



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Descripción morfológica de tumores en bovinos de la cuenca lechera de Tizayuca
Hidalgo**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ROSA GLORIA RAMÓN SANTIAGO

ASESOR: Dr. Hugo Ramírez Álvarez

COASESOR: MVZ Ruperto Javier Hernández Balderas

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero que nada a mis padres por su apoyo, por sembrar en mí ideales de superación y por siempre impulsarme a salir adelante, todo lo bueno en mí es gracias a ustedes, los amo. Gracias también a mis hermanos por confiar en mí, por tenerme paciencia, este es solo un pequeño paso.

Muchas gracias a mi asesor el Dr. Hugo por aceptar dirigir esta tesis, por no dejarme sola, por sus consejos y la buena actitud que siempre mostró conmigo. De igual forma quiero agradecer al doctor Javier Hernández por su orientación y por hacerme parte de su equipo, sé que en momentos fue difícil pero nunca me abandonó, gracias porque sin usted nunca hubiera podido realizar este trabajo.

Gracias al apoyo que recibí de parte del proyecto Genotipificación del gen env de retrovirus que impactan la salud de rumiantes domésticos, con clave No. 221285. Proyecto financiado por CONACyT

Gracias también a la doctora Nelly por incluirme en su proyecto. Gracias por interés que mostró a pesar de sus compromisos.

También quiero agradecer el apoyo, tiempo y orientación que recibí para la parte de Histopatología de la doctora Cynthia González, el doctor Juan Carlos del Río y el doctor Jorge Tórtora que en todo momento fueron accesibles y no dudaron en brindarme su apoyo, gracias por resolver mis dudas.

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin las facilidades otorgadas por la Cuenca Lechera de Tizayuca, gracias. Además, agradezco al Dr. Mario Santacruz por su apoyo y orientación. Quiero agradecer al doctor Enrique Martínez Bárcenas por la oportunidad que me dio, por confiar en mí; gracias a cada médico de la cuenca lechera que se tomó el tiempo de compartir su conocimiento conmigo.

Parte de mi servicio social está plasmado en este trabajo es por eso que debo agradecer a alguien muy especial que desde el primer día no dudo en compartir su conocimiento conmigo, en escucharme y tratar de resolver en la medida de lo posible mis dudas, gracias por la paciencia que me tuvo, puedo decir que es un gran maestro, pero mejor ser humano, gracias al técnico de necropsias, gracias don Gume.

También quiero agradecer al doctor Germán Garrido por el apoyo y colaboración tanto para el procesamiento de las muestras como para realizar la toma de fotografías. Así también quiero agradecer al doctor Víctor por el tiempo y la asesoría tanto para realizar la extracción de ADN como la PCR, de igual forma gracias todos los compañeros del laboratorio de Virología por su apoyo y amabilidad.

Quiero hacer un agradecimiento especial a la doctora Mary Espejel por su apoyo, porque siempre tuvo las palabras correctas para animarme, por ser mi guía académica, gracias por su cariño, sus consejos y por creer en mis capacidades.

Gracias también al doctor Ernesto Marín por ayudarme a la toma y edición de las fotografías y sobre todo por su tiempo.

Gracias a mi familia Can&Cat, al doctor Ismael Hernández Ávalos y a la doctora Eli Miranda, porque desde que los conocí siempre me impulsaron a ser mejor, me apoyaron y confiaron en mí, espero no defraudarlos. De igual forma, gracias a la doctora Miriam, por ser solidaria conmigo y ofrecerme su apoyo incondicional, no sabe todo lo que aprendí con usted y lo agradecida que estoy porque siempre me impulsó a ser mejor.

Gracias a Diego y a Clau por ser como mis hermanos y apoyarme, no importa lo diferente que seamos, quizá es eso lo que nos complementa y nos ha hecho mejores amigos, gracias por ser mi familia. Gracias a mis amigos de la carrera: Poncho, Grace, Lidia, Pam, Cris, Lina, Mau Páez y Jaz.

Finalmente, gracias a todas y cada una de las personas que me han dado la mano y me han ayudado a llegar hasta aquí, me siento afortunada por contar con todos ustedes y por supuesto gracias a mi querida FES por todo lo que he aprendido dentro de sus aulas, me llevo lo mejor.

¡Diushi pe lii!

Índice

<i>Abreviaturas</i>	4
<i>Resumen</i>	5
Introducción	6
Etiología.....	6
Epidemiología.....	7
Transmisión.....	9
Cuadro clínico.....	9
Patogenia.....	10
Lesiones.....	11
Diagnóstico.....	12
Control y prevención.....	14
Importancia económica.....	15
Justificación.....	17
Hipótesis.....	17
Objetivos	17
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares.....	18
Metodología	19
Resultados	23
Estudio morfológico.....	23
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	36
Discusión	37
Conclusión	40
Bibliografía	41

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BLV: virus de leucemia bovina

BoLA: Complejo mayor de histocompatibilidad bovino (Antígenos de los leucocitos bovinos)

DRB3: Gen del complejo BoLA clase II

ELISA: Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzimas

Env: proteína de envoltura viral

Gp30: glicoproteína de un peso molecular de 30 kilodaltons

Gp51: glicoproteína de un peso molecular de 51 kilodaltons

H-E: hematoxilina-eosina

IDGA: inmunodifusión en gel de agar

LP: linfocitosis persistente

M: mol

Mg: miligramos

MgCl: cloruro de magnesio

µg: microgramos

µl: microlitros

µm: micrómetros

nm: nanomoles

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

P53: gen supresor de tumores

Pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Pol: polimerasa

TNF: Factor de necrosis tumoral

U: unidades

Resumen

La leucosis viral bovina es una enfermedad crónica infecciosa de origen viral que afecta principalmente a los bovinos productores de leche y en menor medida a los bovinos destinados a la producción de carne. El agente etiológico es un *Deltaretrovirus* de la familia *Retroviridae* que infecta principalmente linfocitos B (aunque también macrófagos) y que es ampliamente conocido por su capacidad para generar tumores. Estos virus transforman las células que infectan y éstas se infiltran en linfonodos regionales, abomaso, útero, corazón, médula ósea, bazo e hígado; sin embargo, esta patología es la menos detectable (menos del 5%), mientras que el alrededor del 70% son asintomáticos y otro 30% presenta una linfocitosis persistente. En el presente estudio se realizó la colección de muestras obtenidas durante la necropsia de rutina, a partir de lesiones tumorales procedentes de bovinos de la cuenca lechera de Tizayuca. Estas muestras fueron conservadas en formol al 10% para posteriormente ser incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina. Se realizó la descripción macroscópica e histopatológica de las muestras, observando un predominio de infiltrados de linfocitos en los tejidos (linfomas). Posteriormente se usó una muestra por cada caso, de las cuales siete fueron conservadas mediante congelación y tres en parafina, para realizar la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con la que se determinó la presencia de ADN proviral del virus de leucemia bovina en 6 de las 10 muestras estudiadas, mientras que 4 de las muestras fueron negativas, una de estas relacionada a la presencia de lesiones granulomatosas. Se identificó que las lesiones tumorales fueron linfomas y por PCR se confirmó que la mayor cantidad de las muestras del estudio estaban relacionadas con la infección del virus de leucemia bovina.

Introducción

La actividad lechera en México representa la segunda actividad en importancia dentro del sector ganadero, con un 22.8% del valor de la producción y es una de las principales fuentes de suministro de proteína animal. En el 2017 el inventario nacional de bovinos destinados a la actividad lechera era de 2, 457, 683 cabezas. La producción de leche en el año 2016 fue de 11, 607, 493 litros (SIAP, 2017). A pesar de ello, esta producción no alcanza a cubrir la demanda nacional y esto genera la importación de leche en polvo. Es por ello que los esfuerzos por alcanzar mayor producción en el sector se enfocan en aspectos como nutrición, genética y calidad e inocuidad en leche (SE, 2012).

Un punto importante para lograr una mayor producción láctea es apoyar los aspectos sanitarios en las explotaciones, donde muchas de las veces la mayor preocupación se centra en las enfermedades infecciosas. Dentro de estas se encuentra las enfermedades virales. Una de ellas es la leucosis enzoótica bovina (LEB), una enfermedad de carácter linfoproliferativo causada por un retrovirus oncogénico de distribución mundial (De la Sota, 2005).

La LEB puede cursar como una infección inaparente, algunos bovinos desarrollan una fase de linfocitosis persistente y en menor medida, algunos animales desarrollan un cuadro neoplásico con tumoraciones en casi todos los órganos blandos (Radostits, *et al.*, 2012).

La importancia económica de la enfermedad radica en que ocurre una disminución en la producción de leche, aumento en costos de reemplazo, reducción en la fertilidad, pero sobre todo en las limitaciones de mercado para los animales, debido a que actualmente en muchos establos de algunos países existen ya programas de control y erradicación de esta infección, por lo cual, hay medidas de control para la compra de ganado en pie, como de semen y embriones (Nekouei, *et al.*, 2015).

Estas mismas medidas internacionales obligan a los demás países a trabajar en el control de esta enfermedad. En México, no existe actualmente un programa de control oficial, por lo cual la prevalencia de la enfermedad oscila entre el 50-60%, según estudios recientes, de ahí la importancia de su estudio y sobre todo de diagnóstico (Zavaleta & García, 2017).

1. Etiología

La LEB es una enfermedad provocada por un virus ARN, oncogénico del género *Deltaretrovirus*, que pertenece a la familia *Retroviridae*, que comparte algunas características con otros virus leucémicos de otras especies (Radostits, *et al.*, 2012).

El virus de la leucemia bovina (BLV, por sus siglas en inglés) (figura 1), es de forma esférica (icosaédrica), con un diámetro que va de 90 a 120 nm. Está formada por dos subunidades de ARN simple y la nucleoproteína p12 (nucleocápside). El genoma está rodeado por la cápside, formada por la proteína p24. Rodeando a la cápside se encuentra una malla de proteínas de matriz (p15) las cuales entran en contacto directo con una membrana celular formada por una bicapa lipídica. Esta incluye a la glicoproteína de envoltura (Env) que se conjuga por proteólisis en Gp30 transmembrana y en la glicoproteína de superficie Gp51. El genoma viral codifica también para las enzimas transcriptasa inversa y proteasas, así como, para las proteínas reguladoras Tax y Rex (Rama, 2012).

El virus es susceptible al calentamiento a más de 56° durante 10-30 minutos. Está comprobado que el virus es inactivado cuando la leche es pasteurizada a altas temperaturas por corto tiempo (Barrientos, 2002).

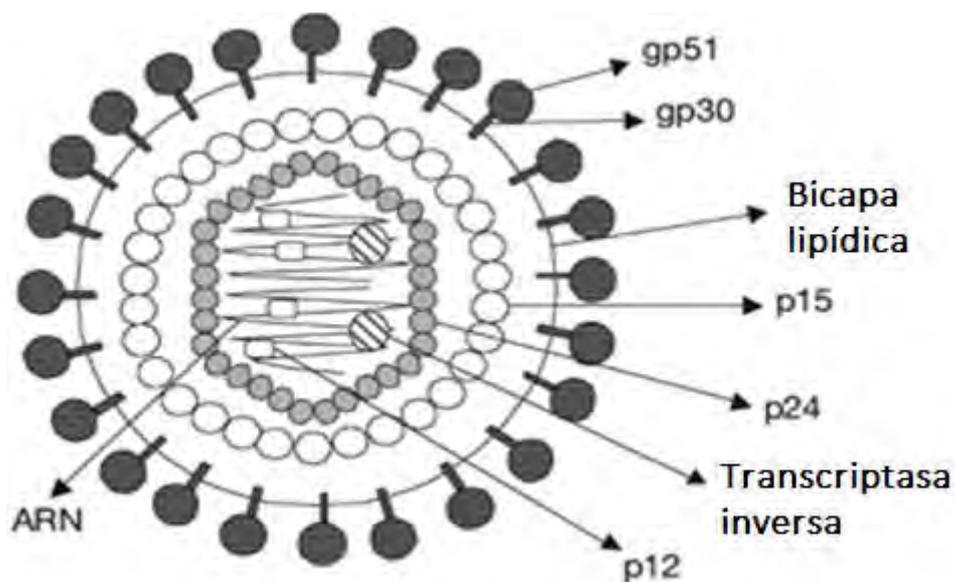


Figura 1. Esquema del virus de la leucemia bovina (Uckert, et al., 1984).

