A mis sinodales por haber brindado su valioso tiempo, en la revisión de este trabajo, a sus consejos y observaciones dadas.

A mis asesores Dra. Martha García, por los consejos, el tiempo, la paciencia, conocimientos y gran amistad brindada durante este tiempo. El Dr. Alejandro (Tock-Tock), por abrirme las puertas del “lab”, por haberme insistido en el servicio social, gracias por todo su apoyo y sobre todo su amistad. A Hugo, que mas que Dr. un gran amigo; gracias por todo tus consejos. Dra. Lucia A. García por su atención brindada. A mi gran asesor y amigo Jesús (Chucho), sin ti hubiera hecho otra tesis jejeje, gracias por acompañarme, enseñarme, darme todo ese apoyo y motivación.

Más que asesores un buen equipo de trabajo.

A mi familia; a mi Má, mis hermanos Luis, Pepe y Toño, gracias por su apoyo incondicional, asesorías y los momentos divertidos durante mi vida. Muchas gracias por estar siempre con migo y cuidarme.

A Lulú, que me apoyo y confió en mi desde inicios de mi carrera, muchas gracias por tus consejos y amistad dada. A todos y cada uno de mis amigos a lo largo de la carrera; a Itz por su ayuda, apoyo y gran amistad, gracias machi por escuchar. A Yes por su ayuda y tu gran amistad que me Adrian gracias por el apoyo y motivación; Norma por tu gatuna ayuda a lo largo de esta tesis; Mark's por escuchar y entenderme; Flor por esos momentos tan divertidos; Marco por tus consejos; Carmen por tus conversaciones; Chox por tus asesorías; Carlos yo se que te costo, pero gracias por tu amistad. A todos gracias por comprensión y tolerancia.

Y por si alguien se me paso, muchas gracias!!!.

## ÍNDICE

1.- Resumen .....	1
2.- Introducción.....	2
2.1 Antecedentes.....	2
2.1.1 Cultivos celulares.....	2
2.1.2 Leucosis Enzoótica Bovina.....	3
2.2 Etiología.....	5
2.3 Ciclo de replicación.....	8
2.4 Cuadro clínico de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB).....	10
2.4.1 Presentación de la Enfermedad.....	10
2.5 Mecanismos inmunitarios.....	11
2.6 Epidemiología .....	14
2.7 Formas de transmisión.....	15
2.8 Diagnóstico.....	16
2.8.1 Diagnóstico clínico.....	16
2.8.2 Pruebas de laboratorio.....	17
2.8.2.1 Hematológico.....	17
2.8.2.2 Prueba de Inmunodifusión en agar gel (IDAG).....	18
2.8.2.3 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	18
2.8.2.4 Prueba de aislamiento viral (Co-cultivo celular).....	19
2.8.2.5 Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	20
2.9 Prevención y Control.....	22
3.- Justificación.....	23
4.- Objetivos.....	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos particulares.....	24
5.-Hipótesis.....	25
6.- Materiales y Métodos.....	26
6.1 Cultivo de células de membrana celular de feto caprino (MSFC).....	26
6.2 Animales de experimentación.....	26
6.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).....	27
6.4 Co-cultivos.....	28
6.5 Detección del VLEB por inmunocitoquímica.....	28
6.6 Extracción de ADN.....	29
6.7 Cuantificación de ADN.....	29
6.8 Diseño de primers.....	30
6.9 Prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
6.10 Visualización en geles de agarosa.....	31
6.11 Purificación de ADN a partir de gel de azarosa.....	31
7.- Resultados.....	33
7.1 Co-cultivos.....	33
7.2 Inmunocitoquímicas.....	41
7.3 Prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
8.- Discusión.....	43
9.- Conclusiones.....	46
10.- Bibliografía.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURA.

TABLA 1. Clasificación de los retrovirus.....	5
FIGURA 1: Genoma del Virus de la Leucosis Bovina (VLEB).....	8
FIGURA 2: Ciclo de replicación de los retrovirus.....	9
TABLA 2: Alteración en la concentración de citocinas y sus consecuencias.....	13
TABLA 3: Niveles de citocinas en diferentes estadios de la leucosis bovina .....	13
FIGURA 3: Mecanismos de transmisión de leucosis bovina.....	15
TABLA 4: Parámetros de BENDIXEN.....	18
TABLA 5: Células susceptibles a la infección del Virus de la Leucosis Bovina (VLEB).....	20
TABLA 6: Algunas secuencias de oligonucleótidos para PCR utilizadas en el diagnóstico del VLEB.....	21
FIGURA 4: Técnica de separación de células mononucleares de sangre periférica mediante un gradiente de densidad.....	27
FIGURA 5: Control Negativo. Células membrana sinovial sin co-cultivar.....	34
FIGURA 6: Células gigantes multinucleadas Aumento 40x (8 días post-cocultivo vaca 949).....	35
FIGURA 7: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X, (15días post-cocultivo vaca 949).....	35
FIGURA 8: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X (20 días post-cocultivo vaca 949).....	36
FIGURA 9: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X (15días post-cocultivo vaca 348).....	36
FIGURA 10: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X (8 días post-cocultivo vaca 892).....	37
FIGURA 11: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X (8 días post-cocultivo vaca 935).....	37
FIGURA 12: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X (15 días post-cocultivo vaca 188).....	38
FIGURA 13: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X (15 días post-cocultivo vaca 188).....	38
FIGURA 14: Células gigantes multinucleadas Aumento 40X (15 días post-cocultivo vaca 188).....	39
TABLA 7: Aparición de Sincitios en células MSFC después de varios días post-cocultivo con CMSP de 12 animales seropositivos a Leucosis Bovina.....	40
FIGURA 15: Inmunocitoquímica CN-MSFC Aumento 100X.....	41
FIGURA 16: Inmunocitoquímica de la muestra 188, donde se observa un crecimiento de cúmulo café en el co-cultivo de células de MSFC 100X.....	41
FIGURA 17: Productos de amplificación por PCR del gen <i>pol</i> del VLEB.....	42
FIGURA 18: Productos de amplificación de los productos purificados.....	43
TABLA 8: Resumen de los resultados obtenidos en las técnicas utilizadas.....	44

## ABREVIATURAS

**µg:** Micro gramo

**µL:** Micro litro

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**ARN:** Acido ribonucleico

**CA:** Capside

**cm<sup>2</sup>:** Centímetros cuadrados

**CNSP:** Células mononucleares de sangre periferia

**co-cultivos:** Son células cultivadas con otras células

**DMC:** Desprendimiento de la monocapa celular

**env:** Envoltura

**EUA:** Estados Unidos de América

**gp:** glicoproteína

**h:** Hora

**ICTV:** International Committee on Taxonomy of Virus

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IL:** Inter leucina

**IN:** Integrasa

**LEB:** Leucosis Enzoótica Bovina

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**mL:** Mililitro

**MSFC:** Células de Membrana Sinovial de Feto Caprino

**NC:** Nucleocapside

**nM:** nanoMolar

**p:** proteína

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Solución de Fosfatos

**pol:** polimerasa

**rex:** gen del VLEB denominado rex

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT:** Transcriptasa reversa,

**SFB:** Suero fetal bovino

**tax:** gen del VLEB denominado tax

**TM:** Transmembranal

**VLEB:** Virus de la Leucosis Enzoótica Bovina

**SENASA:** Servicio de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria

## 1. RESUMEN

Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), una enfermedad neoplásica linfoproliferativa (linfotrópica) compleja, crónica y fatal, la cual genera pérdida de peso, infertilidad y decremento en la producción láctea. Las pérdidas económicas son directas por el aumento en la demanda de animales de reemplazos. Así mismo existe una inhabilitación de exportar ganado, semen y embriones a países que tienen programas especiales para el control del virus de la leucosis enzoótica bovina (VLEB). Los cultivos celulares son importantes para el diagnóstico y producción de antígenos. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la susceptibilidad a la infección del VLEB en líneas celulares. Las células de membrana sinovial de feto de cabra (MSFC) soportan adecuadamente la replicación de Retrovirus de pequeños rumiantes. Sin embargo, éstas no han sido evaluadas para la infección con VLEB. El objetivo de este trabajo fue determinar la susceptibilidad de las células de membrana sinovial de feto caprino (MSFC) a la infección del VLEB mediante co-cultivos a partir de estas células y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de bovinos previamente diagnosticados como positivos al VLEB por ELISA y PCR, se revisaron durante un periodo de 20 días para detectar efecto citopático (células gigantes multinucleadas o sincitios), en dichos co-cultivos y se confirmó la presencia del antígeno viral por inmunocitoquímica utilizando un conjugado peroxidado anti-IgG de Bovino, además se confirmó mediante PCR la infección de las células. Para el estudio de PCR se diseñaron un par de oligo nucleótidos que amplificaban un fragmento de 436 pares de bases correspondiente al gen *pol* del virus. Este es el primer reporte que describe la infección del VLEB en MSFC, lo que puede permitir la utilización de éstas células para la producción de antígeno del VLEB con fines de diagnóstico.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 ANTECEDENTES

#### 2.1.1 cultivos celulares

El cultivo de tejidos fue empleado en 1913, para la propagación de virus vacunales, y no fue sino hasta 1950 cuando Enders y Cols pudieron propagar los cultivos celulares de riñón de Macaco. Así mismo los primeros medios de cultivo eran preparados a partir de hidrolizados de proteínas, estas características fueron perfeccionadas por los doctores Eagle y Earl, con la ayuda de sales balanceadas (UNNE, [www.catmicromed.ecaths.com](http://www.catmicromed.ecaths.com); ULA, [www.webdelprofesor.ula.ve](http://www.webdelprofesor.ula.ve)).

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten reproducir y mantener las células “*in vitro*”, esto permite tener al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Los cultivos de células se pueden clasificar en cultivos primarios y secundarios, cepas celulares diploides y líneas celulares continuas (Acton 1977), siendo estas últimas las que resisten un número ilimitado de pases con un complemento cromosómico anormal. (Freshney, 1991)

En la actualidad los cultivos celulares facilitan el desarrollo de pruebas de diagnóstico y estudios de investigación.

Algunas de las áreas donde se utilizan los cultivos celulares son en:

- Virología: para la replicación viral, producción de antígenos y diagnóstico entre otros.
- Investigación del cáncer y evaluación de antineoplásicos
- Producción de anticuerpos monoclonales.
- Para la producción de proteínas como: interferón, insulina, hormona de crecimiento.
- Estudios de interacción y señalización celular, en el desarrollo y diferenciación celular
- Ensayos de toxicidad celular.

Algunas ventajas de utilizar cultivos celulares para los estudios antes mencionados, permiten controlar su medio ambiente, pH, temperatura, niveles de O<sub>2</sub>,

CO<sub>2</sub> y tensión superficial (características físico-químicas y fisiológicas necesarias para el crecimiento y/o mantenimiento celular).

- Otra característica importante es su homogeneidad celular.
- Una ventaja económicamente importante, es evitar el uso de animales en experimentación.
- Apoyar al comité interno para el cuidado y uso de los animales de experimentación.

(UNNE, [www.catmicromed.ecaths.com](http://www.catmicromed.ecaths.com); ULA, [www.webdelprofesor.ula.ve](http://www.webdelprofesor.ula.ve); INDRE, 1998)

Sin embargo, existen algunas desventajas del cultivo celular

- Infraestructura necesaria para llevar a cabo el cultivo celular.
- La susceptibilidad de líneas celulares no es para todos los virus.
- La patogénesis viral en una célula no es representativa del curso de una enfermedad en un individuo vivo.

(Freshney, 1991; INDRE, 1998)

### **2.1.2 Leucosis Enzoótica Bovina**

El virus de la leucosis bovina (VLEB) es el agente causal de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), la cual es una enfermedad neoplásica linfoproliferativa (linfotrópica) compleja, crónica y fatal. La LEB es prevalente en muchas regiones del mundo. En 1871 se reportó el primer caso de Leucosis Bovina al observar un nódulo en el bazo de un bovino. (Wu *et al.*, 2003; Gillet; 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009; Tsutsui *et al.*, 2010)

Se estima que el 70% de las cabezas de ganado en Estados Unidos de América (EUA) están infectadas con el VLEB, las estadísticas mundiales de la LEB no son exactas y se considera que la LEB es la infección más frecuente en bovinos de Canadá y EUA, la cual impacta económicamente sobre la industria bovina, estimando pérdidas del 10 al 30% en el ganado, por la eliminación prematura de animales, lo cual sucede más frecuente en hatos lecheros. Otros estudios indican tasas de un 0 al 100% de prevalencia. En México un estudio determinó un 40% de prevalencia, en otros países como Francia han reportado una prevalencia del 27%, Venezuela 37%, Nueva Zelanda 2% y Australia 0.22%. En Argentina la infección por el VLEB es común en

datos lecheros y oscila entre un 40% y un 80% de prevalencia; en este país, actualmente se tiene un programa nacional de control voluntario, el cual consiste en un monitoreo serológico constante (Miller & Van der Maaten, 1981; Monrroy, *et al.*, 1993; SENASA, 1994; Dube *et al.*, 2000; Radostits, 2001; Arcare, *et al.*, 2007; Monti *et al.*, 2007)

Su alta incidencia se relaciona con el tipo de manejo y confinamiento en el que se encuentra el ganado. Actualmente, se han desarrollado y evaluado una serie de métodos inmunoenzimáticos, los cuales son reconocidos como técnicas de diagnóstico oficiales en EE.UU., Canadá y otros países. Sin embargo, independiente del método serológico empleado, la principal desventaja de estas pruebas es su incapacidad para discriminar anticuerpos maternos de una infección activa, los cuales pueden persistir durante los primeros 6 meses de vida del animal. Además, estos métodos no proporcionan evidencia de la infección en su etapa temprana, esto es, antes de la seroconversión, esta enfermedad en particular puede tardar hasta 14 semanas en presentarse. (Felmer *et al.*, 2006)

La LEB infecta principalmente a linfocitos B, sin embargo, tiene la capacidad de infectar otras células, tales como linfocitos T y monocitos. Se manifiesta con un curso clínico lento, desarrollándose con un período de incubación de 1 a 5 años y afecta principalmente a los animales mayores de 2 años de edad. El ganado infectado puede permanecer clínicamente asintomático durante toda su vida. Sin embargo, solo un 30-70% desarrolla linfocitosis persistente (LP), por lo que menos del 5% desarrollan neoplasias o tumores linfoides, esto último se considera la forma clínica fatal de la enfermedad, dependiendo del órgano afectado (Wu *et al.*, 2003; Felmer *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2009; Tsutsui *et al.*, 2010).