2. Epidemiología

La primera descripción de la enfermedad la realizó Leisering en 1871, en Alemania. Se cree que los primeros casos aparecieron en el continente europeo y posteriormente se expandió al continente americano, principalmente a Estados Unidos y Canadá a través de las importaciones de ganado lechero para mejorar los hatos de estos países (Baruta, 2011).

En México, los primeros reportes de esta enfermedad datan de 1967. Posteriormente, se diagnosticaron clínicamente 9 casos de 22,699 animales sacrificados en el rastro de Ferrería. Un estudio posterior reveló que de 1960 a 1974 se detectaron 110 casos de bovinos con leucosis bovina, en alrededor de 17 Estados, principalmente del centro de la República (Trigo, *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que existe una mayor prevalencia de la infección en el Norte de América, Asia y África (Tsutsui, *et al.*, 2016). En el continente americano los países con mayor prevalencia son Estados Unidos, Canadá y Argentina, aunque en este último existe un programa de control para la enfermedad ya que implica pérdidas para la ganadería (Nekouei, *et al.*, 2015).

Ocurre algo similar con el continente europeo que han establecido programas nacionales para la erradicación de la infección por el BLV, por lo cual, existe un mayor control en los países de este continente (Lee, *et al.*, 2016). En el año 2012, en un reporte de la Unión Europea sobre enfermedades de cerdos y bovinos, se indicaba que Francia, Alemania, Italia, fueron declarados oficialmente libres de LEB (Annual EU report, 2012).

Actualmente en México existe una seroprevalencia promedio del 49.8% en hatos lecheros de diferentes Estados de la República (González *et al.*, 2016). Se sabe que es una enfermedad de alta prevalencia, de incidencia variable, alta morbilidad, de mortalidad baja y letalidad alta (Zavaleta & García, 2017).

Esta enfermedad se encuentra enlistada en el grupo tres según el acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Pertenece al grupo de enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas como endémicas y que representan un riesgo menor, es una enfermedad de notificación mensual obligatoria (SAGARPA, 2016).

Es una enfermedad de curso crónico, en la que se encuentran linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos del cuerpo y afecta a bovinos de todas las edades y razas. Es de distribución mundial, no se ha reportado susceptibilidad por raza, aunque estudios serológicos muestran que en el ganado lechero hay una mayor prevalencia en comparación con el ganado de carne, esto debido principalmente a las prácticas de manejo y a que el periodo de vida en el ganado de carne es menor (Juopperi, 2004).

3. Transmisión

Esta enfermedad puede transmitirse de manera horizontal y vertical (figura 2), a través de células infectadas (contenidas en sangre, leche, semen, exudados vaginales, calostro, iatrogénicamente o por vectores) de un bovino sano a un portador susceptible (Quiroz, 2007).

La forma horizontal es la más importante ya que la mayoría de los contagios son a través de esta forma, debido al uso de una aguja para varios animales, un guante de palpación para varios animales, la no desinfección de material de cirugía, el descorne y tatuado. También existe la transmisión a través de vectores como son las moscas hematófagas, garrapatas, así como mosquitos (Hernández, *et al.*, 2006).

La forma vertical (de madre a cría) tiene una incidencia del 3-16% (Hopkins & DiGiacomo, 1997). La infección puede darse de manera transplacentaria o a través del consumo de calostro de vacas infectadas. Es importante señalar que el porcentaje de becerros portadores del virus, procedentes de una hembra positiva al BLV, es de apenas del 3%, es decir, no todas las crías de hembras positivas son portadores del virus (Gutierrez, *et al.*, 2011)

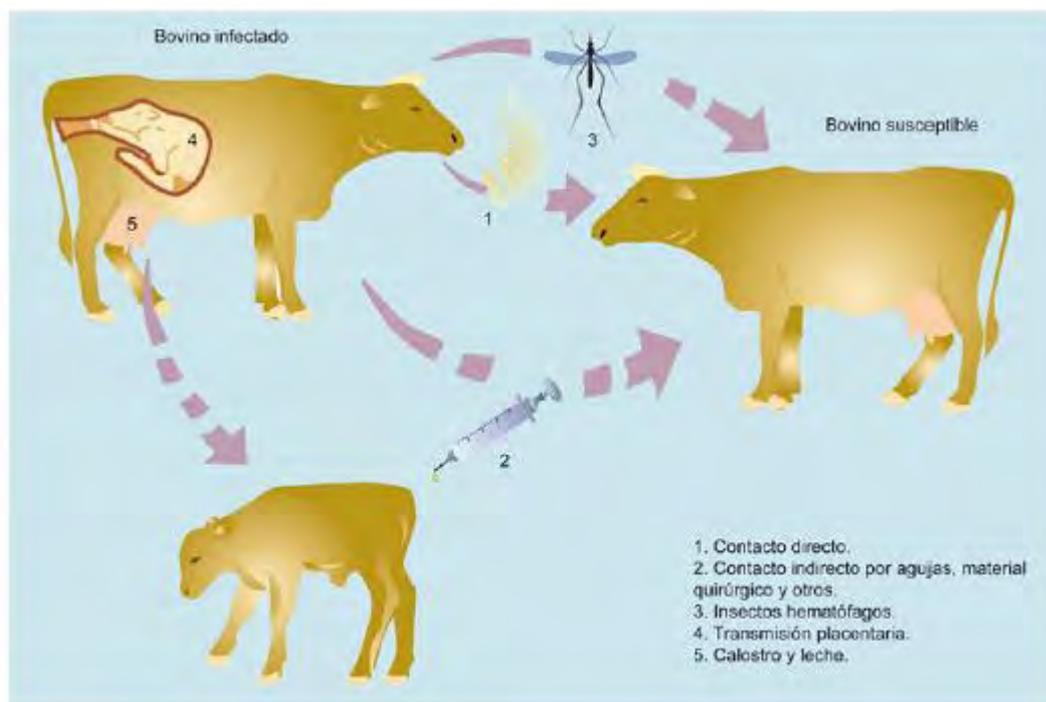


Figura 2. Mecanismo de transmisión del virus de leucemia bovina (Gasque, 2008).

4. Cuadro clínico

La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad que se presenta en tres diferentes formas: la asintomática, linfocitosis persistente y la tumoral o linfoma (figura 3) (De la Sota, 2005). En

la forma asintomática no hay signos que manifiesten enfermedad, esta condición se puede mantener por varios años y se llega a presentar en un 70 % de los bovinos infectados (Ohno, *et al.*, 2015). Esta forma sólo puede detectarse mediante pruebas serológicas debido a que los animales presentan anticuerpos anti BLV, se presentan en alrededor del 5% de células mononucleares en sangre periférica (Rama,2012).

La linfocitosis persistente se desarrolla en aproximadamente el 30% de los casos, en los cuales ocurre un desbalance en la relación de linfocitos B/linfocitos T, debido a un incremento en los linfocitos B circulantes en sangre. Esta condición se puede observar a partir de los 2 a 3 años pos infección (Feliziani, *et al.*, 2017). En este caso los animales no desarrollan un cuadro clínico aparente, pero mediante pruebas hematológicas se puede determinar la condición de linfocitosis persistente (De la Sota, 2005), ya que se identifica un recuento absoluto de linfocitos de por lo menos tres desviaciones normales por encima del recuento normal, hallazgo que permanece por tres meses consecutivos. Los animales con linfocitosis persistente sufren un desorden inmunológico, con una marcada disminución en la síntesis y actividad de las inmunoglobulinas (Reyes,2003).

La forma tumoral, es la más conocida, a pesar de que es la de menor presentación debido quizá al tiempo en el que tarda en desarrollarse, sólo un porcentaje de animales de alrededor del 5% desarrolla linfosarcomas. Más del 80% de los bovinos sin linfosarcomas son la fuente más importante de diseminación de la infección (Fávila, 2014).

El linfoma es la forma clínica de la leucosis enzoótica bovina (LEB), tiene características tumorales y se desarrolla en menos del 10% de la población afectada después de meses o años y es la neoplasia o tumor más común en los bovinos (Moulton & Harvey, 2002)

Las lesiones y signos se presentan a partir de los 2 años, aunque en la mayoría de los casos son notorios hasta los 5 años. En la mayoría de los casos los signos son inespecíficos y variables, ya que dependen de la localización del proceso neoplásico y del grado de afección de órganos de importancia vital. Pueden presentar desde anorexia o emaciación progresiva, hasta baja en la producción de leche (Radostits, *et al.*, 2012).

Otra característica de esta enfermedad es la linfadenopatía superficial que se aprecia con frecuencia en estos animales, en algunos casos también se presenta la exoftalmia producto del crecimiento del tejido retro ocular. También pueden presentar cojeras, marcha anormal y parálisis del tren posterior (Quiroz, 2007).

5. Patogenia

El virus tiene como célula blanco a los linfocitos B, dentro de los cuales se dará una interacción entre el genoma viral y los genes celulares. De esta forma cada vez que la célula se divida, el

virus se replicará, adicional a esto el ADN viral integrado se expresará para dar lugar a viriones que pueden infectar a las células adyacentes (Cancino,2016).

Aunque se desconocen los mecanismos de la oncogénesis, hay evidencia experimental que demuestra que las infecciones por BLV modifican el patrón de la expresión génica de la célula hospedera. La intermitente expresión de proteínas reguladoras y estructurales por el provirus, provoca una vigorosa respuesta inmune que indirectamente modifica los genes de transcripción en otro tipo de células (linfocitos T citotóxicos, macrófagos). En principio la mutagenesis de inserción y la interferencia del ARN asociada a microRNA, puede modificar el destino de la célula sin inducir inmunidad antiviral. A pesar de un control estricto en la respuesta inmune, los intentos permanentes del virus por replicarse finalmente inducen mutaciones en la célula infectada. Se ha planteado que la acumulación de estas lesiones y la selección de clones tumorales conducirá al cáncer (Safari, *et al.*, 2017).

Posteriormente se genera una expansión policlonal de los linfocitos, misma que es bloqueada a nivel transcripcional (Ohno, *et al.*, 2015) dando lugar a largos periodos de latencia. El virus expresa la proteína Tax, la cual favorece la inhibición de la apoptosis lo que genera eventualmente células transformadas (Panei, 2013).

El VLB puede causar inmunosupresión en animales afectados mediante múltiples mecanismos como la alteración en los niveles de citosinas circulantes, así como alteraciones en la producción de las mismas. Además, provoca disturbios de células inmunes debido a la proliferación o apoptosis, provocando una desregulación en la proporción de linfocitos (Frie, 2015).

Varios estudios han determinado que factores del hospedero están involucrados en la resistencia y susceptibilidad a presentar linfocitosis persistente o el linfoma, como los polimorfismos del TNF o la mutación en el gen supresor de tumores p53, además de variaciones genéticas el gen *BoLA-DRB3* se han relacionado con el desarrollo de resistencia o susceptibilidad al VLB (Hernández, 2010).

6. Lesiones

Los órganos afectados presentan un infiltrado blanquecino de aspecto lardáceo, de color blanco-gris o mate, con límites mal definidos. En algunos casos puede presentar hemorragias o pequeños focos de necrosis, de apariencia seca y color amarillento. Al corte se pierde la estructura anatómica de los órganos afectados (Chamizo, 2015).

Las lesiones más frecuentes se observan en linfonodos, timo, bazo, médula ósea, placas de Peyer, hígado, riñón, aurícula derecha del corazón, útero y abomaso (Klintevall, *et al.*, 1994).

En el caso de los linfonodos se encuentran aumentados de tamaño y al corte presentan infiltrado tumoral blanquecino, de consistencia firme y en ocasiones pueden observarse hemorragias o pequeños focos de necrosis. El bazo se puede encontrar aumentado de tamaño y al corte se observan nódulos blanquecinos diseminados en el parénquima del órgano (Radostits, *et al.*, 2012).