En la mayoría de los casos de LEB no desarrollan signos clínicos aparentes, pero puede encontrarse pérdida de peso, falta de apetito, infertilidad y decremento en la producción láctea. La aparición de linfomas en vacas lecheras tiene un impacto económico directo, por la selección de animales para desecho que se incrementa, por lo que aumenta la demanda de animales de reemplazo. Así mismo, existe una inhabilitación de exportar ganado, semen y embriones a países que tienen programas especiales para el control del VLEB (Dus Santos *et al.*, 2007; Sordillo & Erskine, 2010)

## 2.2 Etiología

La leucosis enzoótica es una enfermedad del ganado bovino causado por un retrovirus exógeno, llamado virus de la leucosis bovina (VLEB), es un virus que pertenece a la **familia Retroviridae**, subfamilia **Orthoretrovirinae** del género **deltavirus**. **TABLA 1** (Van der Maaten & Miller, 1990; Murphy et al.1999; Kabeya et al, 2001)

**TABLA 1: CLASIFICACIÓN TAXONOMICA DE LOS RETROVIRUS**

Familia	Subfamilia	Género	Especie
<b>Retroviridae</b>	<b>Orthoretrovirinae</b>	Alfaretrovirus	Carsinoma Aviar Mill Hill virus 2 Virus de la Leucosis Aviar Virus de la Mieloblastosis Aviar Virus del Sarcoma Aviar CT10 Virus del Sarcoma Fujinami Virus del Sarcoma de Rous Virus del Sarcoma de UR2 Virus del Sarcoma Y73
		Betaretrovirus	<i>Retrovirus Jaagsiekte del borrego</i> <i>Virus de Langur</i> <i>Virus del mono Mason-Pfizer</i> <i>Virus del tumor mamario del ratón</i> <i>Retrovirus del mono Squirrel</i>
		<b>Deltaretrovirus</b>	<b><i>Virus de la leucosis bovina</i></b> <i>Virus linfotropico-T del primate</i> <i>1,2 y3</i>
		Epsilonretrovirus	<i>Virus del sarcoma epidermal de Walleve</i> <i>Virus de la hiperplasia epidermal del Walleve 1, 2</i>
		Gammaretrovirus	<i>Virus sincitial del pollo</i> <i>Virus de la Leucemia Felina</i> <i>Virus del sarcoma murino</i>

			<i>Virus del sarcoma Felino</i> <i>Virus de la leucemia del mono</i> <i>Oncovirus tipo-C del cerdo de Guinea</i> <i>Virus de la reticuloendoteliosis</i> <i>Virus del sarcoma murino Harvey,</i> <i>Kirsten</i> <i>Virus de la necrosis del bazo del pato</i> <i>Retrovirus de la Serpientes</i>
		Lentivirus	<i>Virus de la inmunodeficiencia bovina</i> <i>Virus de la artritis encefalitis caprina</i> <i>Virus de anemia infecciosa equina</i> <i>virus de la inmunodeficiencia felina</i> <i>virus inmunodeficiencia humana 1,2</i> <i>Lentivirus del puma</i> <i>Virus de la inmunodeficiencia del simio</i> <i>Virus de maedi-visna</i>
	Spumaretrovirinae	Spumavirus	<i>Virus espumoso del mono</i> <i>verde africano, bovino equino,</i> <i>felino, simio macaco y simio</i>

(ICTV, 2009)

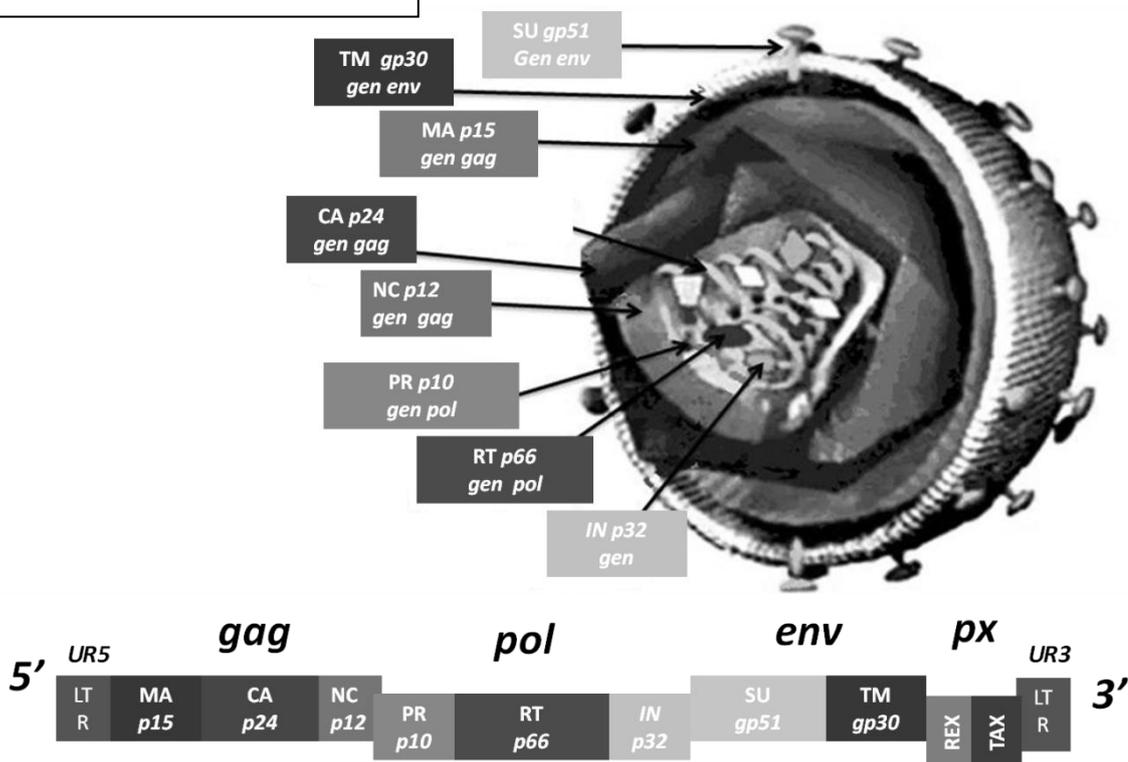
Es un virus con cápside icosaédrica, ARN de cadena sencilla y mide aproximadamente 80-100nm de diámetro (**FIGURA 1**) (Murphy *et al.*, 1999; Dube *et al.*, 2009).

El VLEB esta constituido principalmente por tres regiones genómicas, *gag*, *pol* y *env*, similar a los otros retrovirus. Sin embargo, tiene una región adicional llamada *px*, la cual codifica para cuatro proteínas de las cuales dos ya han sido identificadas, *Tax* y *Rex* que se relacionan con la regulación de la expresión y la replicación del VLEB, estas dos proteínas se consideran esenciales en la patogenicidad. Las otras dos proteínas denominadas RIII-ORF y GIV son proteínas accesorias, se cree que son la causa de la linfocitosis persistente (LP) (Dub *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003; Dube *et al.*, 2009)

Las proteínas codificadas por el gen *gag* son las de cápside (CA) y nucleocápside (NC), que forman la estructura del virión y juegan un papel importante en las etapas iniciales del ciclo de la infección, se designan p24 y p15 respectivamente de acuerdo a su peso molecular (Dube *et al.*, 2000; González *et al.*, 1999). La p24 es el mayor componente de la cápside y tiene varios sitios antigénicos como WAPE y GD21 que son epítopos para las células CD8 citotóxicas y son inmunógenos muy importantes. El gen *pol* codifica para la transcriptasa reversa (RT) e integrasa (IN) y el gen *env* codifica la glicoproteína transmembranal (*gp 30*) y glicoproteína de superficie (*gp 51*) que son reconocidas por el receptor celular y son responsables del tropismo, interferencia viral y fusión celular respectivamente (Dube *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2003; Ridge *et al.*, 2005).

Las proteínas estructurales de VLEB como p24 y gp51 son importantes inmunógenos para detectar anticuerpos en la mayoría de los animales infectados. La gp51 es un potente antígeno, responsable de la principal respuesta humoral del huésped (González *et al.*, 2001).

**FIGURA 1** Genoma del Virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (VLEB)

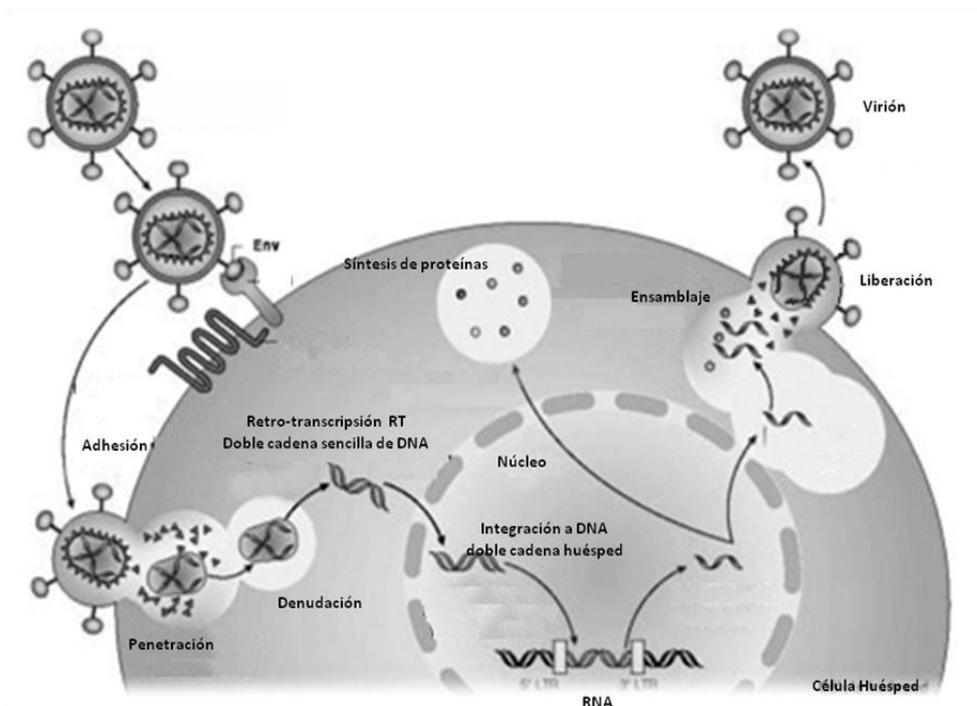


### 2.3 Ciclo de replicación viral

La replicación de los retrovirus es mucho más compleja que la de otros virus, ya que tienen un genoma ARN de cadena sencilla con sentido positivo, además este virus codifica una enzima RT que sirve para generar un ADN de cadena doble. El VLEB se adhiere al linfocito B para penetrar, ya dentro del citoplasma libera su ácido nucleico y comienza una retrotranscripción del virus mediante la ayuda de la enzima RT que utiliza el virus para sintetizar un ADN complementario de cadena única a partir de ARN y también degrada el ARN vírico original, lo cual permite a los virus convertir el ARN de banda sencilla lineal a un ADN doble circular, para después integrarlo en el ADN cromosómico de la célula huésped. Con la ayuda de la enzima integrasa (IN), al cual se le denomina provirus y puede mantenerse latente, integrado en el genoma de la célula. A partir de este punto, el virus puede permanecer dentro de la célula o comenzar a codificar las proteínas accesorias y de la cápside, mediante un ARNm, posteriormente se producen proteínas estructurales y el ácido nucleico se integra, dando lugar a la progenie, para posteriormente gemar atravesando la membrana de la célula huésped y liberar un virión maduro, que puede finalmente infectar otras células (Fenner *et al.*, 1987; Coffin, 1997 Murphy *et al.*, 1999; Rebhun, 1999; Van Regenmortel, *et al.*, 2000).

**Figura 2. Ciclo de replicación de los retrovirus**

Tomado y modificado de <http://www.google.com.mx/imgres/replicacionvih>



## 2.4 Cuadro clínico de la LEB

### 2.4.1 Presentación de la enfermedad

La leucosis bovina presenta dos formas clínicas: La primera; leucosis enzoótica bovina (LEB) y la segunda; leucosis bovina esporádica (LBs). Esta última presenta la forma cutánea, tímica y de terneros (Onuma *et al.*, 1979; Mohanty y Dutta, 1981).

La LEB:

Esta es más frecuente en ganado lechero, de cualquier edad y tiene tres presentaciones principales;

- ✱ La primera son animales asintomáticos (65% al 70% de la población). La importancia de ésta radica en que los bovinos fungen como portadores y transmisores.
- ✱ La segunda son portadores sanos con linfocitosis persistente (LP) (20% al 30% de la población enferma).
- ✱ La tercera, se refiere al desarrollo de linfomas multisistémicos (1% al 5% de la población enferma) la cual llega a provocar muerte súbita dependiendo de la localización y es reconocida como la fase fatal de la enfermedad (Grimshaw *et al.*, 1979; Batrnaz *et al.*, 1995; Dusinsky *et al.*, 2000; Radostits, 2002; de la Sota, 2004).

Los signos de la LEB aparecen después de los 2 años de edad, son inespecíficos y variables, puesto que van a responder a la ubicación de los linfomas y el grado de afectación de los órganos. Se han reportados anemia, emaciación e infertilidad, momificaciones por tumoraciones en las paredes del útero y cuernos uterinos, el signo mas frecuente es el agrandamiento bilateral de los ganglios pre-escapulares, exoftalmia por degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, el cual es un signo bastante específico de la enfermedad. La presencia de deformaciones o masas tumorales subcutáneas en varias partes del cuerpo, también es indicativo de la enfermedad (Chamizo, 2005, Gatti, 2007)

La LBs:

- ✱ La forma cutánea: es la más rara de los linfosarcomas bovinos, se presenta en animales de 18 a 30 meses de edad, los cuales presentan nódulos subcutáneos circulares de diversas formas y consistencias. Suelen desaparecer y reaparecer constantemente, la resolución puede ser espontáneamente y el animal llega a recuperarse (Grimshaw et al, 1979; Batrnaz, et al, 1995; Dusinsky, *et al.*, 2000; Radostits, 2002; de la Sota, 2004).
- ✱ Forma tímica o linfosarcoma tímico: se presenta en ganado de 6 meses a dos años de edad, se observa una masiva infiltración linfocitaria del timo, caracterizado por una tumoración marcada, así como otros linfonodos afectados, como los preescapulares y mediastínicos; los cuales llegan afectar órganos adyacentes, debido a que puede generar metástasis (Grimshaw, et al, 1979; Batrnaz, et al, 1995; dusinsky, *et al.*, 2000; Radostits, 2002; de la Sota, 2004).
- ✱ En terneros usualmente se presenta en animales menores de 6 meses de edad; consiste en una tumoración generalizada y simétrica de los linfonodos externos e internos, donde se observa una infiltración de células tumorales linfoides en el hígado, bazo y medula ósea (Grimshaw et al., 1979; Batrnaz et al., 1995; Dusinsky *et al.*, 2000; Radostits, 2002; de la Sota, 2004).

## 2.5 Mecanismos inmunitarios

La respuesta inmune humoral es de relevancia en la detección de la infección por el VLEB. Sin embargo, la infección afecta principalmente a los linfocitos B provocando una disminución en la capacidad de respuesta hacia otros agentes secundarios. Es conocido desde hace tiempo que el VLEB induce modificaciones en las inmunoglobulinas, principalmente la IgM; afectando así sus niveles séricos, su estructura y su función biológica. Los animales infectados con la fase de LP, tienen un aumento en de IgM como de IgG, después de la infección el intervalo de aparición de estas es de 14 semanas, siendo esta una respuesta humoral contra la p24 y gp51 del VLEB (Levkut *et al.*, 1995, Dimmock *et al.*, 1991, Radostits, 2001).

Además en las infecciones por retrovirus se ha descrito alteraciones y cambios en los niveles de citocinas (**TABLA 2**), así el VLEB produce una proliferación de linfocitos B, mediados por la sobreexpresión de citocinas promotoras del crecimiento y la progresión de las distintas etapas de la infección. De esta manera en la infección se activan las citocinas y sus promotores responsables del crecimiento de linfocitos B, también el VLEB puede infectar otro tipo de células como linfocitos T y monocitos, de tal forma que la activación de estas células, incrementando el número de citocinas implicadas en la patogenicidad (**TABLA 3**) (Pyeon, 1996; Richar, 1989; Yacobson et al, 1998).

Las citocinas son polipéptidos activos biológicamente que pueden controlar el crecimiento y diferenciación de linfocitos T y B. Experimentalmente se ha establecido una correlación directamente proporcional entre la Linfocitosis Persistente (LP) y la producción de interferón gama (INF $\gamma$ ) y otras citocinas. La infección modifica la síntesis de las citocinas producidas por los linfocitos T, por ejemplo Inter leucina 2 (IL2), origina la expansión de los linfocitos B, por lo que un estudio demostró un incremento de 10 veces más la producción de IL2 en animales infectados en la fase de LEB y LP, esto a partir de cuatro semanas post-infección Se ha demostrado que cantidades tan pequeñas como de 0.001 ml de sangre pueden contener suficientes linfocitos infectados como para transmitir la enfermedad (Yakobson *et al.*, 2000).