El corazón presenta lesiones en la aurícula derecha, hay presencia de nódulos blanquecinos de tamaños diversos o áreas difusas en forma infiltrativa. Por otro lado, la médula ósea regularmente presenta infiltrado tumoral, aunque existen pocos registros debido a que es poco común que se realice la inspección de las estructuras óseas (Chamizo, 2005).

Otro órgano que comúnmente se afecta es el abomaso, en el cual el infiltrado tumoral se presenta de manera difusa engrosando la pared o puede presentar nodulaciones diversas, además de úlceras (Baruta, 2011). Éstas características también se pueden apreciar en la mucosa intestinal. En el caso del riñón, el útero y el hígado, presentan nodulaciones con infiltración difusa. En el útero estas nodulaciones pueden ser tan grandes como una carúncula (Moulton & Harvey, 2002).

7. Diagnóstico

- Detección de la infección por el BLV

El diagnóstico de la infección por el BLV se realiza mediante pruebas serológicas, si bien, la OIE recomienda tanto la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), así como, la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se ha demostrado que esta última es una prueba más sensible y específica para la detección del virus (Cancino, 2016).

Se ha determinado que la prueba de inmunodifusión en gel de agar es específica, aunque poco sensible y se utiliza para la detección de anticuerpos en muestras de suero individuales. Es utilizada para el comercio internacional y muy útil en modelos de erradicación. Entre sus principales limitaciones se puede mencionar que detecta la presencia de anticuerpos como mínimo seis semanas después de la infección, que no puede usarse para la detección de anticuerpos un mes antes del parto, no es posible usarse para la detección de anticuerpos en leche y no es posible realizar la lectura de los resultados de la prueba antes de las 48 horas. En el caso de becerros puede usarse hasta después de los seis meses de edad, para evitar resultados positivos por la detección de anticuerpos calostrales (Gasque, 2008).

En el caso de la técnica de ELISA es una prueba altamente sensible y además de que se puede usar el suero para la detección de anticuerpos específicos (De Oliveira, *et al.*, 2016),

también es posible emplearla para el mismo fin en la leche, es mucho más rápida ya que en menos de 8 horas se pueden obtener resultados y el kit comercial es fácil de adquirir. Tiene las mismas limitaciones para usarse en terneros que la prueba de IDGA (OIE, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la detección del ADN proviral en la sangre periférica o en los tumores. Es por eso que la OIE recomienda la prueba para la identificación de la infección por el BLV en animales de forma individual, especialmente en terneros jóvenes con presencia de anticuerpos calostrales, tejido tumoral de casos recolectados en rastro, para diferenciar entre un linfoma esporádico de uno infeccioso, en casos de resultados débilmente positivo o inciertos en pruebas de ELISA y para el diagnóstico en ganado destinado a centros de inseminación artificial (OIE, 2008).

- Detección de linfomas en bovinos infectados con el BLV

El diagnóstico de la enfermedad se puede hacer mediante signos clínicos, hallazgos a la necropsia e histopatología, pero para realizar un diagnóstico integral es necesario el uso de pruebas más específicas para confirmar que los signos están relacionados a la infección del BLV, ya que también pueden presentarse casos de leucosis bovina esporádica (Zavaleta, 2009).

Las muestras tomadas ya sea por biopsia o mediante la necropsia deben ser preferentemente de linfonodos, abomaso, aurícula derecha del corazón, riñón, hígado y bazo con parte de la tumoración. Deben ser conservadas en formalina al 10% y remitidas al laboratorio para ser evaluadas por técnicas histológicas de rutina o para realizar inmunohistoquímica. A la revisión histológica se observa pérdida en la arquitectura del órgano, infiltrados masivos de células linfoides neoplásicas densamente agrupadas y con mitosis aberrantes (Moulton & Harvey, 2002). Es importante señalar que esto permite identificar un linfoma, pero para determinar el agente etiológico es necesario hacer el diagnóstico serológico o molecular.

En el caso del examen hemático se puede emplear para determinar la condición de linfocitosis persistente, mediante el conteo de linfocitos en sangre. Para realizar la interpretación del conteo de linfocitos se puede emplear el cuadro de Bendixen (cuadro 1), basándose en la edad y en el número absoluto de linfocitos/mm³ (Reyes, 2003).

Cuadro 1. Interpretación de linfocitos persistente por el método Bendixen

Años	Normal Linfocitos/ μ l de sangre	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

(Andrews, 1990)

8. Control y prevención

Debido a que actualmente no existe vacuna ni tratamiento para la enfermedad, las medidas de control y prevención están basadas en el establecimiento de buenas prácticas de manejo, que reduzcan riesgos de transmisión (Limón, 2012).

Cabe señalar que, dependiendo de cada caso, se deberá implementar un plan de acción, esto referente a la edad de los animales afectados, porcentaje de animales infectados y las prácticas de manejo. Es decir, si en el hato la prevalencia es de menos del 10%, se sugiere la eliminación de estos animales, la implementación de medidas de prevención, así como el monitoreo serológico cada tres meses para descartar positivos, de manera que al final ningún animal sea positivo para posteriormente realizar controles cada año. Después de dos controles negativos, el hato se puede considerar libre del BLV (Quiroz, 2007).

En casos donde la prevalencia supera más del 20% se plantea la segregación de estos animales e ir eliminándolos poco a poco (Gutierrez, *et al.*, 2011).

A continuación, se enlistan medidas aplicables para el control y la prevención de la infección por el BLV (figura 3).

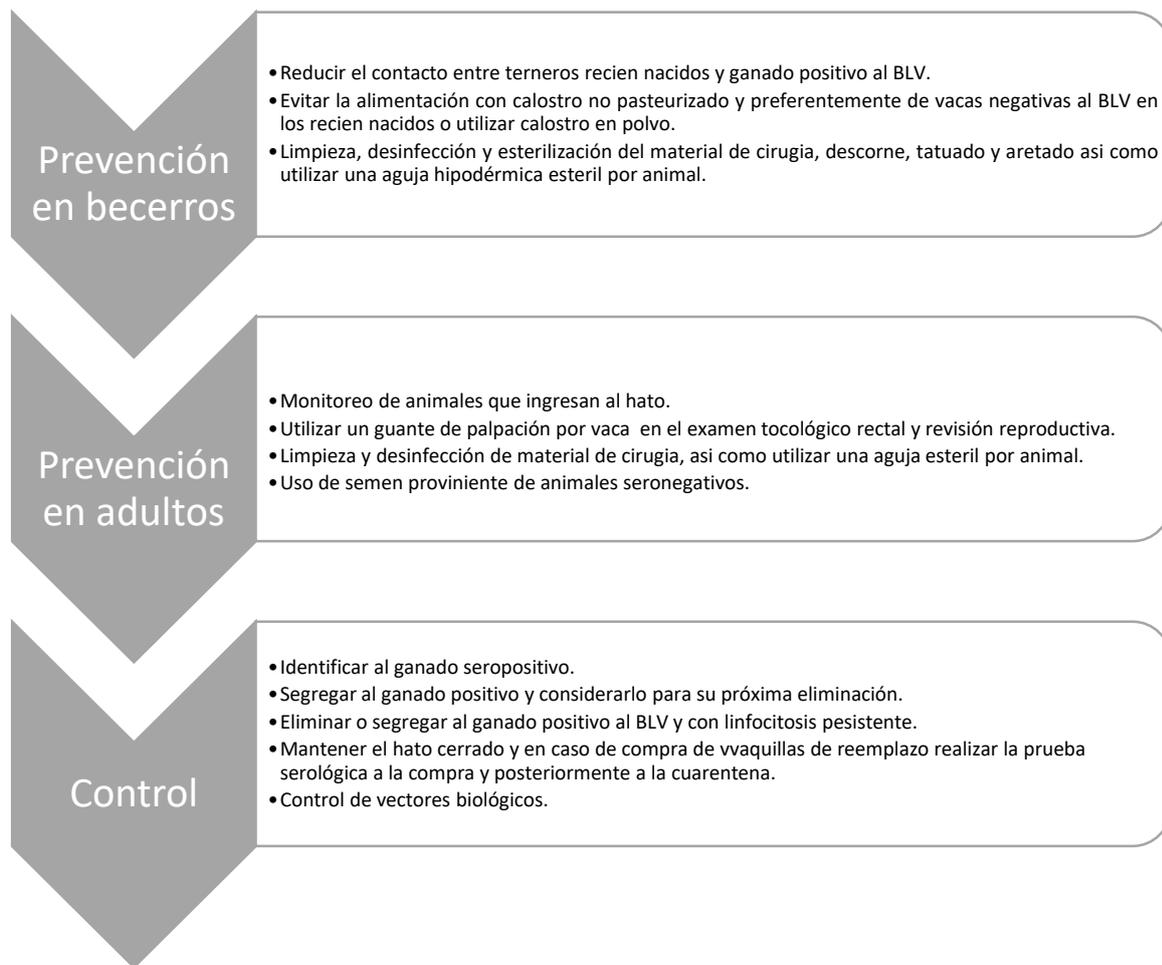


Figura 3. Medidas de prevención tanto en animales adultos como en becerros para evitar la infección por BLV, así como posibles medidas de control (Modificado de Zavaleta & García, 2017).

9. Importancia económica

La importancia de la LEB radica en las pérdidas económicas directas e indirectas que ocasiona. Las pérdidas directas están relacionadas con la mortalidad causada por la patología tumoral, es decir, por el aumento en los costos de reemplazo, las alteraciones en el sistema inmune que facilitan la presentación de otras enfermedades y la baja eficiencia reproductiva. Por otro lado, las pérdidas económicas indirectas se deben al aumento en gastos destinados a medicamentos veterinarios, pero sobre todo a las limitantes de mercado para semen, ganado en pie y embriones que provengan de hatos infectados (Pelzer, 1997).

También aumentan los costos por servicio veterinario, ya que al ser una enfermedad de signos inespecíficos fácilmente ocurren diagnósticos erróneos y por lo tanto tratamientos poco efectivos. Muchas veces estas mismas vacas muestran poca eficiencia reproductiva (solo

llegan a 2 o 3 partos), baja producción de leche (3% menos), lo que las predispone a ser eliminadas del hato, lo cual genera pérdidas para el productor. En Estados Unidos anualmente se estima que las pérdidas en leche oscilan en 525 millones de dólares (Ohno, *et al.*, 2015), mientras que un estudio en Canadá reporta que anualmente hay pérdidas de hasta 412 dólares por cada 50 vacas (Nekouei, *et al.*, 2016).

Justificación

En México hay poca información actualizada de la prevalencia de leucosis bovina y en especial poca información respecto a la frecuencia en el desarrollo de tumores relacionados con la infección. Durante la necropsia el hallazgo de crecimientos anormales puede ser sugestivo de leucosis bovina pero no es concluyente, por lo que es necesario el uso de pruebas complementarias para una mayor certeza diagnóstica.

Hipótesis

Si un hato de bovinos lecheros está infectado con el virus de leucemia bovina, entonces, es posible identificar la presencia de lesiones tumorales en diferentes órganos a la necropsia.

Objetivos

Objetivo general

- Describir las características morfológicas de lesiones tumorales identificados en la necropsia de bovinos de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo y determinar la frecuencia de estos relacionados con la infección por el virus de leucemia bovina.

Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de lesiones tumorales en bovinos vinculados a la infección por el virus de BLV en un periodo de seis meses, en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo.
- Fotodocumentar imágenes de tumores en bovinos destinados a la necropsia en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo.
- Comprobar la presencia del genoma del BLV en crecimientos tumorales mediante el uso de PCR.