**TABLA 2: ALTERACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS Y SUS CONSECUENCIAS**

CITOCINAS	ALTERACIÓN EN LA INFECCIÓN POR VLEB	CONSECUENCIAS
IL-1	Incremento por la secreción de monocitos	Incremento en la proliferación de LT Y LB.
IL-2	Secreción incrementada al comienzo de la infección, que va disminuyendo según progresa la infección, con valores normales en animales con tumores	Desconocida.
IL-6	Incremento en LP	Disminución en la secreción de antígenos virales, posible contribución a la latencia.
	Invariable	
IL-10	Incremento durante la evolución de la enfermedad	Correlación con los estadios avanzados de la infección y tumores.
	Invariable	
TNF	Incremento de la producción por monocitos	Estimula la producción de LT, LB.
	Incremento de la producción de linfocitos (LP)	Latencia <i>in vivo</i> por disminución en la producción de antígenos vírales.
	Invariable	
IFN $\gamma$	Indetectable en el suero	No asociado a la infección pero puede ser por una disminución de los LT durante LP.
	Disminución durante LP	
	Secreción por monocitos incrementada	

IL: Inter leucina, TNF: Factor de Necrosis Tumoral, IFN: Interferon, LB: Linfocitos B, LT: Linfocitos T, LP: Linfocitosis Persistente. (Reyes, 2003)

**TABLA 3: NIVELES DE CITOCINAS EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA LEUCOSIS BOVINA**

	IL-1	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IFN	TNF+
VLEB-/LP-	+	+	+	+	+	+	+
VLEB+/LP-	++	++++	-	+	++	-	++
VLEB+/PL+	++	++	-	++	+++	-	++
TUMOR		+	-		++++	-	

VLEB-/LP- animales negativos al virus y a linfocitosis persistente; VLEB+/LP- animales positivos al virus y negativos a linfocitosis persistente; VLEB+/PL+ animales positivos al virus y con linfocitosis persistente; TUMOR animales con neoplasias; (-) Negativo; (+) Positivo; (++) Moderadamente positivo; (+++) Fuertemente positivo; (IL) Citocina; (IFN) Interferon; (TNF) Factor de necrosis tumoral. (Doménech, 1994)

## 2.6 Epidemiología

La prevalencia de la LEB en el ganado bovino es menor en animales de menos de 24 meses de edad, y esta prevalencia aumenta cuando se busca una mejora en la producción en el ganado, ya que las novillas se incluye al hato y entran en estrecho contacto con vacas de mayor edad infectadas con el VLEB. Cuando una población en el hato está infectada sin desarrollar el cuadro clínico o neoplásico, se dice que esto depende del perfil genético y que existe una relación compleja entre el perfil genético y la producción láctea (Mirshy *et al.*, 1998; Zanotti *et al.*, 1998; Van Eijk *et al.*, 1998).

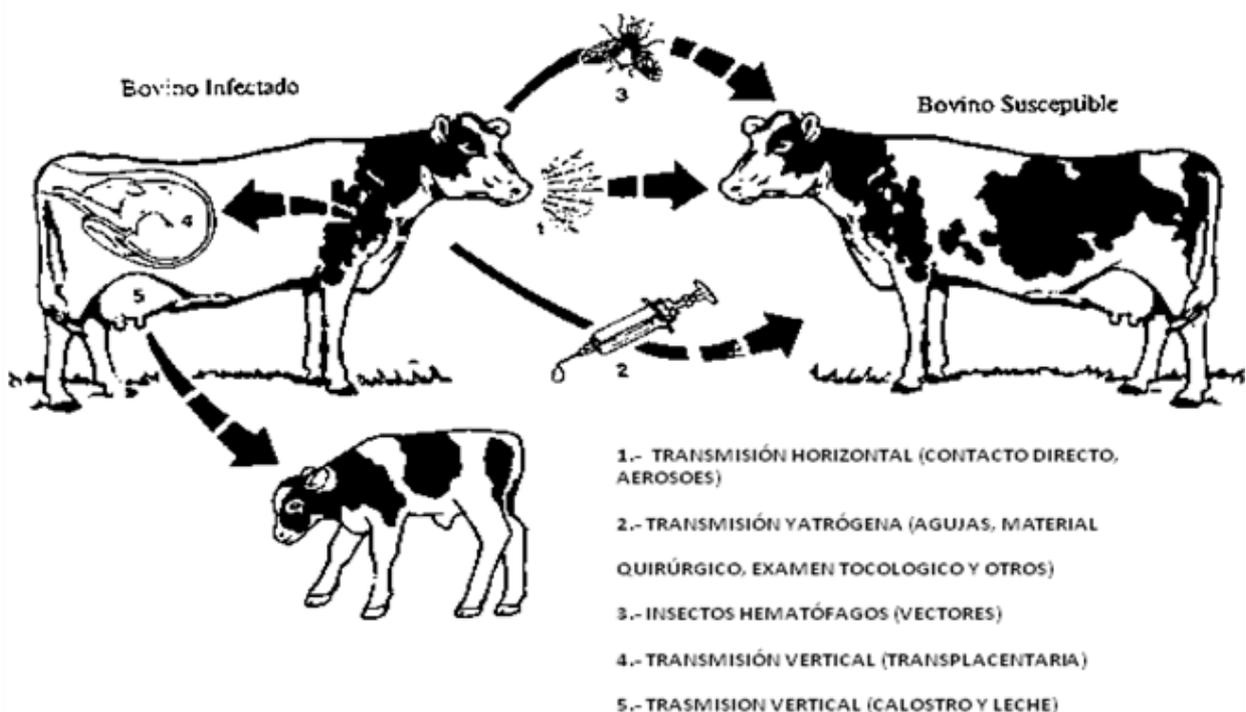
El polimorfismo en el gen **BoLA DRB 3.2** se ha relacionado a la resistencia o susceptibilidad al desarrollo de LP y linfosarcoma inducido por el VLEB. También se ha comunicado la identificación de un motivo designado **ER** que está presente en los alelos 11, 23 y 28 asociado con resistencia a LP en bovinos infectados con VLEB. La resistencia parece depender de la presencia de los aminoácidos polares (Xu *et al.*, 1993; Mirshy *et al.*, 1998; Zanotti *et al.*, 1998; Van Eijk *et al.*, 1998).

Además se ha demostrado una correlación muy significativa entre la infección por el VLEB y la persistencia de infecciones bacteriana y micóticas, debido a una aparente inmunosupresión, además de su correlación con una baja en la producción y reproducción (Radostits, 2001).

## 2.7 Formas de transmisión

La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo mediante la transferencia de células infectadas de animales portadores y/o enfermos hacia animales sanos, existen dos vías: horizontal y vertical; la forma horizontal es mediante sangre, insectos hematófagos (tábanos) que actúan como vehículos, inseminación artificial y la vía iatrogénica, que se considera la principal forma de transmisión. Entre la madre y el becerro mediante la leche y calostro, por el contrario, no se ha confirmado si existe realmente transmisión natural de antígenos virales o ADN proviral transplacentario del VLEB (**FIGURA 3**) (Dimmock *et al.*, 1991; Meas *et al.*, 2002, Mateos, 2003, Motton, 2005; Dus Santos *et al.*, 2007).

**FIGURA 3: Mecanismos de transmisión de leucosis bovina**



## 2.8 Diagnóstico

El diagnóstico de los animales con Linfosarcoma es relativamente fácil para los veterinarios clínicos, pero el diagnóstico de los animales con Linfocitosis Persistente y de aquellos infectados asintomático, se requiere de pruebas de laboratorio. Las pruebas utilizadas son tanto de detección de anticuerpos (IDGA y ELISA) o detección del virus por PCR.

El diagnóstico se basa en:

- a) Diagnóstico clínico
- b) Pruebas de laboratorio
  - Hematológico (Conteo infocitario)
  - Prueba de Inmunodifusión en agar gel (IDAG)
  - Prueba de ELISA (indirecta)
  - Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
  - Prueba de aislamiento viral (Cultivo celular)

La Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) recomienda para identificar el VLEB diferentes pruebas, como: aislamiento del virus, PCR anidada, pruebas serológicas como IDAG y ELISA (Pruebas oficiales de la OIE, 2009).

### 2.8.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se basa en el desarrollo de un examen general acompañado de la auscultación, ya que esto nos permite saber en que condición está el animal, si existe incremento en el tamaño de los linfonodos superficiales a lo largo del tronco. También pueden palparse por las paredes recto-vaginales, la uretra, la vejiga, el riñón y el útero (Hernández *et al.*, 2006).

A la necropsia podemos llegar a observar lesiones en diferentes órganos, o sentir el incremento de tamaño de los linfonodos más superficiales, se observa hipertrofia de linfonodos seccionados que presentan aspecto homogéneo, compacto, blanquecino y ligeramente edematoso (Hernández *et al.*, 2006).

## 2.8.2 Pruebas de laboratorio

### 2.8.2.1 Hematológico

La asociación de la LP con el desarrollo de casos de linfosarcoma, dió lugar a postular que ambos cuadros se debían al mismo agente patógeno y fue la base para establecer las claves hematológicas, esta hipótesis fue formulada por Bendixen (1964) y confirmada por Miller y Cois en 1969. Las alteraciones en el hematocrito del animal por la LEB se observan principalmente en los linfocitos, por lo tanto, el examen consiste en la evaluación cuantitativa y cualitativa de los linfocitos y células mononucleares. Los siguientes cambios son típicos para los animales en la fase subclínica de leucosis: (Batmaz *et al.*, 1995; Chamizo, 2005).

- Aumento en el número de linfocitos (Linfocitosis)
- Presencia de células con características neoplásicas patológicas de los tipos mononucleares, de un tamaño aproximado de 18- 20  $\mu$ , de forma irregular, de citoplasma grande, tamaño y forma del núcleo variable y nucléolos bien diferenciados (anisocariósis) (Gibbons, 1984).

Los hallazgos hematológicos de animales con LP, se observa un recuento de por lo menos 3 desviaciones anormales por encima del recuento normal durante tres meses. En la LP es indispensable saber identificar el número total de linfocitos por  $\text{mm}^3$ . Esto se puede realizar calculando el número total de leucocitos y el porcentaje de linfocitos existentes de manera normal. Goetze en 1953 en Alemania y Bendixen en 1957, propusieron usar parámetros (Bendixen) para clasificar a los bovinos, basándose en la edad y el número absoluto de linfocitos/ $\text{mm}^3$  (**TABLA 4**) (Rosemberg, 1994).

**TABLA 4: PARÁMETROS DE BENDIXEN**

Edad en años	Recuento absoluto de linfocitos /mm <sup>3</sup>		
	Normal	Sospechoso	Positivo
0-1	< 10 000	10 000-12 000	> 12 000
1-2	< 9 000	9 000-11 000	>11 000
2-3	< 7 500	7 500-9 500	>9 500
3-4	<6 500	6 500-8 500	>8 500
4	<5 000	5 000-7 000	>7 000

(Reyes, 2003)

### 2.8.2.2 Prueba de Inmunodifusión en agar gel (IDAG)

La técnica de inmunodifusión en agar aplicada en forma masiva en las poblaciones de ganado, ayuda a detectar los animales infectados por el VLEB, aunque con estudios complementarios se puede confirmar el diagnóstico mediante aislamiento del agente etiológico, concentrando así los esfuerzos del diagnóstico en los animales detectados previamente por serología (Barajas, reporte)

La infección por el VLEB estimula una fuerte reacción inmune humoral en contra de las principales proteínas virales p24 y gp51, la IDAG tiene una sensibilidad del 69.8% y una especificidad del 67.4%. Independientemente del método serológico empleado, la principal desventaja de éstas pruebas, es su incapacidad para discriminar anticuerpos maternos pasivos de una infección activa, lo que puede persistir durante los primeros 6 meses de vida del animal (Felmer 2006; In Lim *et al.*, 2009)

### 2.8.2.3 Prueba de ELISA (indirecta)

La prueba de ELISA se basa e el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tenga actividad tanto inmunológica como enzimática. (Protocolo de Técnicas, 2006 [www.cultek.com](http://www.cultek.com))

La técnica de ELISA ha sido adoptada como técnica rutinaria en el diagnóstico de la enfermedad. La ventaja de ésta, es que comercialmente se encuentran “kits” disponibles para su empleo, es muy sensible, sencilla, tiene la capacidad de detectar y cuantificar anticuerpos contra el VLEB (ELISA directa). La infección por VLEB estimula

una fuerte reacción inmune humoral en contra de las principales proteínas virales p24 gp51 y constituye una base para la detección de la enfermedad mediante pruebas serológicas (Felmer *et al.*, 2006).

Existe el inconveniente de detectar animales falsos positivos, o falsos negativos, por lo que se recomienda la utilización de dos pruebas paralelas. Existe un estudio que sugiere la utilización de 3 a 48 sueros a evaluar los cuales son mezclados y utilizados como uno solo (pool), lo cual disminuye costos en la técnica y la sensibilidad no se ve afectada, ya que se estima una efectividad de un 88.9 a 99%. (Levkut *et al.*, 1995, Horigan *et al.*, 2009).

La base del éxito en la realización de la técnica de diagnóstico se encuentra en la calidad del antígeno, la calidad de los sueros testigos positivos y negativos a utilizar, independientemente de la certeza, confiabilidad y repetitividad de los resultados en los que intervienen el técnico y equipo utilizado. Así mismo, se sugiere que dependiendo del estado en el que se encuentre el animal es la posibilidad de detectar falsos negativos en las pruebas serológicas (Barajas *et al.*, Levkut *et al.*, 1995, Horigan *et al.*, 2009).

#### **2.8.2.4 Aislamiento viral (Cultivo celular)**

Mucho de los avances en el ámbito de la virología es consecuencia de la habilidad de los virus para crecer en cultivos celulares *in vitro*. Dado que los virus requieren células vivas para replicarse. Esta técnica nos permite replicar el virus lo cual nos sirve para diagnosticar y demostrar la presencia del mismo, así como también para producir antígeno. La mayoría de los virus pueden crecer en líneas celulares, tal es el caso del virus de la leucosis bovina, para el cual se han desafiado diversas líneas celulares (**TABLA 5**) (Coll 1993).

**TABLA 5: Células Susceptibles a la infección del Virus de la Leucosis Bovina (VLEB)**

<b>Línea Celular</b>	<b>Autor</b>
TbILu (pulmón murciélago)	Donald <i>et al.</i> , 1976
DBS (pulmón de feto Rhesus)	Donald <i>et al.</i> , 1976
FLS (Bazo de feto de cordero)	Donald <i>et al.</i> , 1976
PTOO (bazo chimpancé)	Donald <i>et al.</i> , 1976
FLK (riñón de feto de cordero)	Donald <i>et al.</i> , 1976
NBC-13 linfocitos-B neoplásicos.	Lee Jhon, 2005, McClure <i>et al.</i> , 1974
NBC-10 linfocitos-B neoplásicos.	Gutierrez, 2009, McClure <i>et al.</i> , 1976

### **2.8.2.5 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La OIE ha descrito la utilización de la PCR para detectar el genoma del VLEB, esta técnica es exclusiva para aquellos laboratorios que dispongan de servicios de biología molecular. A pesar de esto y su costo, la técnica permite detectar la presencia de fragmentos génicos del VLEB con la ayuda de oligonucleótidos o cebadores (**TABLA 6**). (Du Santos 2007; OIE, 2009)

La PCR anidada se recomienda utilizar en la detección de la infección del VLEB de forma individual tomando en cuenta las siguientes circunstancias:

- Terneros jóvenes con anticuerpos del calostro.
- Casos de tumor, para diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso.
- Tejido tumoral de casos sospechosos recogidos en mataderos.
- Nuevas infecciones, antes del desarrollo de anticuerpos contra el VLEB.
- Casos de resultados débilmente positivos o inciertos en pruebas de tipo ELISA.
- Análisis sistemático del ganado en centros de prueba de reproducción (antes de la introducción en centros de inseminación artificial).

La prueba de PCR no es práctica para su utilización a nivel de hato, pero puede emplearse como un complemento para la serología como prueba confirmatoria (OIE, 2009).