Metodología

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la sala de necropsia del complejo agropecuario industrial de Tizayuca Hidalgo. La cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo denominada como Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca S. A. (CAITSA), se encuentra ubicada en la carretera federal México-Pachuca. Dicha sala tiene como fin realizar el diagnóstico posmortem de bovinos de los diferentes establos del complejo. El procesamiento de los tumores se realizó en el laboratorio de apoyo a Histología y Biología, y la PCR en el laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular, ambos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

➤ Grupo de animales

El estudio se realizó a partir de los bovinos que llegaban para la necropsia de rutina, para su diagnóstico posmortem durante un periodo de 6 meses. Las muestras fueron obtenidas de bovinos hembra de raza Holstein, que presentaban tumoraciones sugerentes a la infección por el virus de la leucemia bovina.

Durante este periodo se realizaron un total de 134 necropsias, de las cuales solo en 10 casos se encontraron crecimientos anormales de tejido, de crecimiento excesivo e incoordinado respecto al tejido normal.

➤ Estudio histopatológico

Las muestras fueron obtenidas a partir de tejidos recuperados en las necropsias de tumores localizados en diferentes órganos, que fueron conservados en formalina amortiguada al 10%. Se tomaron muestras de los órganos afectados teniendo un total de 19 muestras (ver tabla 1). Las muestras se incluyeron en parafina y posteriormente se realizaron cortes histológicos de 4 μm para finalmente ser teñidos con Hematoxilina-eosina. La revisión de las laminillas se hizo en un microscopio compuesto (Leica, modelo DM750) a diferentes aumentos (40x, 100x, 400x, 1000x). Se revisaron las 19 laminillas y se realizó el diagnóstico.

Tabla 1. Muestras obtenidas para el estudio histopatológico

NÚMERO DE CASO	MUESTRA OBTENIDA PARA ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO
CASO 1	Linfonodo y abomaso
CASO 2	Linfonodo y abomaso
CASO 3	Linfonodo y abomaso
CASO 4	Linfonodo
CASO 5	Esófago y abomaso
CASO 6	Abomaso y corazón
CASO 7	Linfonodo y corazón
CASO 8	Linfonodo, abomaso y riñón
CASO 9	Corazón
CASO 10	Linfonodo y abomaso

Se obtuvieron muestra de los órganos afectados por cada caso para la realización del estudio histopatológico

➤ PCR

Para el diagnóstico mediante PCR, se utilizó una muestra obtenida durante la necropsia de rutina de un órgano con lesión tumoral, por cada caso, teniendo un total de 10 muestras. De estas 10 muestras, siete fueron conservadas en congelación, mientras que los tres restantes eran muestras en parafina. La prueba de PCR se usó para confirmar que las tumoraciones eran debidas al virus de leucemia bovina (BLV). Previo a la realización de la PCR se realizó la extracción de ADN de las muestras utilizando un kit comercial FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (FavorGen© Taiwán).

Paso 1

Previamente centrifugar el microtubo con células en suspensión a 4000 rpm por 1 minuto y eliminar el sobrenadante por decantación.

1. Agregar 200 µl de buffer FATG1, se homogeniza la muestra de tejido y se macera con un micropestillo.

Paso 2: Lisis

2. Agregar 20 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) a la muestra obtenida. Mezclar por agitación.
3. Incubar a 60 °C por 15 minutos, esto con la finalidad de que el tejido se lise completamente.

4. Centrifugar brevemente el tubo para remover los residuos de la tapa.
5. Agregar 200 µl de buffer FATG2 a la muestra y mezclar a fondo por homogenización e incubar a 70 °C por 10 minutos.
6. Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa; si existe material insoluble presente, centrifugar a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

Paso 3: Unión al ADN

7. Agregar 200 µl de etanol grado biología molecular a la muestra y homogenizar la mezcla.
8. Centrifugar brevemente el tubo para remover las gotas de la tapa.
9. Colocar una minicolumna de FATG en un tubo colector, transferir la mezcla de la muestra cuidadosamente a la columna.
10. Centrifugar por un minuto a 14000 rpm y desechar el fluido que pasó a través de ella hacia el tubo colector.

Paso 4: Lavado

11. Lavar la columna FATG con 500 µl de buffer W1, centrifugar por un minuto y desechar el líquido restante. Es importante asegurar que el etanol fue añadido por primera vez al buffer W1.
12. Lavar la columna FATG con 750 µl de buffer de lavado y centrifugar por un minuto; desechar el restante y centrifugar la columna adicionalmente por 3 minutos para secar la misma.

Paso 5: Elución del ADN (Homogenización)

13. Colocar la columna FATG en un tubo de elución y añadir 50 µl de buffer de elución o agua desionizada (pH 7.5-8.5) al centro de la membrana de la columna. Dejar reposar por 3 minutos.
14. Centrifugar por 2 minutos para eluir el ADN. Para una elución efectiva, asegurarse que la solución de elución sea colocada en el centro de la membrana y se absorba por completo. Si la muestra tiene baja cantidad de células, reducir el volumen de elución para incrementar la concentración de ADN.
15. Repetir el paso 14 por tres ocasiones.
16. Conservar el ADN total a 4 C o -20 C.

El protocolo utilizado para la prueba de PCR fue el previamente descrito por Cancino, 2016, brevemente:

Concentraciones requeridas por reacción de PCR. (BioTecMol, México)

Reactivos	concentración inicial	concentración final
Buffer	10X	1X
Deoxinucleótidos trifosfatos	10 mM	280 µm
MgCl ₂	25mM	1.5 mM
Iniciador Fw ^a	10 µm	600 nM
Iniciador Rv ^b	10 µm	600 nM
Taq ADN polimerasa	5 U/µl	2.5 U/reacción
ADN molde		600 ng

Para un volumen final de 30 µl.

^a 5-ACGCCTGATCACAGCAATTA-3

^b 5-TCTCTGCGCTACACTCAGTC-3

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización a 95°C por 30 segundos; hibridación a 52°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 50 segundos, finalizando con una extensión a 72°C por 7 minutos en un termociclador PCR Gene Mate Series (China). Al finalizar la PCR, el producto fue analizado mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5%, conteniendo 10µl de bromuro de etidio y visualizando en un transiluminador con luz UV (UVP, USA). Las amplificaciones que comparadas con el marcador de pares de bases correspondieran con el amplicon esperado de 674 pares de bases, se consideraron positivas.

Resultados

- Estudio morfológico

Se realizaron un total de 134 necropsias de bovinos de desecho del CAITSA, correspondientes a hembras de entre 2 a 7 años aproximadamente. De las 134 necropsias realizadas en el CAITSA sólo el 7.46% (10 casos) fueron considerados ya que eran compatibles con el tipo de lesión tumoral que se describe en la literatura.

La frecuencia de presentación de tumores en los órganos afectados fueron linfonodos en un 90% (9 de 10 casos), abomaso en un 80%(8 de 10 casos), corazón en un 30% (3 de 10 casos), riñón el 20% (2 de 10 casos), hígado en un 10% (1 de 10 casos), útero en un 10% (1 de 10 casos) y esófago en un 10% (1 de 10 casos).

- Descripción morfológica



Figura 4. Abomaso con presencia de placas blanquecinas

Descripción de la figura 4. **(A)** La superficie del órgano se observó enrojecida a nivel de la región fúndica y cardial, con presencia decenas de placas blanquecinas de forma irregular, de diversos tamaños entre 5 a 15 cm de diámetro localizados en la mucosa de la región cardial, fúndica y pilórica. A nivel de la zona pilórica se observó presencia de un material mucoso, aproximadamente 10 ml, de color amarillento. **(B)** En los pliegues del fundus del abomaso se observaron decenas de placas blanquecinas de consistencia dura, desde 0.5 cm hasta 20 cm aproximadamente, con bordes bien definidos, que penetraba al corte.



Figura 5. Abomaso con infiltrado tumoral (flecha).

Descripción de la figura 5. En uno de los pliegues del abomaso se observó un abultamiento de forma alargada, con engrosamiento de la pared del órgano y que al corte mostró una consistencia firme, de color blanquecino, con un puntilleo (1 mm de diámetro) de color rojizo de distribución multifocal.

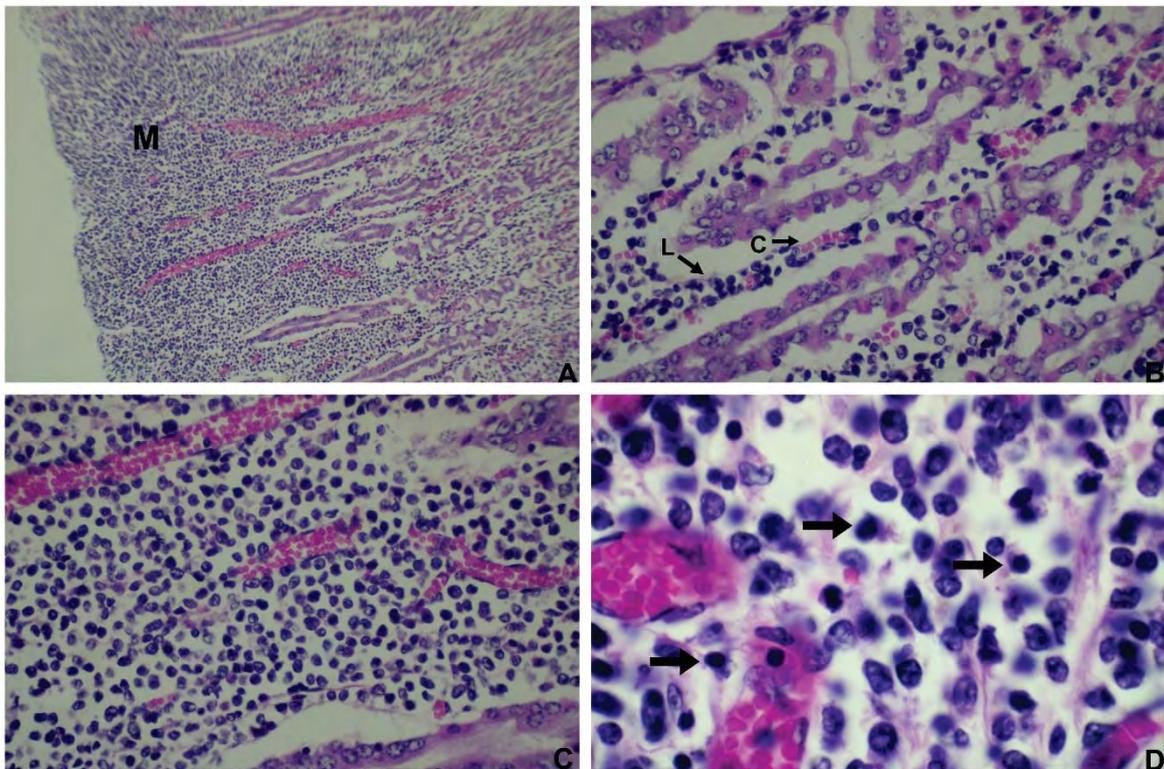


Figura 6. Abomaso. Tinción H-E

Descripción de la figura 6. **(A)** A nivel de la mucosa del abomaso (M) se observó un infiltrado celular basófilo de manera difusa (toma en 40x). **(B)** A mayor aumento, el infiltrado basófilo corresponde a linfocitos (L), paralelamente se observó congestión (C), cambios degenerativos y atrofia de las células epiteliales (toma en 100x). **(C)** Los linfocitos no presentaron cohesión entre ellos y se observó evidentes diferencias de tamaño entre las células (toma en 400x). **(D)** Los linfocitos pleomórficos presentaron mitosis atípicas y abundante citoplasma (flechas) (toma en 1000x).



Figura 7. Esófago con pequeñas tumoraciones.

Descripción de la figura 7. Se aprecia en la superficie del órgano la presencia de múltiples nodulaciones de color blanquecino, con un diámetro de 1-5 cm y de consistencia firme que penetra 1 cm al corte.

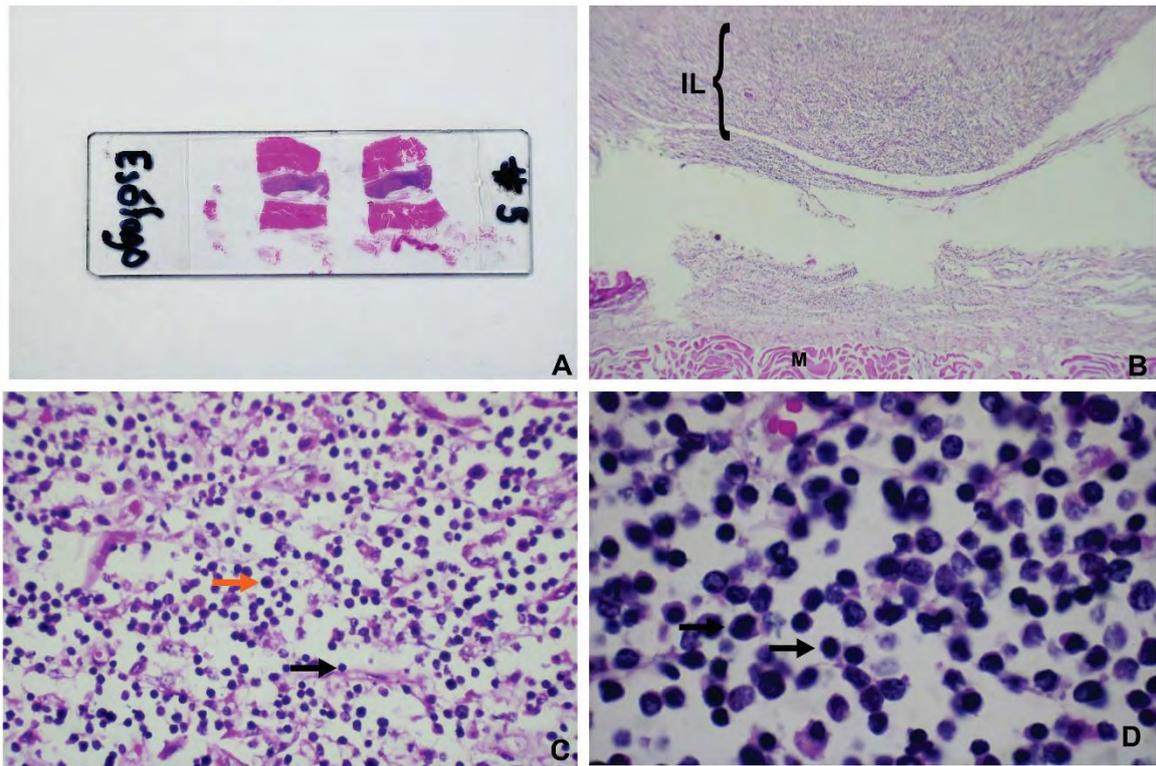


Figura 8. Esófago. Tinción H-E

Descripción de la figura 8. **(A)** El esófago presentó un infiltrado celular basófilo entre las dos capas de la muscular del órgano. **(B)** A nivel de la muscular (M) se observó un infiltrado basófilo que corresponde a linfocitos (IL) (toma en 100x). **(C)** Los linfocitos de diferente tamaño tenían núcleos de diferente forma y tamaño (flechas) (toma en 400x). **(D)** Estos linfocitos presentaron cromatina dispersa y núcleos de formas irregulares, así como abundante citoplasma, lo que les da un aspecto de células linfoblásticas (flechas) (toma en 1000x).

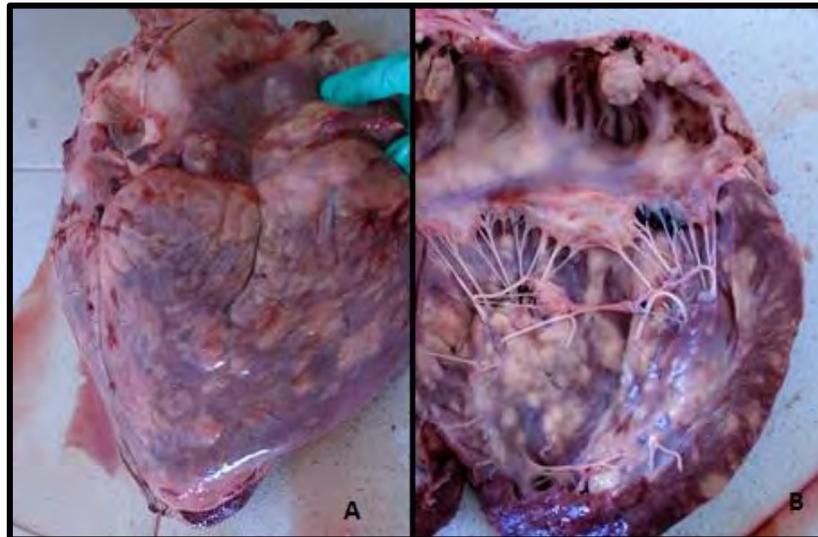


Figura 9. Corazón.

Descripción de la figura 9. **(A)** El corazón presentaron decenas de nodulaciones blanquecinas tanto en el lado izquierdo como en el derecho, desde el ápice hasta la aurícula, tanto en el epicardio como en el endocardio mural del mismo. **(B)** En el ventrículo derecho, se observaron decenas de nódulos blanquecinos de tamaño variable de 1 y hasta 5 cm de diámetro, en endocardio y miocardio, ocupando el 90% de la pared del ventrículo hasta la aurícula.

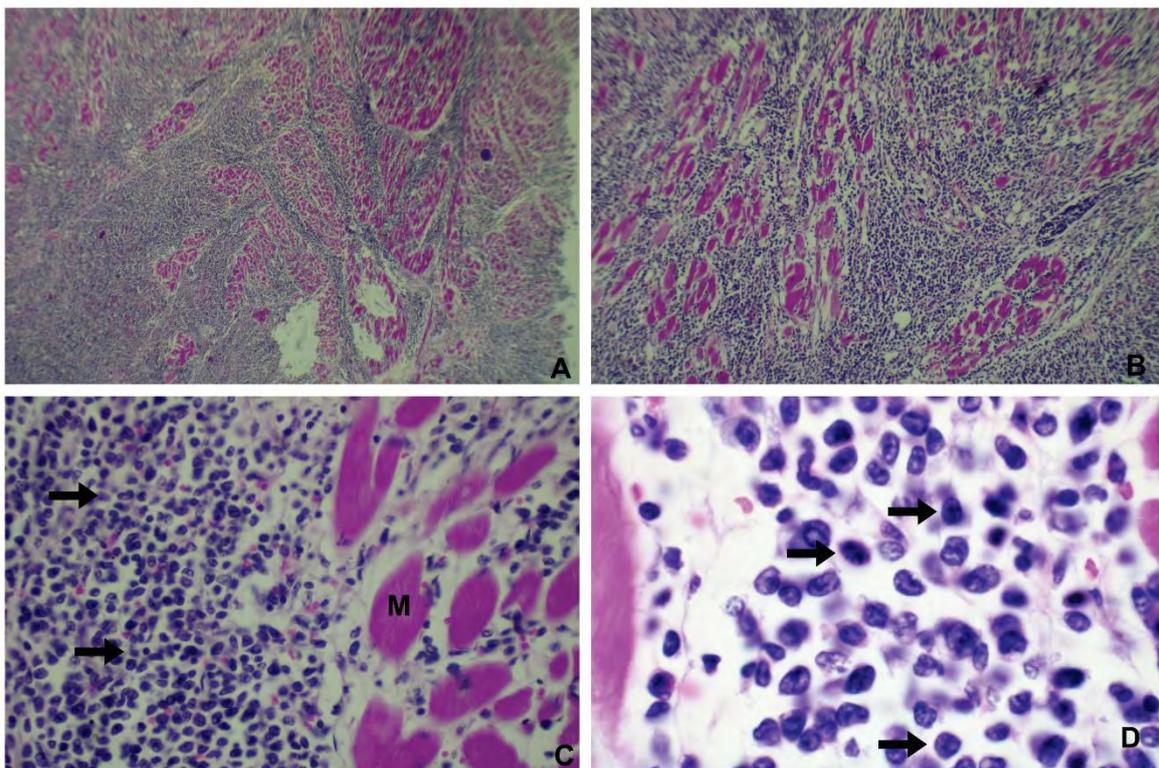


Figura 10. Miocardio. Tinción H-E

Descripción de la figura 10: **(A)** El miocardio presentó zonas basófilas infiltrando o sustituyendo las fibras musculares, con pérdida de la arquitectura del órgano (toma en 40x). **(B)** Las zonas basófilas corresponden a un infiltrado mononuclear (linfocitos) (toma en 100x). **(C)** Los linfocitos se encontraban distribuidos de manera desorganizada, presentando formas variadas (alargadas, con escotaduras), diferencia de tamaño, mientras que las fibras musculares pierden su detalle (toma en 4000x). **(D)** Los linfocitos presentaron un patrón de cromatina dispersa, núcleos de forma variable y abundante citoplasma y algunas células con mitosis atípicas (flechas) (toma en 1000x).

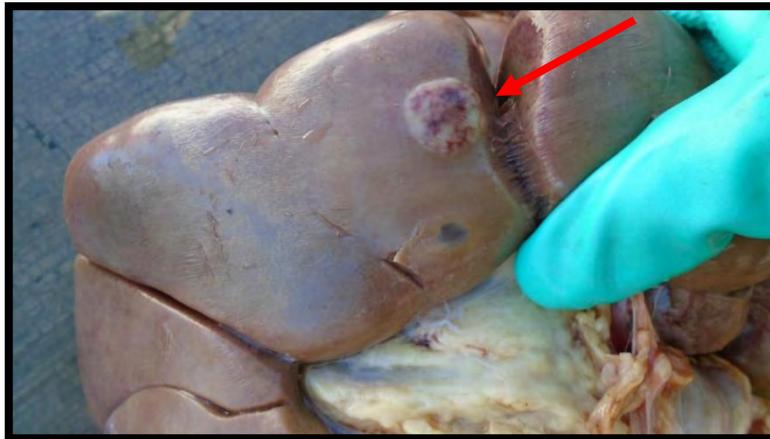


Figura 11. Riñón con nódulo tumoral (flecha).

Descripción de la figura 11. En la superficie renal se apreció una masa de aproximadamente 2 cm de diámetro, de forma redondeada, superficie firme y elevada, de color blanquecino, con impregnación difusa de sangre en su superficie. Al corte la masa penetraba el parénquima, con profundidad de aproximadamente 0.5 cm en la corteza.

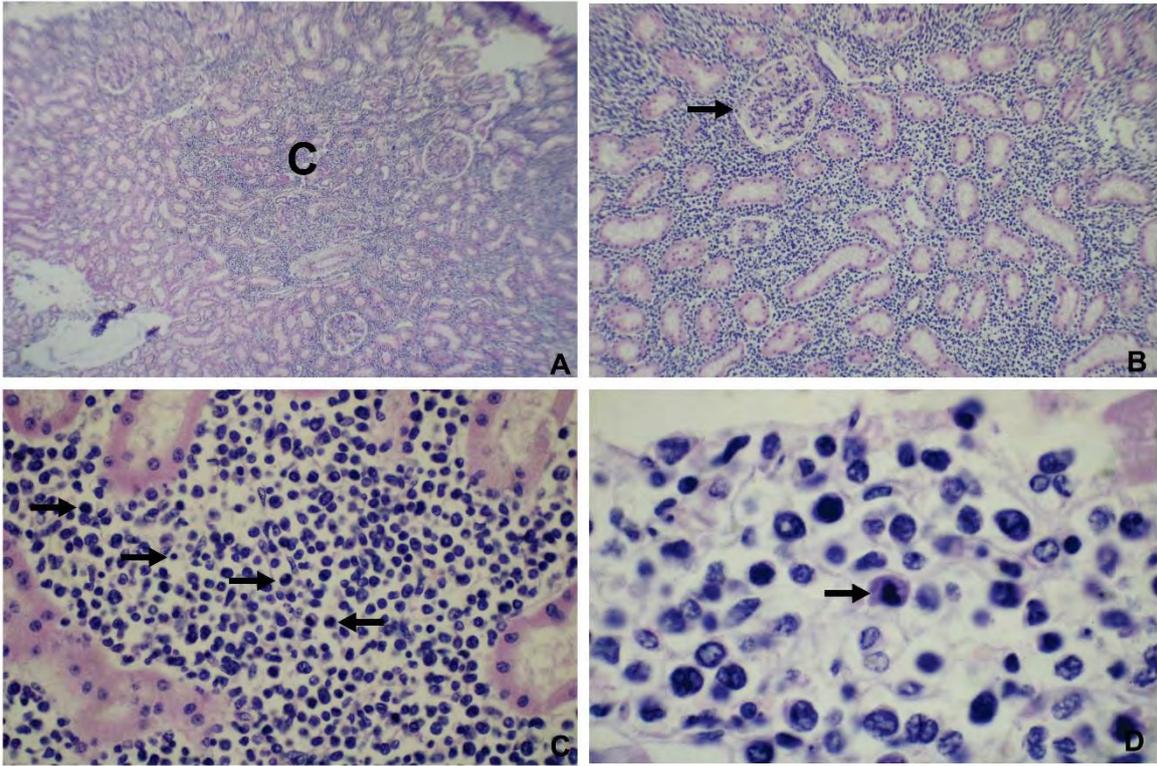


Figura 12. Riñón. Tinción H-E.