**TABLA 6: Algunas secuencias de oligonucleótidos para PCR utilizadas en el diagnóstico del VLEB.**

SECUENCIA	REGIÓN	DETECCIÓN	AUTOR
Fw GAA AGC CTT CAA ATG CCT AA Rv ACA TTA ATG CCA GTG AGC CC	<i>Env</i>	Virus en Semen	Du Santos, 2007
Fw TTTGTGCATGACCTACGAGCTACA Rv AAGCGGTCTTCGACTGGAATCT	<i>Pol</i>	Virus en Semen	Du Santos, 2007
Fw AACACTACGACTTGCAATCC Rv GGTTCCCTTAGGACTCCGTCG	<i>Gag</i>	Virus en Semen	Du Santos, 2007
Fw TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA Rv AACAAACCTCTGGGGAGGGT Fw CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT Rv GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTG G	<i>Env</i>	PCR (anidada) Virus en Leche y sangre	Felmer, 2006
Fw CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT Rv GCGCGGCCGGGTCCAGAGCTGG	<i>Env</i>	Virus en sangre, bovinos infectados experimentalmente	Naif <i>et al.</i> ,
Fw CCC CGT GTG GGT TCC CTG GCG RV CAA ACC GGC GCC GCC CTT GTG	<i>Env</i>	Provirus en sangre, evaluación de PCR, IDAG,	Eaves <i>et al.</i> , 1994
FW AGG CGC TCT CCT GGC TAC TG RV GGC ACC AGG CAT CGA TGG TG	<i>Tax</i>	Provirus en sangre	Tajima <i>et al.</i> , 2005
FW CTG GCC AAG GTC ATC CAT GAC Rv CCT CCGACGCCT GCTCA CCA C	<i>Rex</i>	Provirus en sangre	Tajima <i>et al.</i> , 2005
FW CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA Rv CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC Fw CTGTAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGC RvGACAGAGGGAACCCAGTCACTGTTCAACTG	<i>Env</i>	Provirus en sangre, Diagnóstico	Oie, 2009
Fw TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA Fw CCAACAAGGGCGGCGCCGGTTT Rv TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA Rv CCAACAAGGGCGGCGCCGGTTT	<i>Env</i>	Provirus en sangre	Beier <i>et al.</i> , 2004, Sagata, 1985

## 2.9 Prevención y control

Pese a que ha habido algunos éxitos experimentales, no existe ninguna vacuna para prevenir la infección por el VLEB de la cual se disponga comercialmente. En muchos países, incluso Argentina, los programas de control convencionales se basan en la detección de los animales infectados y eliminación de los mismos. En consecuencia, no existe una conveniente relación costo/beneficio en hatos de alta prevalencia para aplicar programas de control convencionales. El Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) promulgó en el año 1994 en la Resolución 337/94 la propuesta de un plan voluntario de saneamiento. Este plan implica el examen serológico de todos los animales de más de 6 meses de edad (Ferraro, 2008).

La LEB se puede erradicar de un hato e incluso de un país o mantenerse controlada a un nivel bajo de la siguiente manera:

- ✦ Detección y sacrificio de animales infectados.
- ✦ Mantenimiento de hatos cerrados, solo permitir la entrada a animales libres del VLEB.
- ✦ Monitoreo del ganado cada 60 días utilizando pruebas serológicas.
- ✦ Monitoreo de las becerros jóvenes para reemplazo, mediante pruebas más específicas como PCR y RT-PCR.
- ✦ Evitar comprar semen y/o embriones que provenga de animales enfermos con VLEB.
- ✦ Evitar introducir animales nuevos y/o importarlos, o pedir el certificado de libre de la infección de LEB.
- ✦ Evitar reciclar materiales desechables como agujas, guantes etc. así como procurar la desinfección del material quirúrgico o instrumental de mantenimiento, como son: tijeras, tatuadoras, perforadoras, etc.
- ✦ Control de vectores.

(Reginald et al., 1985; Radostits et al., 2001; Hernández et al., 2006, Acaite, et al., 2007)

### 3. JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito que células de origen bovino, canino, ovino, caprino, simio, humano y murciélago pueden ser infectadas *in vitro* por el virus de la leucosis enzoótica bovina (VLEB) cuando éstas células son co-cultivadas con células infectadas con VLEB muestran la presencia del antígeno viral en su interior así como la formación de sincitios.

Sin embargo, las células como TblLu de pulmón de murciélago (ATCC) han mostrado una replicación abundante del VLEB, mientras que, en células FCf 2 Th de timo de canino (NBRL), DBS-FRhl-1 de pulmón de mono Rhesus y S-743 de ovario caprino, la replicación ha sido moderada. Se estableció un estudio para determinar la permeabilidad a la infección del VLEB en las células de MSFC. Las cuales están disponibles sólo en nuestro laboratorio, obviando la necesidad de importación y las cuales han sido evaluadas y utilizadas particularmente para la replicación y obtención de otros retrovirus de pequeños rumiantes con muy buenos resultados.

Por otro lado, en la literatura nacional no existen reportes sobre diagnóstico de VLEB utilizando la técnica del aislamiento viral en las células de MSFC, siendo éste el primer reporte.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Comprobar si las células de membrana sinovial de feto caprino (MSFC) son permisibles a la infección por el VLB, realizando co-cultivos con las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de bovinos seropositivos y seronegativos al virus.

### **4.2 Objetivos particulares**

1. Determinar las cantidades de CMSP y de células de MSFC para realizar co-cultivos celulares.
2. Realizar la infección y detectar si el VLEB produce células gigantes multinucleadas (sincitios) y determinar el tiempo que tardan en formarse.
3. Detectar la presencia del virus y pro-virus de la leucosis bovina en las células de MSFC infectadas, por medio de pruebas complementarias como la Inmunocitoquímica y PCR.

## **5. HIPÓTESIS**

Si las células S-743 de ovario caprino han mostrado una replicación moderada del VLEB cuando han sido co-cultivadas con células infectadas con dicho virus y además se ha detectado la presencia del antígeno viral en su interior formado sincitios; entonces de la misma manera, el VLEB replicará, formará sincitios y se encontrará en el interior las células de MSFC una vez que hayan sido co-cultivadas con CMSP proveniente de animales serológicamente positivos.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo se realizó en colaboración con el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), Hidalgo, en el laboratorio de Inmuno-Virología del Hospital de pediatría del Centro Medico Nacional (CMN) Siglo XXI y en el Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES-Cuautitlán.

### **6.1 Cultivo de células de MSFC**

En este estudio, se llevaron a cabo cultivos de células de MSFC para determinar la susceptibilidad de éstas a la infección del VLEB, las cuales fueron donadas por el laboratorio de Inmuno-Virología del Hospital de pediatría del CMN Siglo XXI.

Las células de MSFC fueron propagadas utilizando medio mínimo esencial Glasgow suplementado con 2mM L-Glutamina, 1% piruvatos, 1% de una solución de antibióticos/antimicótico (10 000 U de penicilina, 10 000 µg de estreptomina y 25 µg de anfotericina por ml) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Se establecieron botellas de 75 cm<sup>2</sup>, en cada caja se colocaron 1,000,000 de células de MSFC, las cuales fueron contadas previa tinción con azul tripan en cámara de Neubauer y con este número de células se obtuvo una confluencia del 70% al 80% en 48 hrs, con lo que se estableció el número de CMSF que se utilizarían para los co-cultivos.

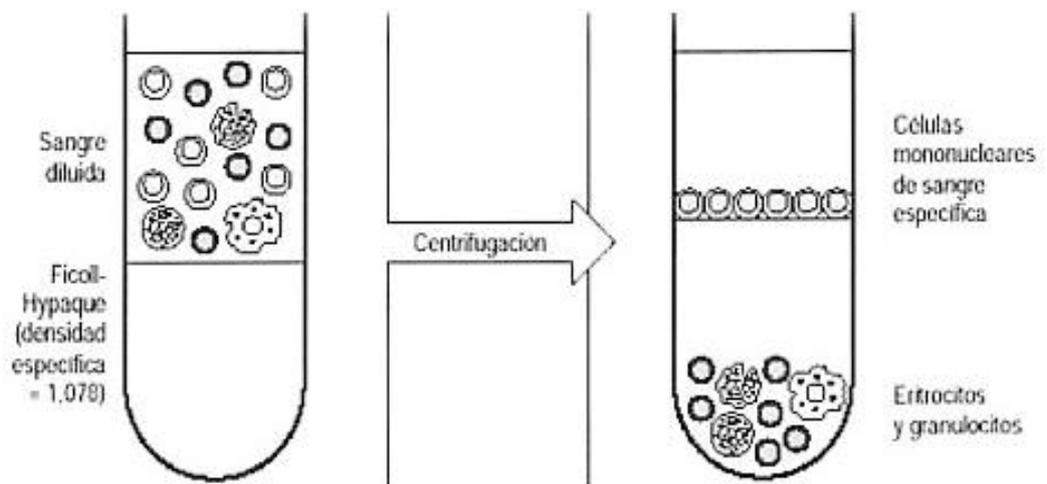
### **6.2 Animales de experimentación**

El estudio se realizó con 11 bovinos hembras positivas y 1 negativa al VLEB que fueron previamente evaluadas por las pruebas de ELISA y PCR (Zavaleta, 2009). A partir de cada uno de estos animales se aislaron las CMSP obtenidas de sangre por veni-punción aséptica de la vena coccígea media con un sistema de vacío (Vacutainer<sup>®</sup>) con anticoagulante (EDTA). Las muestras de sangre (8 mL) fueron remitidas al Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular de la FES-Cuautitlán campo 4 para su procesamiento y separación de CMSP mediante una técnica denominada Buffycoat.

### 6.3 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

La separación de CMSP fue mediante centrifugación a 2,500 rpm por 15min, obteniendo así la capa blanca, de la cual se utilizó aproximadamente 500  $\mu$ l y se diluyó en PBS 1x (0.01M) a una proporción de 1:1; posteriormente se transfirió a un gradiente de densidad Ficoll/Histopaque® con densidad de  $1.077 \pm 0.001$  (HISTOPAQUE™-1077; 5.7g/dl de polímero de sacarosa [Ficoll-400], y diatrizoato de sodio 3-5 bis acetilamino -2, 4, 6 ácido triyodobenzóico; SIGMA®; Saint Louis, Missouri USA) y fue centrifugada a 2,500 rpm durante 30min, en seguida se recuperaron las CMSP y se transfirieron a un vial con 1000  $\mu$ l de PBS 1x (0.01M) para realizar los lavados, centrifugando a 2,500rpm por 10min repitiendo 3 veces este procedimiento. El número de células a utilizar fue ajustado con medio Glasgow y finalmente se contaron con la cámara de Neubauer para determinar su viabilidad y número de células por ml (Crespo, 2000, Gorodezky 2008).

**Figura 4. Separación de células mononucleares a partir de sangre periférica utilizando un gradiente de densidad en medio líquido.**



Fuente: Laboratorios Sigma

## 6.4 Co-cultivos

A partir de las 11 muestras de bovinos positivos y 1 negativa al VLEB seropositivo se ocupó un total de 1,462,500 CMSP viables y suspendidas en medio Glasgow, para los co-cultivos con células de MSFC con una confluencia de entre 60-70% en cajas de cultivo tipo falcon de 75 cm<sup>3</sup> y posteriormente se incubaron 24 hrs a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente el medio fue retirado de la monocapa celular y se realizaron 2 lavados con PBS 1x (0.01M), para así finalmente mantener los co-cultivos con medio Glasgow al 5% de SFB.

Los co-cultivos fueron monitoreados diariamente durante 20 días o hasta que se observó un 50 % de lisis celular. El sobrenadante se clarificó a 2500 rpm por 15 min y se guardó a -20°C. Las células del cultivo se desprendieron por acción mecánica y se suspendieron en 1 ml de medio Glasgow, las cuales fueron utilizadas en las técnicas descritas posteriormente.

## 6.6 Detección del VLEB por inmunocitoquímica

La mitad de las células obtenidas de los co-cultivos, se utilizaron para realizar la técnica de inmunocitoquímica, fijándolas con acetona en portaobjetos y realizando los siguientes pasos:

- ✦ Hidratación de laminillas con TBS 5 min.
- ✦ Peróxido de hidrogeno al 3% 30 min. a temperatura ambiente.
- ✦ Tres lavados con TBS 5 min. cada uno
- ✦ Bloqueo con suero caprino (10%) por 10 min. en cámara húmeda.
- ✦ Tres lavados con TBS 5 min. cada uno
- ✦ Suero control positivo al VLB por 1 hora en cámara húmeda.
- ✦ Tres lavados con TBS 5 min. cada uno
- ✦ Colocar conjugado anti IgG Bovino acoplado a peroxidasa (diluido 1:1000) por 30 min en cámara húmeda.
- ✦ Tres lavados con TBS 5 min. cada uno
- ✦ Colocar DAB de 5 a 10 min.
- ✦ Inactivar con agua corriente
- ✦ Contra teñir con hematoxilina.
- ✦ Montar con resina.

Una resultado fue considerado positivo cuando se observó una coloración marrón en la célula (Coll, 1993).

## 6.7 Extracción de ADN

La extracción de ADN de los co-cultivos de células de MSFC se realizó por medio de un sistema de extracción presurizado (QuickGene-Mini80, Fujifilm LifeScience) siguiendo el instructivo del fabricante.

- ✦ 200µl Muestra
- ✦ 250 µl Buffer de lisis (LDB)
- ✦ 30 µl de solución EDB (proteína K) (EDB)
- ✦ Mezclar en vortex por 15 seg.
- ✦ Incubar a 56°C por 2 min.
- ✦ Centrifugar a 10,000 rpm
- ✦ Agregar 250 µl de Etanol al 99%
- ✦ Mezclar en vortex por 15 seg
- ✦ Centrifugar a 10,000 rpm
- ✦ Trasferir a columnas
- ✦ Lavar 3 veces con 759 µl de solución de lavado.
- ✦ Se colocan las columnas sobre tubos limpios.
- ✦ Colocar el buffer de elución (WDB) para recuperar el ADN.

## 6.7 Cuantificación de ADN

El ADN obtenido de las células co-cultivadas se cuantificó mediante la lectura de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro (Biofotometer, Eppendor, Hamburg, Germany), ajustando así una concentración mínima de ADN (100ng/µL) y conservándolo a -20°C hasta su uso.

## 6.8 Diseño de cebadores

Se diseñó un par de cebadores utilizando el software primer 3 en internet (<http://simgene.com/Primer3>), las secuencias sintetizadas fueron para Pol\_Arg41 fw TCAAAGATGCCTTCTTCCAG y Pol\_Arg41 rv TGAAGAGAAATTGGGGATGA con una longitud de 20 nucleótidos cada uno, perteneciendo al gen *pol* del VLEB, región altamente conservada (Dube *et al.*, 2000).

## 6.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para confirmar la presencia de ADN proviral en células de MSFC se realizó la reacción de PCR en un termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) utilizando los siguientes reactivos:

Master Mix	1 Reacción
✱ Buffer (10x)	2.5 µl
✱ MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1 µl
✱ dNTP'S (25mM)	0.25 µl
✱ Pol_Arg41 sense (600nM)	1.5 µl
✱ Pol_Arg41 antisense (600nM)	1.5 µl
✱ Taq Pol (5U/ µl)	0.5 µl
✱ DNA (100ng/ µl)	10 µl
✱ Agua	7.75 µl
Volumen final	25 µl

La PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones:

1. 94.5°C por 5 min. (desnaturalización)
2. 94.5°C por 30 seg.
3. 58°C por 40 seg. (Alineamiento)
4. 72°C por 50 seg.(Extensión)  
Repetir a partir del segundo paso 44 ciclos.
5. 72°C por 10 min. (Extensión final)

## 6.10 Visualización en geles de agarosa

El producto de amplificación obtenido por PCR, fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio (5µg/ml). Para el corrimiento electroforético se utilizó amortiguador TBE 1X (89mM Tris-Cl, 89mM de Ácido Bórico, 2mM de EDTA, pH 8.0) utilizando 80 volts por 1 hr. Un resultado positivo fue considerado cuando se observó una banda de amplificación de 436 pares de bases (pb), visualizados y fotodocumento en un transiluminador (Apollo, Instrumentation).