Descripción de la figura 12. **(A)** El riñón presentó infiltrado basófilo a nivel cortical (C) (toma en 40x). **(B)** El infiltrado corresponde a linfocitos, que se presentaron incluso dentro del glomérulo (flecha) (toma en 100x). **(C)** Se observó tumefacción celular en el epitelio de los túbulos contorneados proximales y distales, además de núcleos en picnosis. Por otro lado, los linfocitos presentes tenían variación en el tamaño y forma, que pierden su relación núcleo-citoplasma (flechas) (toma en 400x). **(D)** Se observaron linfocitos de formas irregulares, con diferente forma en sus núcleos y con presencia de mitosis atípicas (flechas) (toma en 1000x).

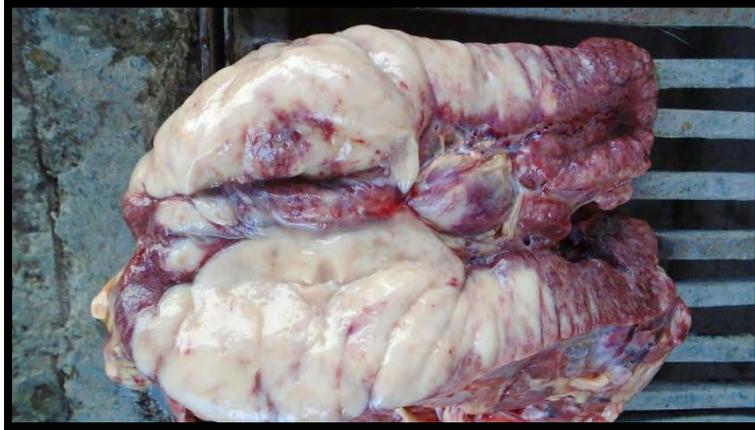


Figura 13. *Linfonodo iliaco.*

Descripción de la figura 13. El linfonodo iliaco se observó aumentado de tamaño (15 cm de largo x 7 cm de ancho), de superficie lisa y consistencia firme. Al corte se evidenció el parénquima de color blanquecino, desde corteza a médula, que ocupa aproximadamente el 70% del órgano.



Figura 14. *Linfonodo mesentérico.*

Descripción de la figura 14. Se observó entre 3 y 4 nodulaciones en el parénquima del órgano. Al corte presentaron un tamaño de entre 10 y 4 cm de diámetro, de consistencia firme. En una de las nodulaciones, al corte se observó un material de color amarillento de consistencia blanda, el cual se localizaba en uno de los extremos del linfonodo. Las otras nodulaciones

mostraron una coloración blanquecina, de consistencia firme y con presencia de líneas rojizas de manera focal.



Figura 16. Linfonodos mesentéricos.

Descripción de la figura 16. Se observaron tres linfonodos mesentéricos, de forma ovoide, con un tamaño de 10 cm de largo por 5 cm de ancho, de superficie lisa y turgente, con una coloración ligeramente amarillenta. Al corte, en los tres casos, se encontró un material blanquecino difuso que penetraba el tejido. El nódulo del centro marcado con una flecha, evidenció un contorno de tonalidad rojiza, así como múltiples probables hemorragias difusas que penetraban de la cápsula al parénquima.

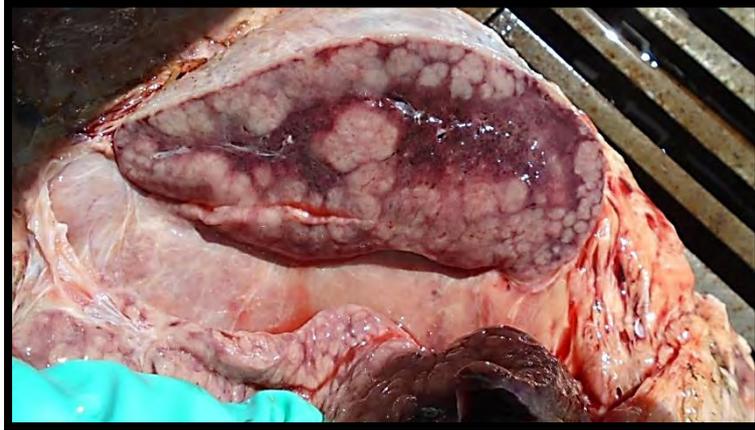


Figura 15. Linfonodo supramamario.

Descripción de la figura 15. Linfonodo supramamario, con aumento de tamaño, aproximadamente 12 cm x 9 cm, de consistencia firme en la superficie y color rosáceo. Al corte se observaron decenas de nodulaciones blanquecinas, algunas formando racimos confluentes, invadiendo tanto la corteza como la médula en un 80% de la superficie de corte.

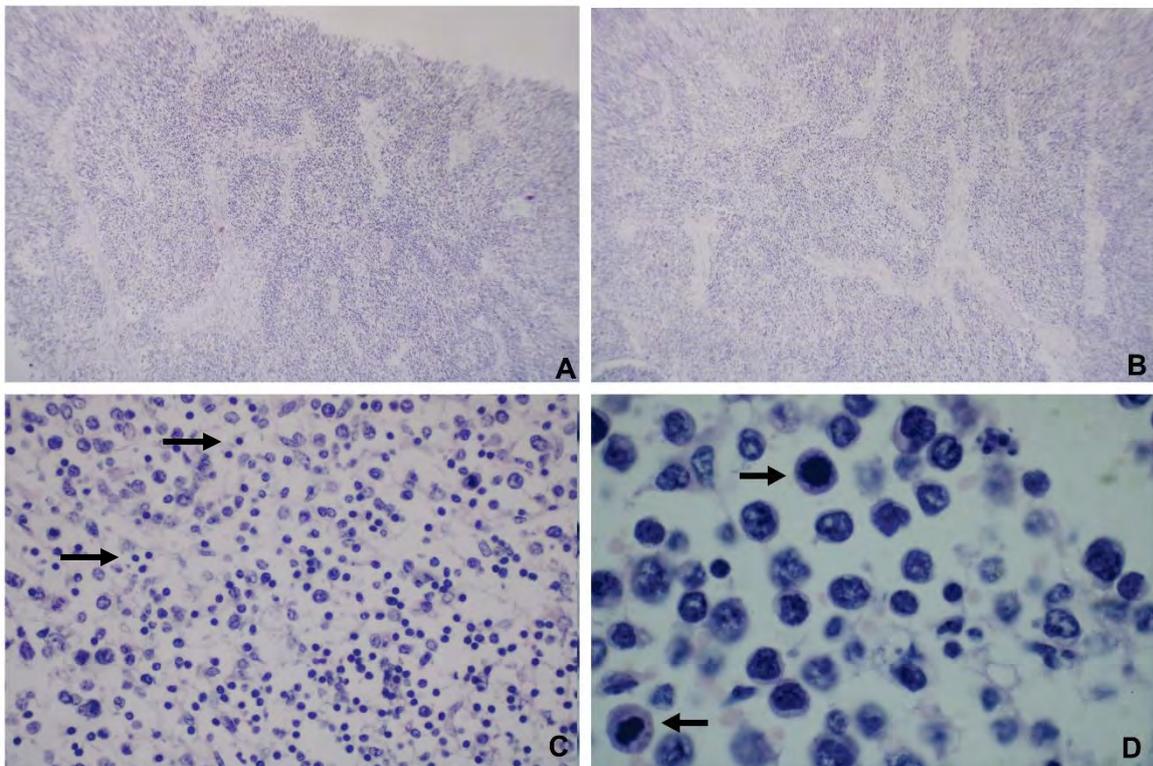


Figura 17. Linfonodo supramamario. Tinción H-E.

Descripción de la figura 17. **(A)** Se observó pérdida de la organización del linfonodo por la proliferación de linfocitos, los tabiques interfoliculares se aprecian con dificultad, no se delimitan la médula, la corteza ni los centros germinativos (toma en 40x). **(B)** Los linfocitos proliferan de manera desorganizada (toma en 100x). **(C)** Los linfocitos presentan tamaños diversos, con imágenes de tipo linfoblasto (flecha) (toma en 400x). **(D)** Se observaron células con policromasia y con mitosis atípicas (flechas) (toma en 1000x).

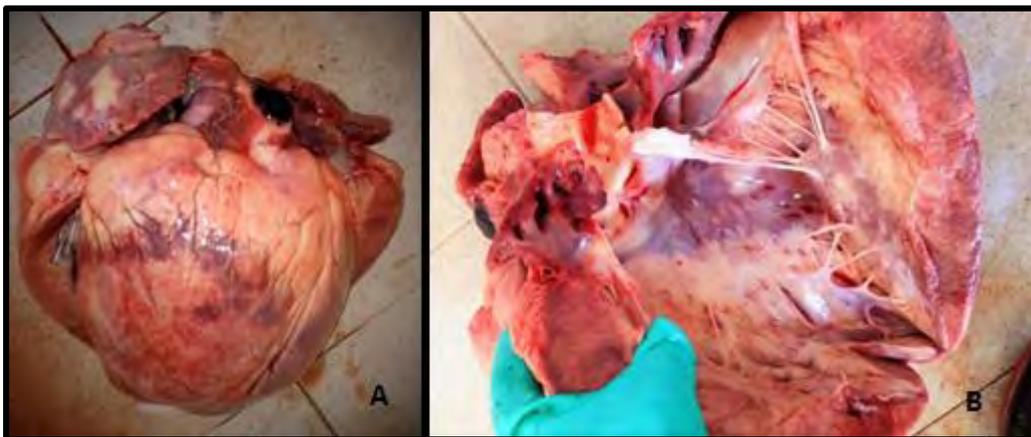


Figura 18. Corazón.

Descripción de la figura 18: **(A)** El corazón presentó forma redondeada, con engrosamiento del miocardio izquierdo. En la aurícula derecha se observaron decenas de placas sobresalientes de color blanquecino, de entre 0.5 a 2 cm. La pared ventricular presentó consistencia firme y color blanquecino, en el 60% del corazón. **(B)** . En el ventrículo izquierdo, al corte, las placas blanquecinas que se observaron externamente, invadieron la pared del miocardio hasta el endocardio mural, afectando el 70% de la pared ventricular.