## 6.11 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

La purificación de las bandas amplificadas en la PCR se realizó con el Kit de Quiagen. El producto de amplificación específico visualizado con el transiluminador fue cortado y colocándolo en un tubo de microcentrifuga de 1.5µl, para posteriormente seguir las instrucciones del fabricante.

- ✦ Agregar 240µl de solución BQG
- ✦ Incubar 50°C por 10 min.
- ✦ Agregar 80µl isopropanol
- ✦ Pasar la solución al tubo con una matriz del kit.
- ✦ Centrifugar por 1min a 13 000rpm
- ✦ Lavar con 750 µl de amortiguador PE dejando reposar de 2 a 5 min.
- ✦ Centrifugar a 13 000rpm por 1min.
- ✦ Pasar la columna a un tubo de microcentrifuga
- ✦ Agregar amortiguador ED dejar reposar 2 a 5 min.
- ✦ Centrifugar a 13 000rpm

El producto obtenido de la purificación fue reamplificado por PCR obteniendo un banda específica de 436 pb.

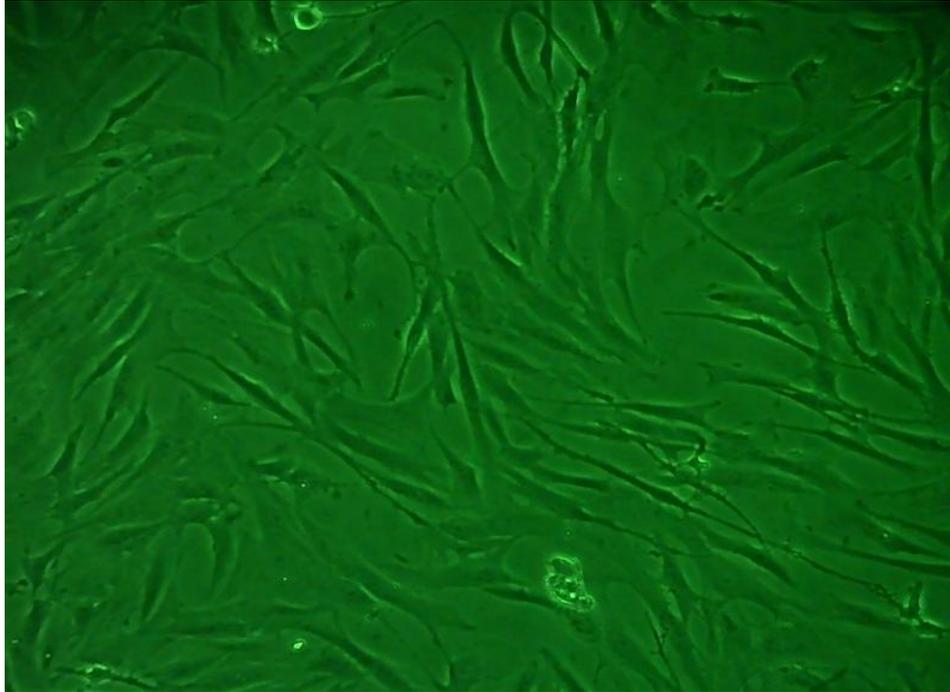
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Co-cultivos

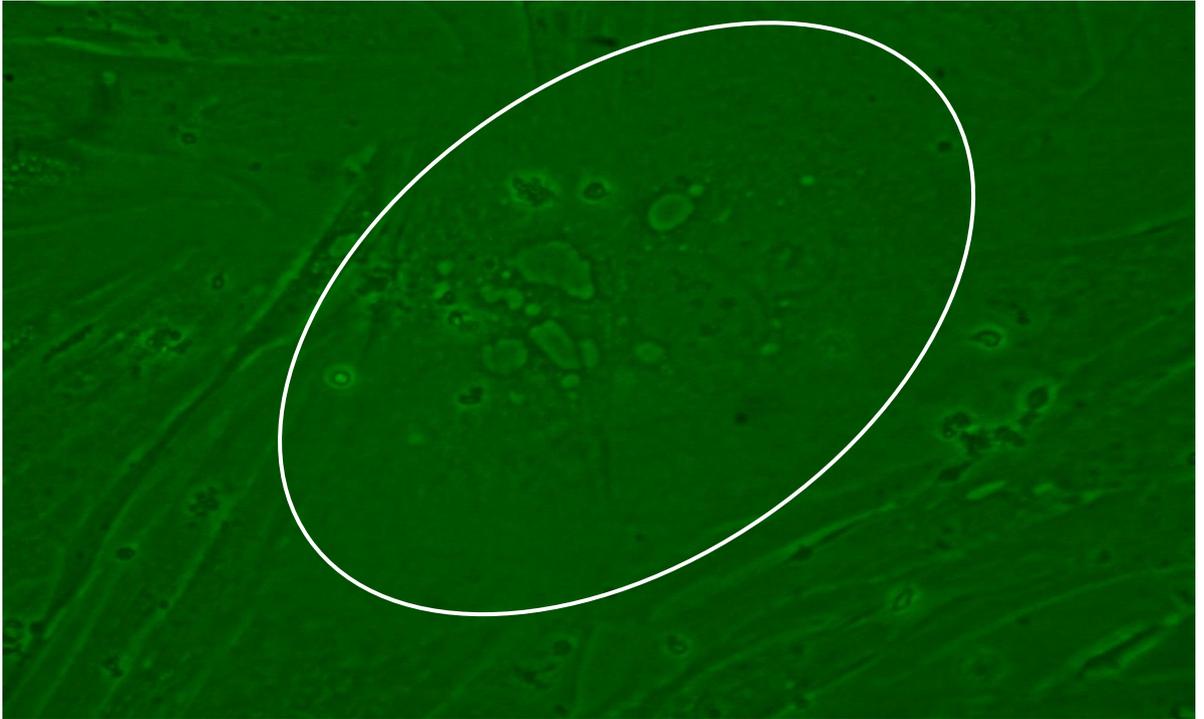
Se obtuvo un adecuado crecimiento de las células de membrana sinovial de feto caprino con las que se realizaron co-cultivos. Determinando que al usar una densidad de 1,000,000 células de MSFC, se observa una confluencia del 70-80% en 48hrs. Así mismo se promedió 1,462,500 de CMSP, el cual fue el mínimo número obtenido de los animales en estudio, pues su rango varió desde 1,462,500 hasta 8,000,000 de CMSP /ml.

Los 12 co-cultivos de células de MSFC y CMSP realizados con las cantidades previamente determinadas se monitorearon diariamente hasta observarse el 50% de lisis celular o hasta los 20 días. Después de 18-24 hrs, los co-cultivos mostraron desde un 15 hasta el 90%.de desprendimiento de la monocapa celular. Los co-cultivos de los animales 117, 164, 258, 264 y 938 mostraron un 80-90% de desprendimiento de la monocapa celular (DMC), mientras que en los de los animales 188, 348, 892, 920, 935 y 949 se observó efecto citopático (células gigantes multinucleadas o sincitios) desde los 8 y hasta los 20 días de haberse llevado a cabo el co-cultivo (**TABLA 7**).

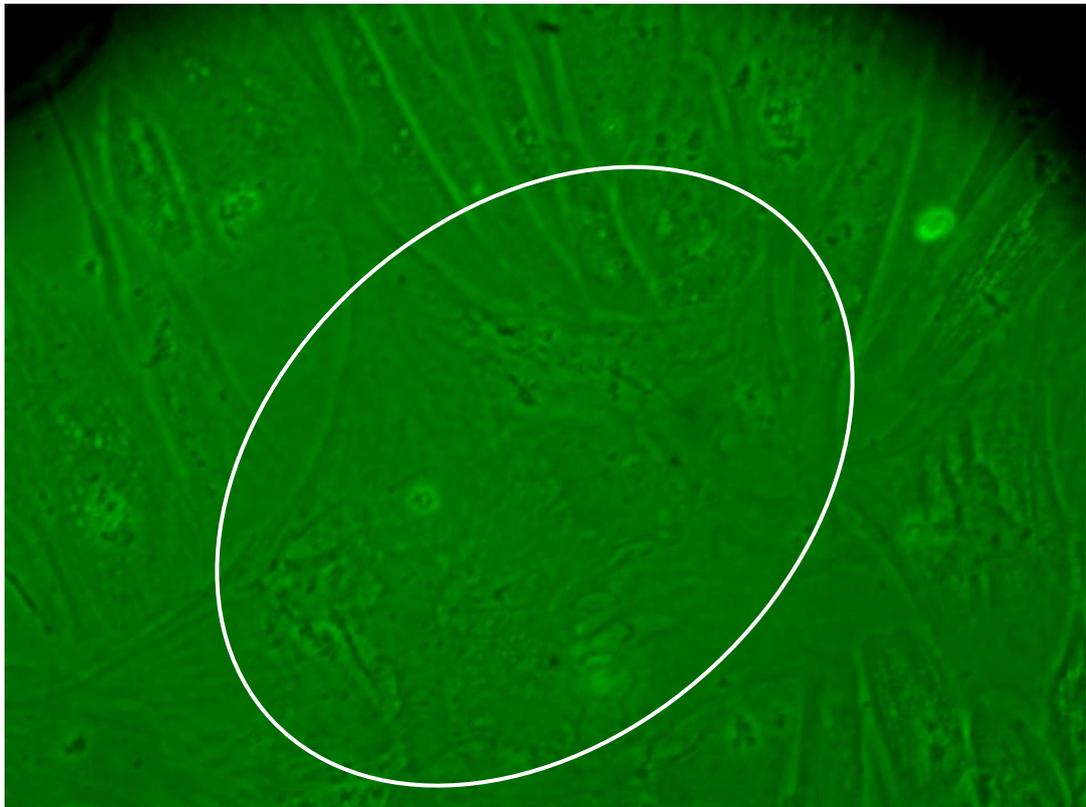
Después de 8 días en el co-cultivo del animal 949 (**FIGURA 6**), 348, 892 (**FIGURA 10**) y 935 (**FIGURA 11**) se observaron células gigantes multinucleadas por campo y en el 188 y 920 dos células gigantes multinucleadas por campo considerándolas así positivas; en algunos casos se evidenciaron núcleos no muy nítidos. A los 15 días el efecto citopático se incrementó, en el co-cultivo de los animales 188 (**FIGURAS 12, 13 y 14**), 949 (**FIGURA 7**) y 892 se encontraron mas de tres, en el 348 (**FIGURA 9**) dos células gigantes multinucleadas por campo. En el día 20 un 67% de los co-cultivos, el de los animales 188, 920, 949 (**FIGURA 12**) y 892 tuvieron mas de tres y el 33% de los animales 348 y 935 dos células gigantes multinucleadas por campo. En los co-cultivos de los animales 188, 949 y 892 se evidenció más rápido y en mayor cantidad el efecto citopático. Estos resultados se encuentran resumidos en el TABLA 7 y se muestran en las figuras 6 a 14 a un aumento de 40X que incluye la del control negativo.



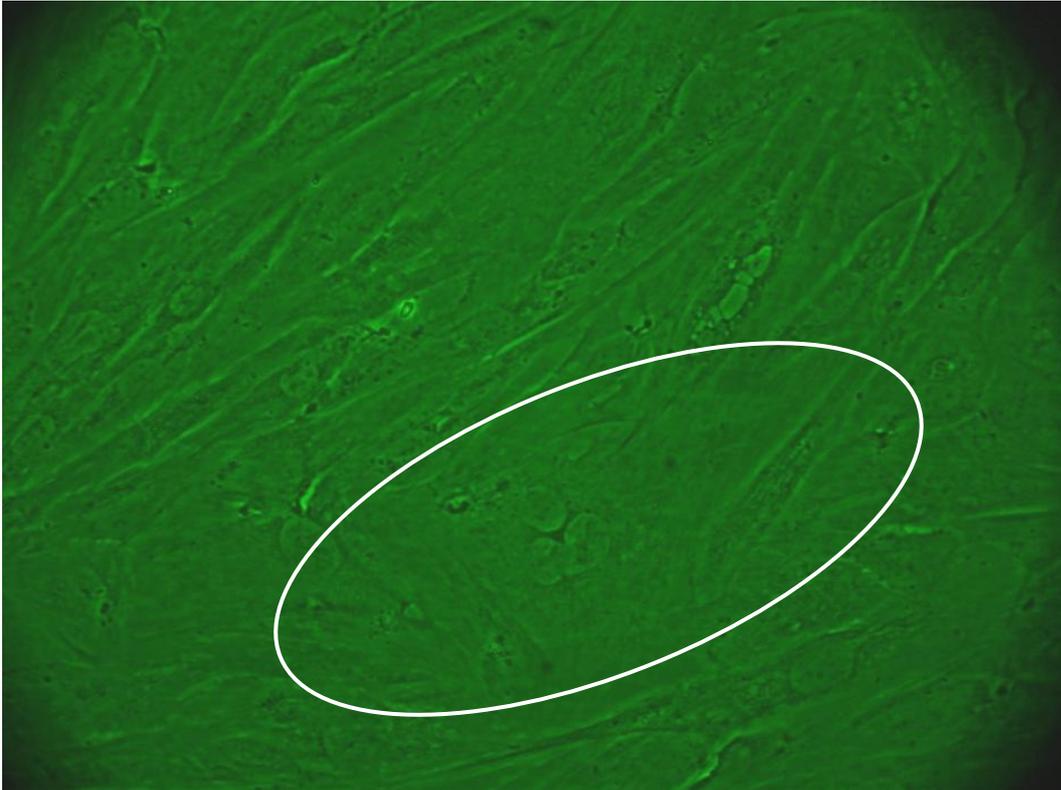
**FIGURA 5. Control Negativo. Células membrana sinovial sin co-cultivar**



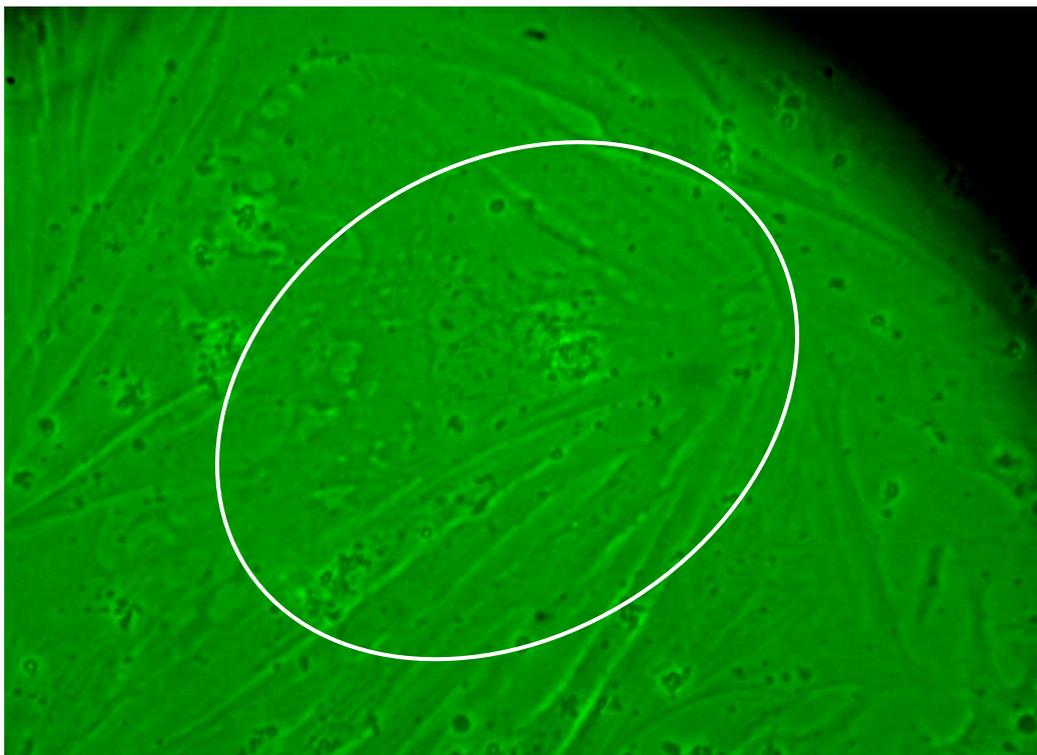
**FIGURA 6: Células gigantes multinucleadas a 8 días post-cocultivo del animal 949. Aumento 40X**