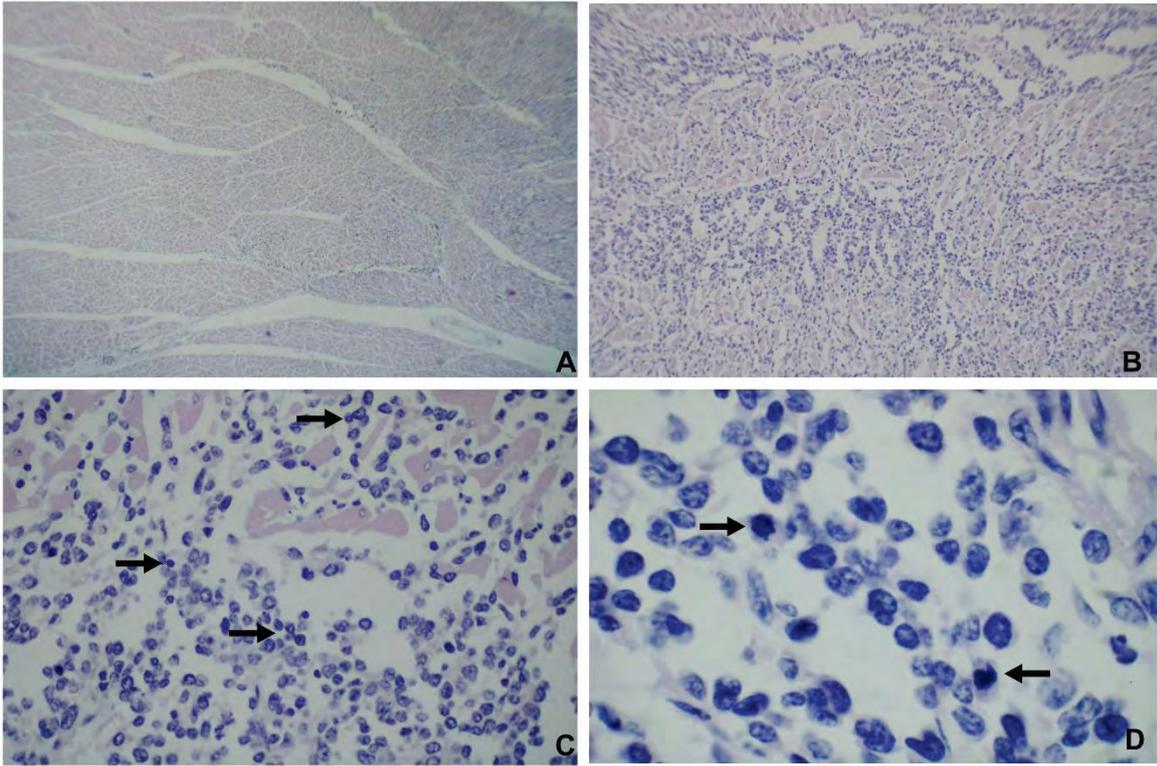


Figura 19. Miocardio. Tinción H-E

Descripción de la figura 19. **(A)** Se observó material basófilo multifocal, entre las fibras del miocardio (toma en 40x). **(B)** Células mononucleares de tipo linfocitario distribuidas de manera aleatoria en el tejido (toma en 100x). **(C)** Los linfocitos presentaron diverso tamaño, con un patrón de cromatina dispersa (toma en 400x). **(D)** También se observaron células con mitosis atípicas (flechas) (toma en 1000x).



Figura 20. Corazón.

Descripción de la figura 20. Se observó la presencia de un nódulo de aproximadamente 4.0 cm, de color blanquecino invadiendo en el miocardio izquierdo, de consistencia dura y de bordes bien definidos.

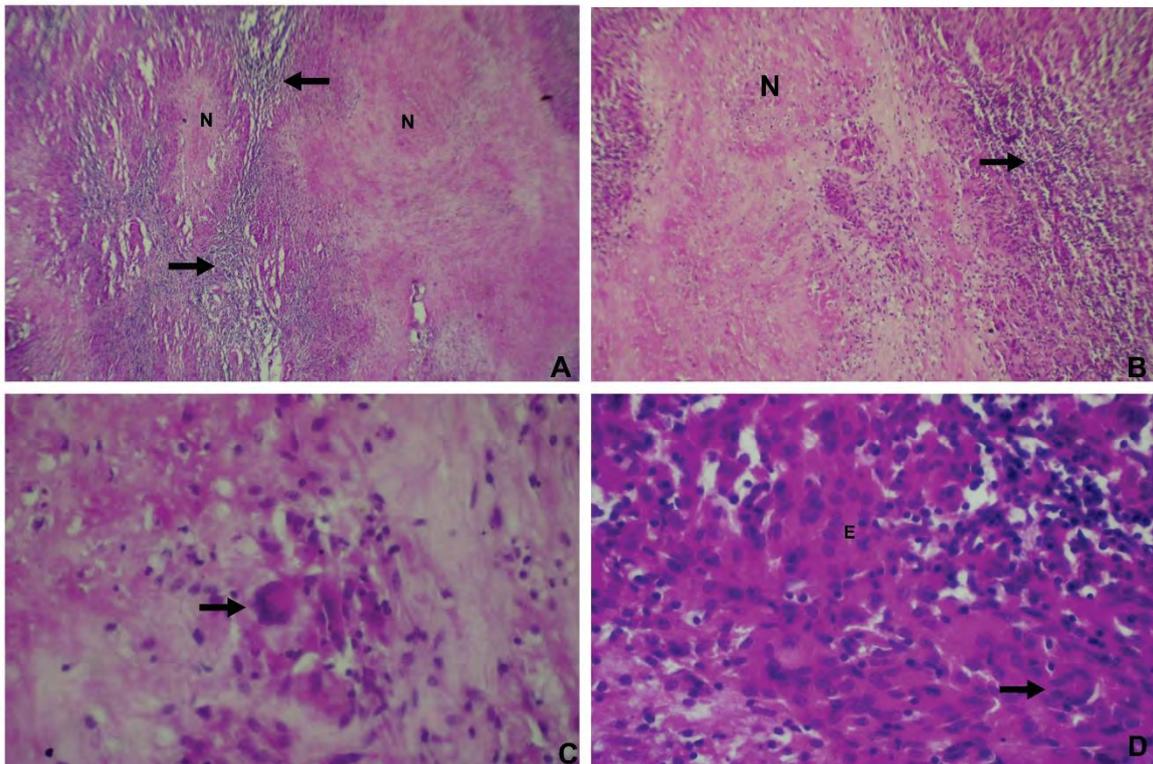


Figura 21. Miocardio. Tinción H-E.

Descripción de la figura 21. **(A)** El miocardio presentó pérdida del detalle de sus fibras musculares. También se apreciaron zonas rosáceas (N) rodeadas por un material basófilo

(flechas) (toma en 40x). **(B)** El material basófilo corresponde a células inflamatorias (flecha), mientras que las zonas rosáceas corresponden a células que han perdido su arquitectura y corresponden a necrosis caseosa (N) (toma en 100x). **(C)** En la periferia de la zona de necrosis, se observó la presencia de células gigantes multinucleadas tipo Langhans (flecha) (toma en 400x). **(D)** Se observaron células epitelioides (fechas) (toma en 400x).

Reacción en cadena de la polimerasa

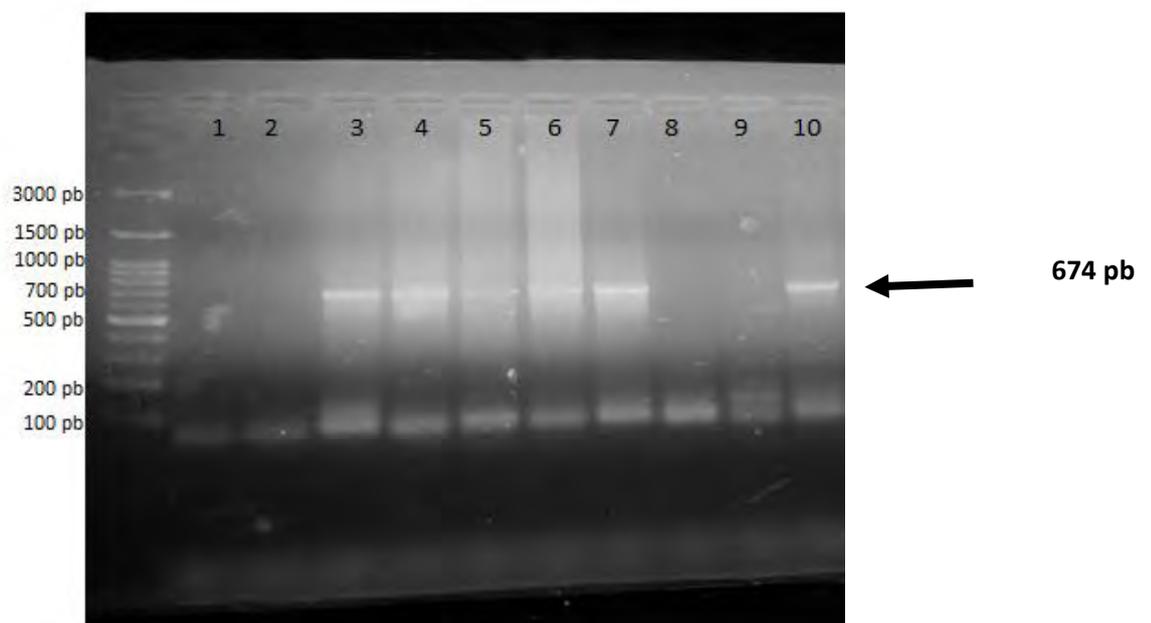


Figura 29. Visualización de la amplificación por PCR de productos de 674 pb de un fragmento del gen env del BLV separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio. Se evaluaron 10 muestras, una muestra por cada caso y solo los casos del 3 al 7 y el 10 fueron positivas ya que amplificaron bandas de 674 pb de nucleótidos.

De las 10 muestras que se evaluaron el 60% de ellas fueron positivas en PCR, demostrando así que los tumores en la mayoría de los tejidos de cada animal estaban relacionados con la infección con el virus de leucemia bovina.

Discusión

Estudios realizados en el 2009 demuestran una prevalencia del 66% de la enfermedad en el Estado de Hidalgo, específicamente en la cuenca lechera de Tizayuca (Zavaleta, 2009). En este estudio se hizo el diagnóstico posmortem de la enfermedad, solo se seleccionaron 10 casos de los 134 por presentar lesiones tumorales compatibles con LEB durante un tiempo de seis meses.

Los órganos comúnmente afectados son los linfonodos, por ser una neoplasia linfoide, pero en el caso del presente trabajo solo en siete de los diez casos de bovinos con tumores se observó la afectación en los linfonodos. En un estudio realizado en Japón en el cual se infectaron experimentalmente a ovinos con el virus de BLV, se encontraron casos en los cuales el linfosarcoma estaba en órganos no linfoides como fueron el corazón, riñón y el abomaso, pero no en los linfonodos; se considera que esto puede deberse a que algunos individuos presentan factores que inhiben la proliferación de células neoplásicas (Okada, et al., 2005), lo cual podría ser algo similar en los tres bovinos que no se identificaron los linfomas en tejido linfoide.

Otro órgano que comúnmente la literatura describe como frecuentemente afectado es el abomaso, identificando infiltrados de células tumorales acompañado de úlceras en la mucosa del órgano (Baruta, 2011). De los diez bovinos, en ocho de los casos se observó afectado el abomaso y solo en cinco de ellos adicional al infiltrado tumoral se observó una abomasitis ulcerativa.

En el caso del riñón se describe una frecuencia de afectación del 50%, presentando lesiones de carácter infiltrativo, además de hemorragias visibles en el órgano (Chamizo, 2005); no obstante, en el presente estudio solo en dos casos se identificó afectación en el riñón y las lesiones fueron focales, blanquecinas y pequeñas (2 cm de diámetro), esto puede deberse al estado avanzado del linfosarcoma en cada caso, ya que sólo en los casos más severos como fueron el caso cinco y seis se observó el riñón afectado.

Las lesiones características halladas a la necropsia son masas tumorales en varios órganos, de color blanquecino, de consistencia firme y sobresaliente y perdida de la arquitectura del órgano afectado, además de esto se observan hemorragias o focos de necrosis (Baruta, 2011). Estas descripciones fueron muy similares a las encontradas en los órganos analizados en el presente estudio.

Existen pocos reportes de hallazgos de linfosarcoma en esófago. En 1985, un estudio realizado en la cuenca lechera de Tizayuca, reportó cuatro casos de linfosarcoma con lesiones

en esófago (García, 1985). En el presente estudio solo se encontró un caso donde se observaron masas tumorales en la serosa del órgano.