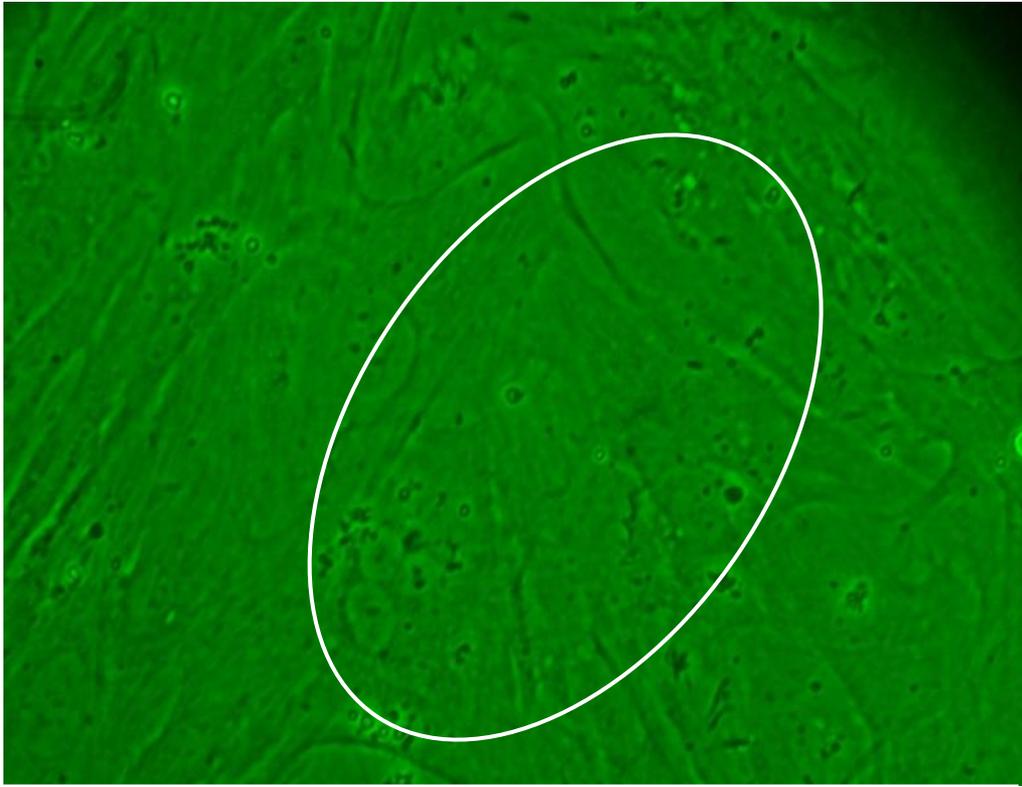
**FIGURA 7: Células gigantes multinucleadas a 15 días post-cocultivo del animal 949. Aumento 40X**



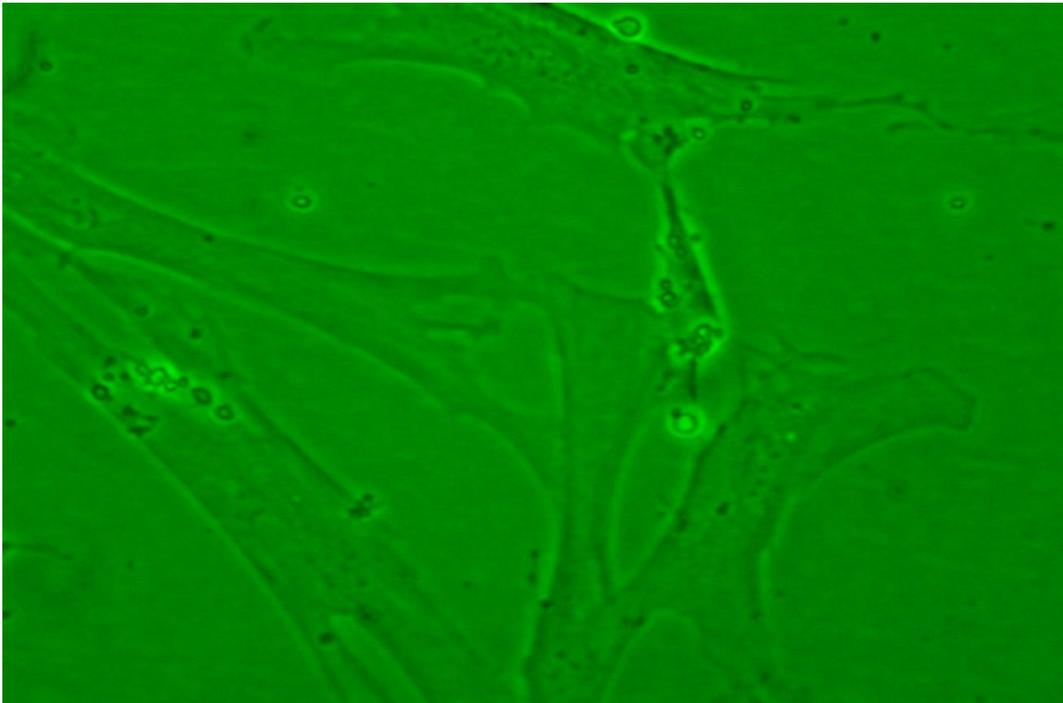
**FIGURA 8: Células gigantes multinucleadas a 20 días post-cocultivo del animal 949. Aumento 40X**



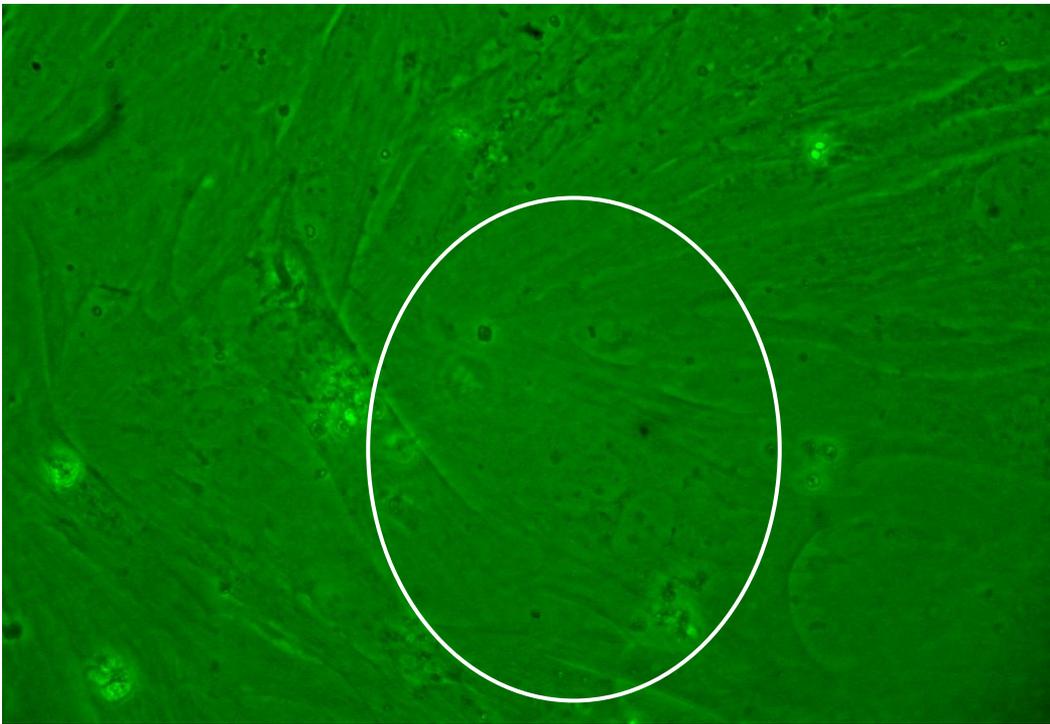
**FIGURA 9: Células gigantes multinucleadas a 15 días post-cocultivo del animal 348. Aumento 40X**



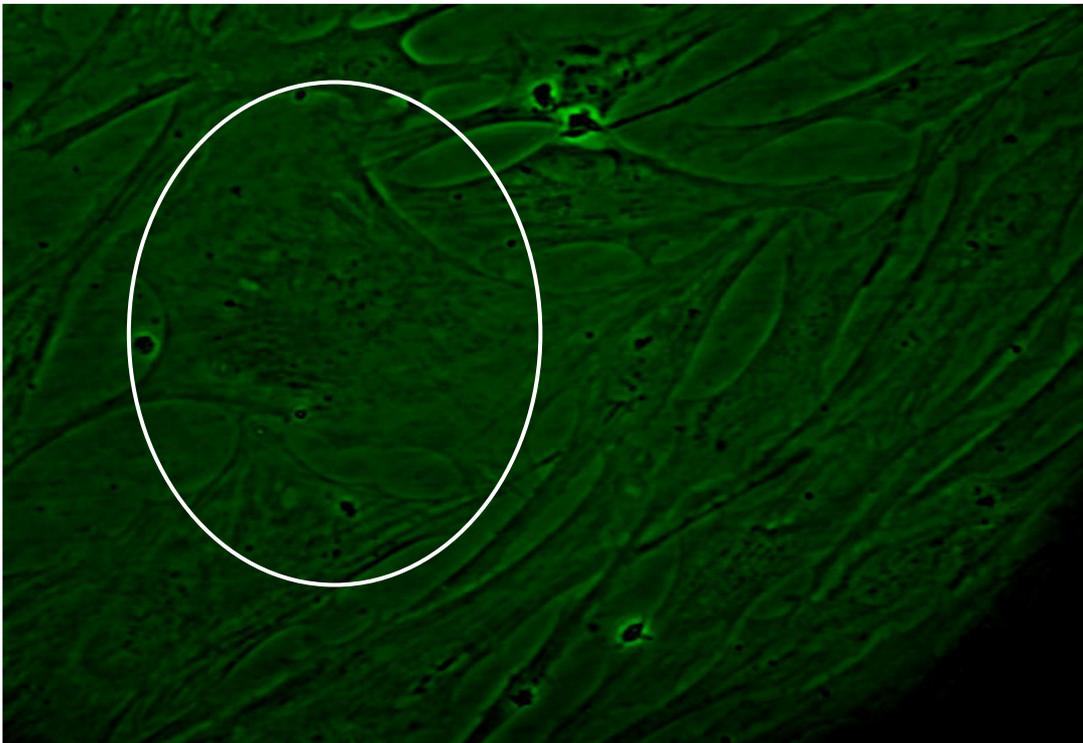
**FIGURA 10: Células gigantes multinucleadas a 8 días post-cocultivo del animal 892. Aumento 40X**



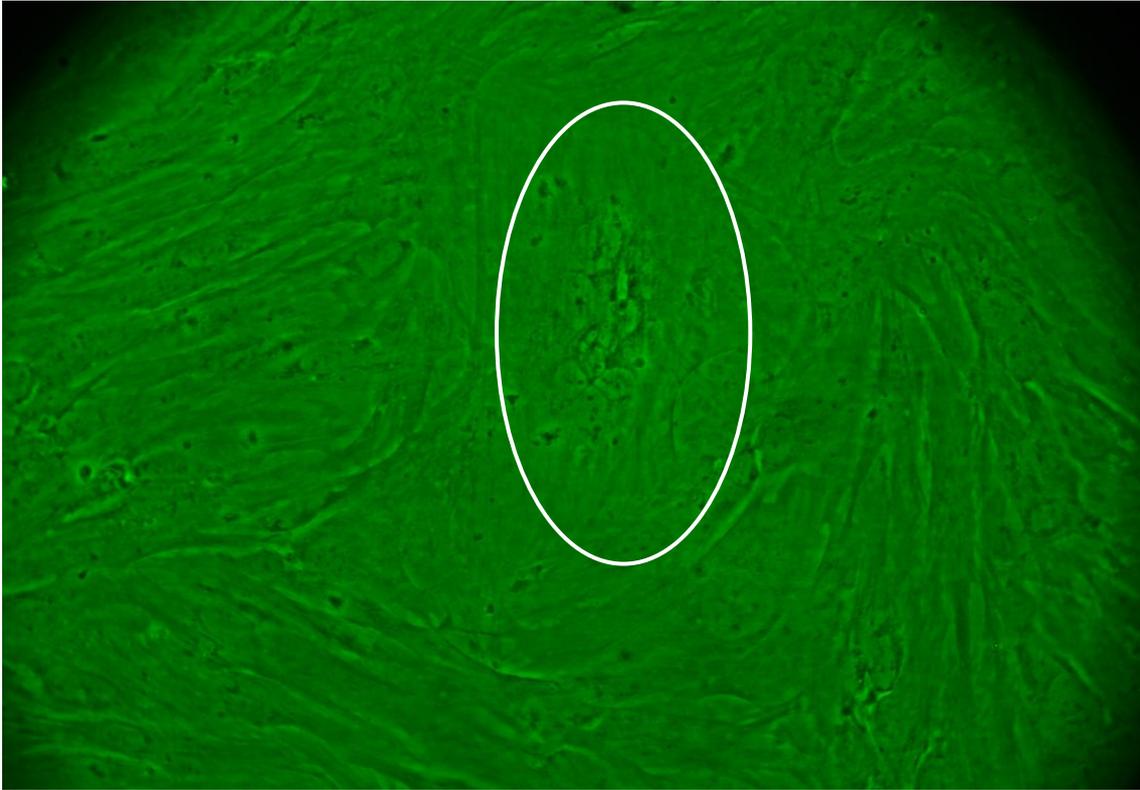
**FIGURA 11: Célula multinucleada a 8 días post-cocultivo del animal 935. Aumento 40X**



**FIGURA 12: Células gigantes multinucleadas a 15 días post-cocultivo del animal 188. Aumento 40X**



**FIGURA 13: Células gigantes multinucleadas a 15 días post-cocultivo del animal 188. Aumento 40X**



**FIGURA 14: Células gigantes multinucleadas a 15 días post-cocultivo del animal 188. Aumento 40X**

**TABLA 7: Aparición de Sincitios en células de MSFC después de varios días de co-cultivadas con CMSP de 12 animales seropositivos a LEB.**

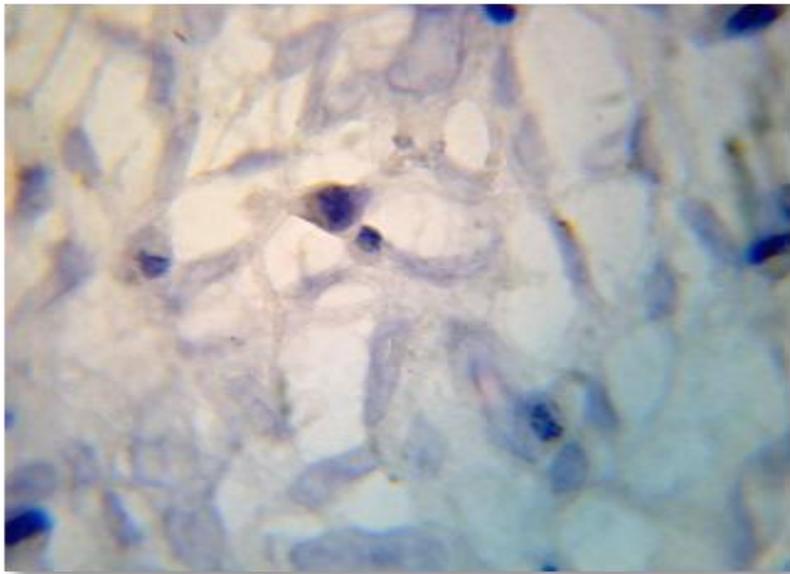
<b>Nº del animal</b>	<b>8 Días</b>	<b>15Días</b>	<b>20 Días</b>
<b>188</b>	**	***	***
<b>920</b>	**	*	***
<b>949</b>	*	***	***
<b>348</b>	*	**	**
<b>892</b>	*	***	***
<b>935</b>	*	*	**
<b>192 CN</b>	-	-	-
<b>CN</b>	-	-	-
<b>117</b>	DMC	DMC	DMC
<b>164</b>	DMC	DMC	DMC
<b>258</b>	DMC	DMC	DMC
<b>264</b>	DMC	DMC	DMC
<b>93</b>	DMC	DMC	DMC

SC: Sin Sincitios, \* 1-2 Sincitios por campo, \*\* 2-3 Sincitios por campo, \*\*\* +3 Sincitios por campo, - negativo, DMC Desprendimiento de la Monocapa Celular, CN: control negativo.

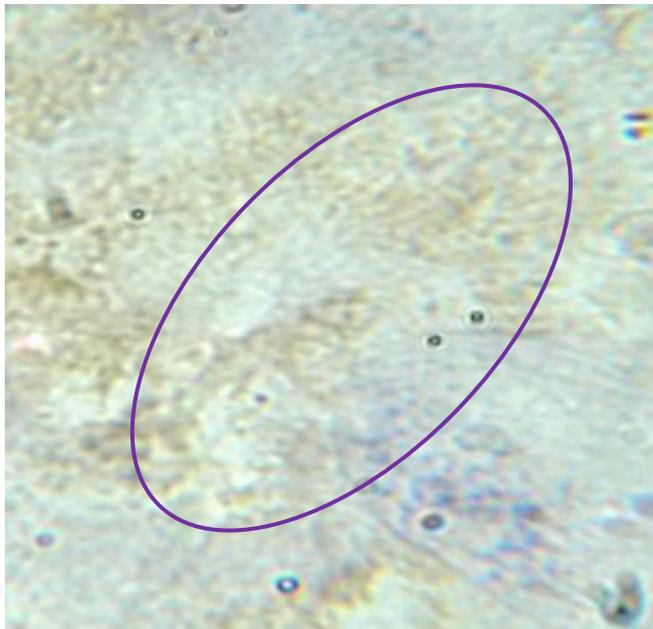
## 7.2 Inmunocitoquímicas

Los estudios inmunocitoquímicos de las células de MSFC co-cultivadas con CMSP se realizaron solo donde se observaron células gigantes multinucleadas (sincitios) desde los 8 y hasta los 20 días, demostrando marcaje en el 100% de las muestras probadas (188,892,920 y 949), y solo el animal 188 presentó una fuerte positividad al ser comparada con el control negativo. Esto nos indica la presencia de antígeno del virus de Leucosis Bovina en estas células.

(FIGURA 16) (FIGURA 15).



**FIGURA 15:**  
Inmunocitoquímica  
CN-MSFC Aumento 100X

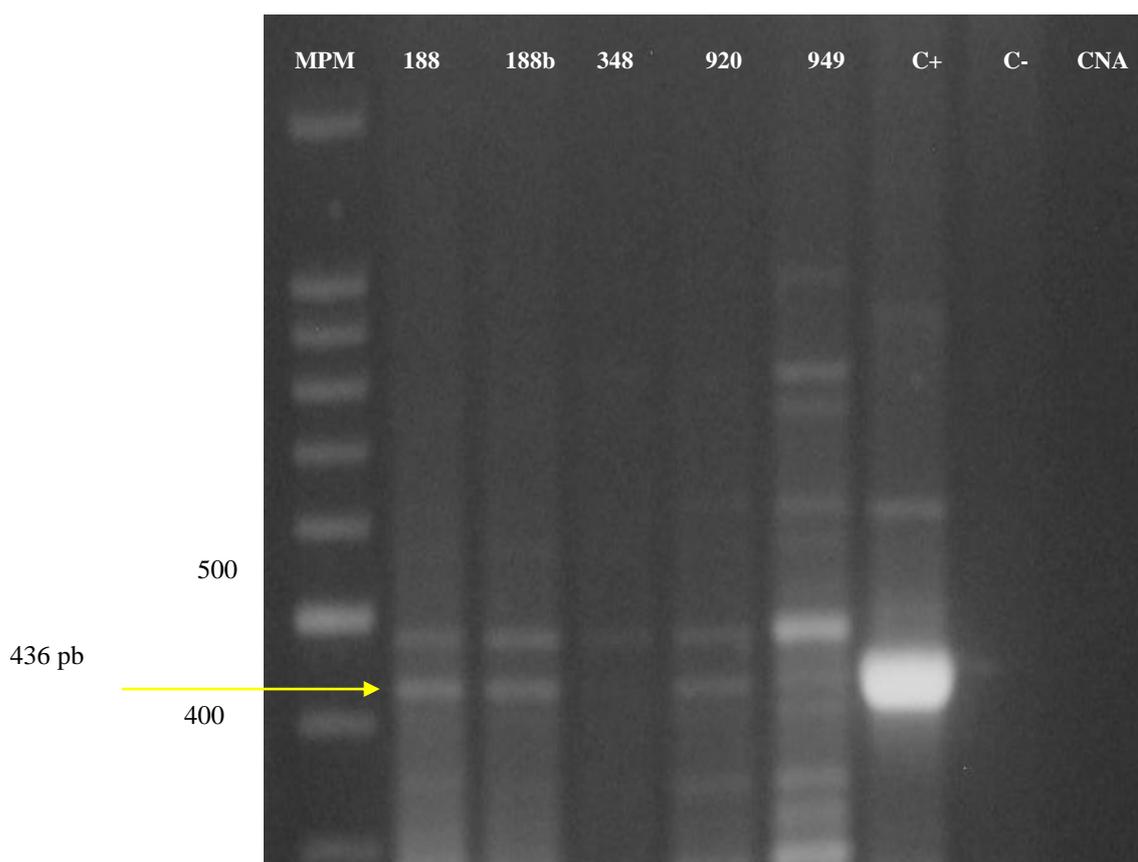


**FIGURA 16:**  
Inmunocitoquímica de la muestra 188,  
donde se observa un crecimiento de  
cúmulo café en el co-cultivo de  
células de MSFC.  
Aumento 100X

### 7.3 Prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los resultados de la técnica de PCR a los co-cultivos de los animales 188, 892, 920 y 949, donde en 4 de 5 se observaron células gigantes multinucleadas (sincitios) desde los 8 a los 20 días, revelaron la presencia del provirus de la LEB en un 75% de las muestras. La banda del fragmento amplificado fue de 436 pares de bases (pb), (FIGURA 17).

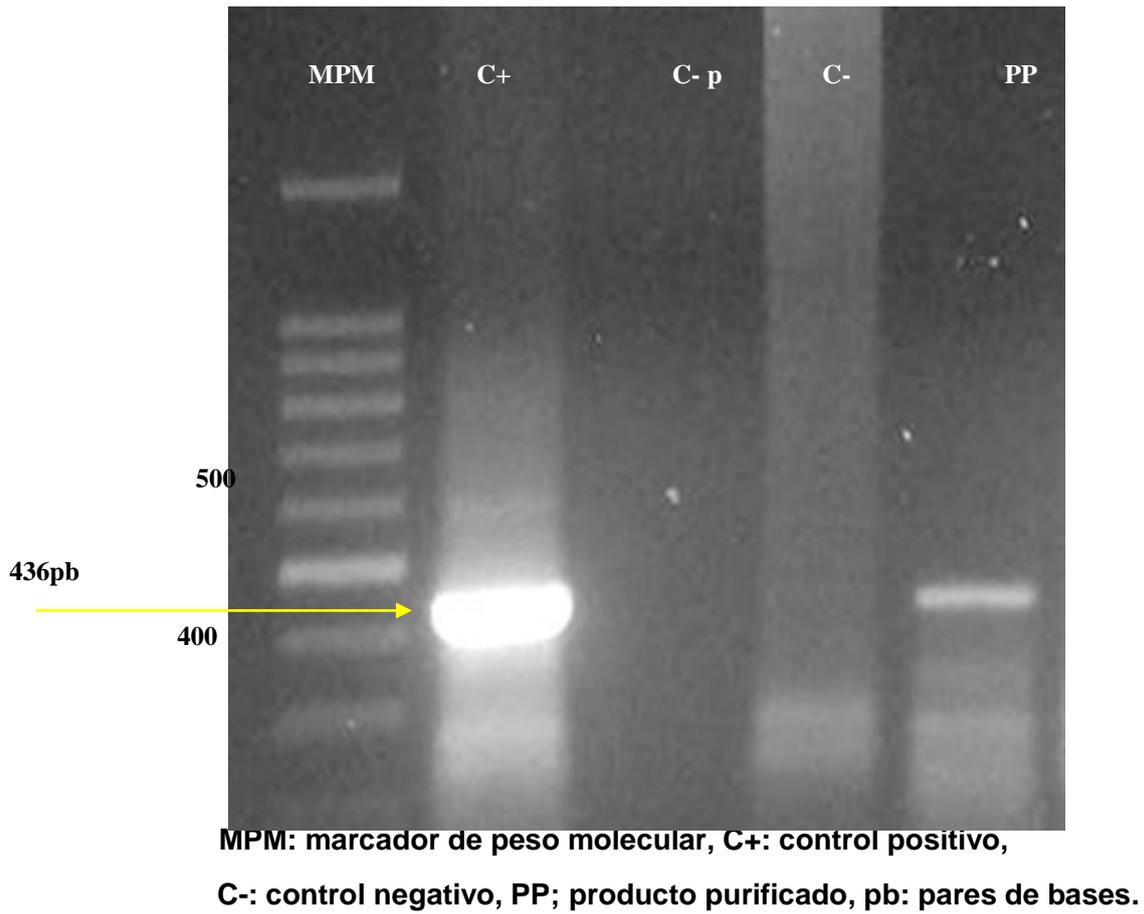
**FIGURA 17: Productos de amplificación por PCR del gen *pol* del VLEB**



**MPM: marcador de peso molecular, C+: control positivo C-: Control negativo CNA: control negativo de la amplificación, pb: pares de bases.**

Los productos de PCR 436 pb que se purificaron y amplificaron nuevamente se muestran en la FIGURA 18.

**FIGURA 18: Productos de amplificación de los productos purificados.**



Se logró detectar la presencia del fragmento génico del VLEB en las células de MSFC de los co-cultivos de cada una de las muestras, por medio de pruebas Inmunocitoquímica (4/12) y PCR. (3/12)

**TABLA 8: Resumen de los resultados obtenidos en las técnicas utilizadas.**

<b>Nº de Muestra</b>	<b>Sincitios</b>	<b>IC</b>	<b>PCR</b>
188	***	+	+
348	*	DMC	-
892	***	+	-
920	**	+	+
935	**	DMC	-
949	***	+	+
192 CN	-	-	-
CN	-	-	-
117	DMC	DMC	-
164	DMC	DMC	-
258	DMC	-	-
264	DMC	DMC	-
938	DMC	DMC	-

SC: Sin Sincitios, \* 1-2 Sincitios por campo, \*\* 2-3 Sincitios por campo, \*\*\* +3 Sincitios por campo, DMC Desprendimiento de la Monocapa Celular; IC:Inmunocitoquímica + Positivo, - Negativo; PCR: + Positivo, - Negativo

## 8. Discusión

Las MSFC son de crecimiento lento y se pueden mantener por tiempo prolongado sin mucho manejo; en este estudio, el crecimiento de células alcanzaron una confluencia del 80% a las 72 hrs, en comparación con el estudio de Ramírez y Martínez (1998) donde reportaron la utilización de células de MSFC obtenidas de rastro, describieron una confluencia del 100% a los 8 días, lo cual indica que las células de MSFC utilizadas en este trabajo están bien adaptadas al crecimiento *in vitro*. La obtención de las CMSP se mejoró al modificar la técnica de Gorodesky (2008), la cual consistió en utilizar menor cantidad de reactivo y mayor número de CMSP después de una centrifugación previa de la sangre a 2500rpm, lo que permitió concentrar una mayor cantidad de leucocitos en menos volumen.

En la actualidad se utilizan células homólogas de pulmón de feto de bovino (FBL) para la replicación del VLEB. También se ha descrito el uso de la línea celular denominada FLK (Riñón de Feto de Cordero) para la replicación del VLEB (Van deMaater, *et al* 1974). Otros estudios descritos por McClure (1974) y Donald (1974) describen la permeabilidad celular de células de pulmón de murciélago. Las células de MSFC tienen un metabolismo bajo y por lo tanto un ritmo de crecimiento lento lo cual permite retardar los pases celulares (7-14 días), a diferencia de otras células que se multiplican rápidamente y es necesario un mayor manejo. Los co-cultivos del VLEB durante 20 días permitieron mostrar la resistencia de las células a periodos prolongados de tiempo, lo que puede justificar la utilización de las mismas para la producción de antígeno, además de observar la replicación del virus por efecto citopático en el 100% de las células que permanecieron con la monocapa celular. El uso de células heterólogas (línea celular de murciélago TBILu) como las descritas por Donald (1974), soportan la infección por el VLEB así como seguida de la línea celular derivada de caninos (FCf Th), chimpancé (PT001 Sp), cabras (s-734), las cuales reportan efecto citopático a partir de la cuarta semana post-infección. En comparación, en el presente trabajo se observaron sincitios en la segunda semana post-infección, encontrando este resultado en 6 de las muestras probadas, viendo así un incremento de sincitios conforme trascurrían los días hasta llegar a la tercera semana post-infección. Por otro lado, en este estudio el tipo de células utilizadas fueron fibroblásticas, células más resistentes y de bajo metabolismo por lo que requieren

menos manejo, a diferencia de Donald y/o McClure quienes utilizaron células de órganos parenquimatosos (Donald *et al.*, 1974; McClure *et al.*, 1974; Lee *et al.*, 2004; Ramírez 1998; Gutiérrez 2009).

La técnica inmunocitoquímica ha sido utilizada para detectar proteínas virales de retrovirus en diferentes tejidos como lo reportan Reinacher (1989) y Patrick (1994); por lo cual, en este estudio se utilizó con el fin de corroborar la presencia de antígeno viral del VLEB en las células de MSFC co-cultivadas con células mononucleares, ya que muchas veces no es posible encontrar efecto citopático (Coll,1993). Existen pocos estudios relacionados a la detección del provirus del VLEB en cultivos celulares y menos aún por técnicas inmunocitoquímicas, ya que no es una técnica rutinaria de diagnóstico dado el tiempo y costo de la misma. Esta metodología es más utilizada en cortes histológicos de órganos afectados por dicho virus. En este trabajo se confirmó la presencia del antígeno viral en las células de MSFC. Por otro lado, Inabe (1998) utilizó inmunofluorescencia para la detección del virus en diferentes líneas celulares. Ramírez (1998) en el mismo año, utilizó la tinción de Giemsa para evidenciar mejor la presencia del efecto citopático, con resultados muy discutibles.

El aislamiento de virus en líneas celulares para el diagnóstico es una técnica tardada y costosa, técnicas mas rápidas han sido desarrolladas mediante PCR, Wester-blot lo que permite detectar la presencia del proteínas virales, sin embargo, el cultivo celular sigue siendo el estándar de oro.

Beiera *et al.*, 2004 detectó el genoma viral del VLEB en líneas celulares co-cultivadas con CMSP de bovinos infectados mediante PCR anidada, utilizando dos pares de oligonucleótidos (cebadores). En el presente estudio se utilizaron MSFC co-cultivadas con CMSP de bovinos infectados, se diseñaron primers y se realizó PCR obteniendo una amplificación de 436 pares de bases de una región del gen *pol* del VLEB y en el cual se obtuvo PCR positivos en tres de las trece muestras evaluadas.

## 9. Conclusiones

- Se estableció el número necesario de células de MSFC y CMSP para la realización de los co-cultivos
- Se confirmó la presencia viral en cultivo de MSFC por inmunocitoquímica
- Se amplificó un fragmento del gen *pol* por PCR a partir de ADN proviral obtenido de los co-cultivos.
- En el presente trabajo, se comprobó la susceptibilidad de las MSFC a la infección del VLEB

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Freshney RI; **Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique**; Ed. Wiley-liss 1991; 2: 107-120
2. **Diagnostico viral**; Diagnóstico Viroológico, Cátedra de Microbiología, parasitología e inmunología Facultad de Medicina-UNNE[web en línea] [con accesos el 24-03-11]  
[www.catmicromed.ecaths.com/.../Diagnostico%20virologico.pdf](http://www.catmicromed.ecaths.com/.../Diagnostico%20virologico.pdf) – Argentina
3. **Curso de cultivo de tejidos, propagación de células In vitro**; INDRE; (apuntes) 1998
4. **Manual de introducción a los cultivos celulares**; Universidad de los Andes (ULA) – Venezuela. [web en línea] [con accesos el 25-03-11]  
[www.webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/Biologia\\_General/cultivos\\_celulares.pdf](http://www.webdelprofesor.ula.ve/ciencias/chataing/Cursos/Biologia_General/cultivos_celulares.pdf)
5. Wu D., Murakamia K., Morookaa A., Jin H., Inoshima Y, Sentsui H; **In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus**; Virus Res. 2003; 97:81–87.
6. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar A B, Defoiche J, Burny B, Reichert M, Kettmann R, Willems L; **Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human**; Retrovirol. 2007; 16; 4:18.
7. Gutiérrez S, Ceriani C , Juliarena M , Ferrer J F. **Host soluble factors that regulate the synthesis of the major core protein of the bovine leukemia virus (BLV) in a naturally infected neoplastic B-cell line**; Vet. Immunol. mmunopathol. 2009; 131(3-4):246–258.
8. Tsutsui T, Kobayashi S, Hayama Y, Nishiguchi A, Kameyama K, Konishi M, Murakami K; **Estimation of the within-herd transmission parameter of bovine leukemia virus**; Prev. Vet. Med. 95, 2010; 158–162
9. Miller JM and Van Der Maaten MJ, **Bovine Leukosis, Its Importance to the Dairy Industry in the United States**, J Dairy Sci. 1982; 65(11):2194-203.
10. Monroy BJI, Trigo TFJ, Aluja AS, García ERM; **Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina**; Vet. Méx. 1993; 24:1.
11. Dube S, Dolcini G, Abbott L, Mehta S, Dube D, Gutierrez S, Ceriani C, Esteban E, Ferrer J., Poiesz B, **The Complete Genomic Sequence of a BLV Strain from a Holstein Cow from Argentina**; Virol. J. 2000; 277(2):379-86.
12. Radostits OM, Gay C C, Blood D C, Hinchcliff KW. **Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino**. Medicina Veterinaria. 1. 9ª edición, ed. Ed. Mc Graw Hill. 2002; 1239 – 1254
13. Monti G.E., Frankena K., De Jong C. M; **Transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds by simulation modeling**; Epidemiol. Infect. 2007; 135:722–732.
14. Felmer R, Zúñiga1 J, Recabal1 M; **Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche**; Arch. Med. Vet. 2006; 38: 2
15. Dus Santos JM, Trono K., Lager I., Wigdorovitz A; **Development of a PCR to Diagnose BLV Genome in Frozen Semen Samples**; Vet Micro 2007; 119:10–18.

16. Sordillo L. and Erskine R., **Bovine Leukosis Virus Update II: Impact on Immunity and Disease Resistance**, Michi. Dairy Rev. January 2010
17. Van der Maaten MJ; Whetstone CA; Khramtsov VV; Miller JM; **Experimentally-induced infections with bovine immunodeficiency-like virus, a bovine lentivirus**. Virol. Cattle Res. 1990; 72:91-5.
18. Murfy A. F. et al, **Veterinary Virology**, ed. An imprint of Elsevier, third edition, 1999
19. Kabeya **Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection**; J. Vet. Med. I Sci. 2001; 63(7):703-8.
20. International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) 2009  
[www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)
21. Dube S, Abbott L, Dube D, Dolcini G, Gutiérrez S, Ceriani C, Juliarena M, Ferrer J, Perzova R, Poiesz B; **The Complete Genomic Sequence of an in vivo Low Replicating BLV strain**; Virol. J. 2009; 6:120
22. Rebhun WC, **Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero**, 1ª edición, ed. Acribia, España, 1999
23. Van Regenmortel V, Fauquet CM, Carstens E, Ester M, Lemon S, Maniloff J, Mayo M, McGeoch DPC, Wickner R, **Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Virus**, Academic Press 2000; 369-380
24. González E T., Valera R J N A., Travería G, Oliva G A, Etcheverrigaray M E; **A rapid and sensitive diagnosis of bovine leukaemia virus infection using the nested shuttle polymerase chain reaction**; Pesq. Vet. Bras. 1999; 19(2):63-67.
25. Nagy DW, Tyler JW, Kleiboeker SB, Stoker A, **Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle**, J Am Vet Med Assoc., 2003; 222(7):983-5.
26. Ridge, S.E., Galvi JW, **A comparison of two ELISAs for the detection of antibodies to bovine leucosis virus in bulk-milk**, Aust Vet J 2005; 83:1751-0813.
27. González ET, Oliva GA, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray; **leucosis enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (id, elisa-i, wb, pcr) en bovinos inoculados experimentalmente**; Ana. Vet. 2001; 21(2): 12-20.
28. Coffin J M, Hughes SH, Varmus HE, **Retroviruses**, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=rv>
29. Mohanty SB, Dutta SK, **Virología Veterinaria** 1ª edición ed. Interamericana, México, 1981; 353-358.
30. Onuma M, Hanma T, Mikami T, Ichijo, Konishi T, **Studies on the sporadic and enzootic formas of leukosis**, J Comp Pathol, 89: 159-167, 1979
31. Grimshaw WT, Wiseman A, Petri L, Selman IE, **Bovine Leucosis (Lymphosarcoma): a clyncal study of 60 pathologically confirmed case**, Vet Rec. 1979; 105:267-72
32. Bratmaz H, Carli KT, Kahreman M, Centin C, Kennerman E; **Serological and hematological giagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey**; Vet Rec. 1995; 136: 42-44.
33. Dusinsky R, Bardotti M, Ponti W, **Decreased expression of L-Selectin on Lymphocytes in enzootic bovine leukaemia**, J Vet. Med. B. 2000; 47:127-132.
34. De la Sota MD, **Manual de Procedimientos, Leuosis Enzoótica Bovina**, Marzo 2004, Dirección Nacional de Sanidad Animal, **SENASA**, Buenos Aires.  
[www.senasa.gov.ar/sanidad/pdf/09\\_leuco.pdf](http://www.senasa.gov.ar/sanidad/pdf/09_leuco.pdf)
35. Pyeon D, 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(8):5706-10.
36. Richar E.W. Inmunología Clínica Veterinaria Ed. Acribia 1989; 468-475.

37. Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z, **Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis**, Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2008; 23(3):197-208.
38. Levkut M, Ponti W, Soligo D, Quirici N, Rocchi M, Lambertenghi Delilieri G; **Expression and quantification of IgG and IgM molecules on the surface of lymphocytes of cattle infected with bovine leukaemia virus.** Res Vet Sci. 1995; 59(1):45-9.
39. Dimmock CK, Rogers RJ, Chung YS, McKenzie AR, Waugh PD, **Differences in the lymphoproliferative response of cattle and sheep to bovine leukosis virus infection.** Vet. Immunol. Immunopathol. 1991; 11:325-331.
40. Reyes SD, Martínez RHA, **Recopilación bibliográfica y elaboración de un CD-RUM sobre Leucosis Bovina** (Tesis de Licenciatura) edo. Méx. (FES-C UNAM), 2003
41. Domenech A, Viviana M. Lucia Gómez. **Nuevas aportaciones al conocimiento de la patogenia del virus de la leucosis bovina Enzoótica** Ed. Med. vet. 1994; 19:16-19.
42. Mirsky M.L., Olmstead C., Da Y. & Lewin H.A. **Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle.** Animal Genetics 1998; 29:245-52.
43. Zanotti, M. Poli, G. Ponti, W. Polli, M. Rocchi, M. Bolzani, E. Longeri, M. Russo, S. Lewin, H.A. & van Eijk, M.J.T. **Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukemia virus infection in Holstein-Friesian cattle.** Animal Genetics 1996; 27:337-41.
44. Van Eijk M.J.T., Stewart-Haynes J.A. & Lewin H.A. **Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP.** Animal Genetics 1992; 23:483-96.
45. Xu A, van Eijk M.J.T., Park Ch. & Lewin H.A. **Polymorphism in BoLA-DRB3 Exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus.** J. Immunol. 1993; 151:6977-85.
46. Lechler R. **HLA and disease.** Academic Press, San Diego 1994; 93-113.
47. Meas S, Usui T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M; **Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds;** Vet. Microbiol. 2002; 84:275–282
48. Mateos P. A. **Memorias de 1as Jornadas Bovinas.** Noviembre 24 y 25; México, D.F. DUADec. FMVZ. UNAM 2005; 129-133.
49. Motton DD, Buehring G C. **Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells;** J. Dairy Sci. 2003; 86:2826-2838.
50. OIE 2009 Nueva lista de enfermedades de la OIE y Sistema Internacional de Notificación de Enfermedades; OIE 2009
51. Hernandez BRJ, Mar CRA, Zavaleta HJN, Barrientos PR, Leyva GVH, Fausto RE; **Leucosis Enzoótica Bovina;** Revista de Ciencia, Biodiversidad y Tecnología Agropecuaria (AGROPECUS), 2006 1, 5.
52. Chamizo EG, **Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET)**, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana 2005; 7  
[www.veterinaria.org/revista/redvet](http://www.veterinaria.org/revista/redvet)
53. Gibbons WJ, **Medicina y Cirugía de los bovinos**, ed. La prensa mexicana, México, 1984; 559-571.
54. Rosenber. Exploración clínica de los bovinos; Ed. Mundial 1994; 173-179.
55. Barajas RJA, **Epidemiología del virus de Leucosis bovina en el ganado en el estado de Veracruz México**, Cien. Vet. 1998; 8
56. Protocolo de Técnicas de la prueba de ELISA  
[www.cultek.com](http://www.cultek.com) (consultado el 25-08-2010)

57. Seong In Lim, Wooseog Jeong, Dong Seob Tark, Dong Kun Yang, Chang Hee Kweon; **Agar gel immunodiffusion analysis using baculovirus-expressed recombinant bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51/gp30T-)**; *J. Vet. Sci.* 2009; 4:331-336.
58. Knapen K, Kerkhofs P, Thiry E, Mammerickx M; **Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting antibodies against bovine leukaemia virus in serum pools**; *Epidemiol Infect.* 1994; 113(3):563-9.
59. Horigan MW, Pollard TR, Bell MM; **Modification of a Bovine Leukaemia Virus (BLV) serum ELISA for screening pool sample**; World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 14 International Symposium, Madrid, Spain, 17-20.
60. Coll JM. **Técnicas de diagnóstico en virología**. España Madrid: ed. Díaz de Santos: 1993; 65-80.
61. Van deMaaten, M. J., Miller, J. M. and Boothe, A. D. **Replicating Type C Virus Particles in Monolayer Cell Cultures of Tissues from Cattle with Lymphosarcoma**. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 52:491-497.
62. Van deMaaten MJ; **Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis**; *J Natl Cancer Inst.* Dec 1972; 49(6):1649-57.
63. Donald C., Graves, Ferrer JF. **In Vitro transmission and propagation of Bovine Leukemia virus in monolayer cell cultures**. *Cancer Res.* 1976; 36 (11 Pt 1):4152-9.
64. Lee J, Kim Y, Suk KC, Hyun CD, Hwan SD, Na YY, Ho OJ, Hee KS, Sil HM, Joo LC, Hwa YK, Han K; **Investigation of the Bovine Leukemia Virus Proviral DNA in Human Leukemias and Lung cancers in Korea**; *J. Korean. Med. Sci.* 2005; 20:603-6
65. McClure HM, Keeling ME, Custer RP, Marshak RR, Abt DA, Ferrer JF; **Erythroleukemia in two infant chimpanzees fed milk from cows naturally infected with the bovine C-type virus**. *Cancer Res.* 1974; 34:2745-57.
66. Naif H, Daniel RCW, Cogle WG, Lavin MF; **Early Detection of Bovine Leukemia Virus by Using an Enzyme-Linked Assay for Polymerase Chain Reaction-Amplified Proviral DNA in Experimentally Infected Cattle**; *J Clin. Microbiol.* 1992; 30(3):9675-679.
67. Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE; **A Field Evaluation of the Polymerase Chain Reaction Procedure for the Detection of Bovine Leukaemia virus proviral DNA in cattle**; *Vet. Microbiol.* 1994; 39:313-321
68. Tajima S, Yoko Aida, **Induction of expression of bovine leukemia virus (BLV) in blood taken from BLV-infected cows without removal of plasma**; *Microbes and Infection* 2007; 7(11-12):351-0198.
69. Beiera D, Riebeb R, Blankensteina R, Starickb E, Bondziod A, Marquardt c O; **Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line**; *Journal of Virological Methods* 2004; 121:239–246.
70. Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y. **Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(3):677–681.
71. Reginald J., Charles D. Gibson and John B. Kaneene, **Bovine Leukemia Virus: a herd-based control strategy**; *Dept. Large Animal Clin. Sci. (LCS)* 1985; 3-4339-349.
72. Acaite J, Tamosiunas V, Lukauskas K, Milius J, Pieskus J; **The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania**; *Prev. Vet. Med.* 2007; 82:83–89.
73. Gorodezky C. 2008. **Memorias del 27° Curso Teórico-Práctico de Inmunogenética, Impartido en el departamento de Inmunología e inmunogenética del INdRE del 28 de Julio al 1 de Agosto de 2008**
74. Zavaleta HJN, **Respuesta Serologica en Bovinos Infectados por el Virus de la Leucosis Enzoótica Bovina**, (Tesis de maestría) edo. Méx (FES-Cuautitlán UNAM); 2009

75. Crespo M. **El diagnóstico viral por el laboratorio.** Colombia Médica. 2000; 31: 2-4
76. Poon H, Jimenez E, Jacobs R; **Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction.** J. Virol. Meth. 1993; 41:101–112.
77. Martínez RHA, Ramírez AH, Tórtora PJ, Aguilar SA, Garrido FGI, Montaraz CJA, **Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor del machos caprinos,** Vet. Méx. 2005; 36: 2.
78. Dube S, Abbott L, Dube DK, Dolcini G, Gutierrez S, Ceriani C, Juliarena M, Ferrer J, Perzova R and Poiesz B; **The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain;** Virol. J. 2009; 6:120
79. Reinacher M., Thurmond M.C., Onuma M., Portetelle D., Picanso J., Theilen G.H., **Immunohistological Demonstration of Virus and Tumor Associated Antigens in Tissues in experimental and Spontaneous Bovine Leukemia Virus (BLV) Infection,** Vet. Immunol. Immunopath 1989; 22:223-231 223.
80. **Temporal stability of the virus load of cattle infected with bovine leukemia virus**
81. Patrick M. K., Chester B. T., Ronald D.S., Sharif S., Mallard B.A., Wilkie B.N., Sargeant J.M., Scott H.M., Dekkers J.C.M. & Leslie K.E. **Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle.** Animal Genetics. 1998; 29:185-93.
82. Inabe K, Ikuta K, Aida Y; **Transmission and Propagation in Cell Culture of Virus Produced by Cells Transfected with an Infectious Molecular Clone of Bovine Leukemia Virus,** Virol. 1998; 245:53–64.
83. Fulton BE Jr.,† Portella M, ‡ and Radke K; **Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node;** J. Virol. 2006; 80(167):873–7884.
84. Bracha Y, 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.