En el caso de la muestra nueve, el corazón fue el único órgano que presentaba un infiltrado de aproximadamente 4 cm de diámetro, de color blanquecino y de consistencia firme, correspondiente a lo que se describe en la literatura. A partir del corte histológico se descartó que esa lesión fuera parte de un proceso neoplásico, debido a sus características (zona de necrosis multifocal con presencia de linfocitos no neoplásicos, células gigantes y epitelioides) que coincidían más con un granuloma. Sin embargo, esto solo descartó el proceso neoplásico mas no la presencia del BLV. Para ello, fue necesario la confirmación mediante la prueba de PCR en donde dicha muestra fue negativa, descartando totalmente que la lesión patológica estuviera vinculada a un proceso neoplásico por la presencia del virus de leucemia bovina.

Microscópicamente el linfoma se observa como un infiltrado de linfocitos de carácter neoplásico (hipercrómicos, con variaciones de tamaño y mitosis aberrantes) y que altera la arquitectura del órgano (Oguma, et al., 2017). Los casos uno al ocho y el caso diez, presentaban estas características por lo que el diagnóstico histopatológico en estos 9 casos fue de un linfoma. Para determinar que el linfoma estaba relacionado por la infección del BLV, fue necesario hacer el diagnóstico molecular, para ello varios autores han empleado la PCR con éxito, además de que es una prueba recomendada por la OIE (OIE, 2008).

La PCR es una prueba conveniente para detectar ADN proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo muy sensible además de rápida. En este trabajo se utilizaron para la prueba de PCR, siete muestras de tejidos de tumores congelados y tres muestras de tejidos en parafina. Las tres muestras en parafina resultaron negativas, mientras que de las otras siete muestras seis fueron positivas y en el caso nueve que en el examen histopatológico mostró características correspondientes a un granuloma, el resultado por PCR fue negativo. Es importante mencionar que dentro del diagnóstico diferencial de la enfermedad de LEB se encuentra la tuberculosis bovina, que provoca lesiones granulomatosas (Estrada, et al., 2004).

Las muestras tres a la ocho y la diez mostraron características que tanto macroscópicamente como microscópicamente correspondieron a un linfoma. Además de ello, resultaron positivas a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, confirmando que en estos casos el agente causal fue el virus de leucemia bovina.

Previo a realizar la PCR se hizo la extracción de ADN de las muestras uno, dos y ocho que correspondían a tejidos en parafina, mismos que resultaron negativos a pesar de que a la necropsia y en el examen histopatológico estas muestras coincidían con lo descrito en la

literatura. El tejido embebido en parafina se considera una fuente muy valiosa para los estudios moleculares (De Armas, et al., 2006). Sin embargo, la obtención de ADN de alta calidad a partir de estas muestras se considera una tarea difícil y además tiene varios inconvenientes. Algunos factores que pueden influir en la obtención de ADN de calidad están relacionados a que la parafina es una barrera física y el formaldehído facilita la presentación de entrecruzamientos entre los ácidos nucleicos y proteínas, lo que ocasiona inconvenientes durante la extracción de ADN e inhibe la PCR. Aunado a esto, las condiciones del proceso de fijación, sobre todo el pH extremadamente bajo limitan la extracción de ADN (De Guglielmo, et al., 2013) (Skage 2007; Paireder et al. 2013). Estos factores pudieron afectar el resultado de la PCR de las muestras en parafina.

Conclusiones

- La frecuencia de presentación de lesiones tumorales por el virus de leucemia bovina, en un periodo de seis meses, en la cuenca lechera de Tizayuca, fue del 4.47%.
- Los hallazgos morfológicos de los tumores encontrados en bovinos a la necropsia fueron altamente compatibles con lo descrito en la literatura acerca del linfosarcoma ocasionado por el virus de leucemia bovina.
- Las lesiones histopatológicas identificadas en los órganos del estudio fueron principalmente infiltrados de linfocitos, lo cual es compatible con los linfomas descritos por la infección del virus de leucemia bovina.
- De un total de 10 bovinos con presencia de tumoraciones sugestivas a infección por el virus de leucemia bovina solo en seis de ellas se demostró la presencia del ADN proviral por PCR.

Bibliografía

Andrews, H., 1990. Outline of clinical diagnosis in cattle, E.U.A.: Butterwoth & Co.

Annual report of European Union on bovine and swine diseases, 2012. Chapter 2, Enzootic Bovine Leukosis, [En línea] Available at: http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/bovine/docs/final_report_2012_en.pdf [Último acceso 11 Junio 2018].

Barrientos, R., 2002. Revisión bibliográfica, de la red y recopilación de imágenes y video de la enfermedad "Leucosis Enzootica Bovina". Tesis de licenciatura. FESC, UNAM. México.

Baruta, A., 2011. Leucosis Enzootica Bovina. Ciencia veterinaria, 1 (13), pp. 10-16.

Cancino, N. H., 2016. Detección molecular y genotipificación del virus de la leucemia bovina en los estados de Hidalgo, Jalisco y México. Tesis de Licenciatura. FESC. UNAM. México.

Chamizo, G. E., 2005. Leucosis Bovina Enzootica: Revisión Bibliográfica. [En línea] Available at: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070505.html> [Último acceso: 12 Febrero 2018].

De Armas, Y., 2006. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. buscar revista, 39(3), pp. 171-174.

De Guglielmo, Z., 2013. Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina sin el uso de xilol para la detección y tipificación de VPH. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 33(1), pp 83-86.

De la Sota, M. D., 2005. Manual de procedimientos: Leucosis Bovina Enzootica. Buenos Aires, Dirección Nacional de Sanidad Animal. SENASA 9:134

De Oliveira, C. H., 2016. Absence or Bovine leukemia virus (BLV) infection in buffaloes from Amazon and southeast region in Brazil. Preventive Veterinary Medicine, 129, pp. 9-12.

Estrada, C. C., Diaz, F. O., Arriaga, C. D. & Perez, R., 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Revista veterinaria México, pp. 225-235.

Fávila, d. A. R., 2014. Evaluación de la relación de títulos de anticuerpos y expresión de IL-4, IL-10, IL12 e interferón gamma, con el desarrollo de linfocitosis persistente en vacas infectadas con el virus de leucosis enzoótica bovina (vLEB). Tesis de maestría. México: UNAM.

- Feliziani, f., Martucciello, A., Iscaro, C. & Vecchio, D., 2017. Bovine leukemia virus: Experimental infection in buffaloes and evaluation of diagnostic test reliability. *Research in Veterinary Science*, 114, pp. 450-454.
- Frie, M.C., Coussens, P.M.. 2015. Bovine leukemia virus: A major silent threat proper immune responses in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 163, pp 103-114.
- García, J. G. G., 1985. Relación de sintomatología clínica y lesiones a la necropsia en bovinos Holstein-Friesian con leucosis bovina. Tesis de licenciatura. FESC. UNAM. México.
- Gasque, R. G., 2008. Leucosis Bovina. En: *Enciclopedia Bovina*. México: UNAM, pp. 173-175.
- González F.V.D.; Montero M.N.; Cerón T.F.; Cancino H.N.; García F.M.M.; Zavaleta J.H.N.; Hernández B.R.J.; García C.L.A., Tórtora P.J.L.; Martínez R.H.A.; Ramirez, A.H.2016. Seroprevalencia del virus de leucemia bovina en cinco regiones de producción lechera. En memorias del XL Aniversario del Congreso Nacional de Buiatría. México.
- Gutiérrez, G., 2011. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentine an dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 151, pp. 255-263.
- Hernández, D.Y., 2010. Asociación del locus BoLA-DRB3,2 con el virus de leucosis bovina en razas criollas y colombianas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Hernández, J. R., Mar, A., Hernández, J. Z. & Pawling, R. B., 2006. Leucosis enzoótica bovina. *Revista de ciencia, Biodiversidad y Tecnología Agropecuaria, AGROPECUS*, 3, pp. 14-36.
- Hopkins, S. G. & DiGiacomo, R. F., 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Food animal Retroviruses*, 13(1), pp. 107-127.
- Juopperi, T., 2004. Overview and lymphoma/lymphosarcoma. En: *Veterinary clinical pathology secrets*. pp. 81-95.
- Klintevall, K., Ballagi-Pordany, A., Näslund, K. & Belák, S., 1994. Bovine leukemia virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology*, 42, pp. 191-204.
- Lee, E., 2016. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, pp. 245-254.
- Limón, G.M.M., 2012. Prevalencia de leucosis y clamidofilosis en bovinos lecheros de Aguascalientes y Guanajuato. Tesis de licenciatura. FESC. UNAM. México.
- Moulton, J. E. & Harvey, J. W., 2002. *Tumors in domestic animals*. 4ta ed. Iowa: Iowa State Press.

Nekouei, O., 2015. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 119, pp. 105-113.

Nekouei, O., 2016. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 133, pp. 1-9.

Oguma, K., Suzuki, M. & Sentsui, H., 2017. Enzootic bovine leukosis in a two-month-old calf. *Virus Research*, 233, pp. 120-124.

Ohno, A., Takeshima, S.-n., Matsumoto, Y. & Aida, Y., 2015. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Research*, 210, pp. 283-290.

OIE, 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres. [En línea] Available at: http://www.oie.int/fileadmin/home/esp/Health_standards/tahm/2.04.11_Leucosis_bovina_enzootica.pdf [Último acceso: 20 Enero 2018].

Okada, K., 2005. Bovine Leukemia Virus High Tax Molecular clone experimentally induces Leukemia/Lymphoma in sheep. *Journal Veterinary Medicine Scientific*, 67(12), pp. 123-1235.

Paireder, S., Werner, B., Bailer, J., Werther, W., Schmid, E., Patzak, B., Cichna-Markl, M. 2013. Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal Biochem*, 439 (2), pp. 152–160.

Panei, C. J., Serena, S. M., Metz, G.E., Bravi, M.E., González, E.T., Echeverría, M.G., 2013. Analysis of the Px región of bovine leukemia virus in different clinical stages of Enzootic Bovine Leukemia in Argentine Holstein cattle. *Virus Research*, 17(1), pp. 97-102.

Pelzer, K. D., 1997. Economics of bovine leukemia virus infection. *Veterinary clinics of north America: Food Animal Practice*, 13(1), pp. 129-141.

Quiroz, M. A., 2007. Leucosis Viral Bovina. [En línea] Available at: <http://www.ammveb.net>clinica> [Último acceso: 4 Enero 2018].

Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. & Hinchcliff, K. W., 2012. *Medicina veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, caprino y equino*. 9na ed. Madrid: Editorial Mc Graw Hill.

Rama, G., 2012. Desarrollo y análisis comparativo de una nueva herramienta para el diagnóstico de la Leucosis Enzootica Bovina; impacto del descenso AC anti VLB circulantes en el periparto para el diagnóstico serológico. Tesis de maestría. Universidad de la República: Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias.

Reyes, D.S.,2003. Recopilación bibliográfica y elaboración de un CD-ROM sobre leucosis bovina. Tesis de licenciatura. FESC. UNAM. México.

Safari, R., 2017. Cis-drivers and trans-driver of bovine leukemia virus oncogenesis. *Current opinión in Virology*, 26, pp. 15-19.

SAGARPA, 2016. Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. *Diario Oficial de la Nación*.

SIAP, 2017. Boletín de leche , México: SAGARPA.

SE, 2012. Análisis del sector lácteo en México, México: Dirección General de Industrias Básicas.

Skage, M., Schander, C. 2007. DNA from formalin-fixed tissue: Extraction or repair? That is the question. *Mar Biol Res*, 3 (5), 289–295.

Trigo, F., Monroy, J. & García, R., 1993. Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Revista Veterinaria México*, 24 , pp. 21-25.

Tsutsui, T., Kobayashi, S., Hayama, Y. & Yamamoto, T., 2016. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 124, pp. 96-101.

Uckert, W., 1984. Bovine leukemia virus (BLV) - a structural model based on chemical crosslinking studies. *Virology*, 133(2), pp. 386-392.

Ugarte, M. A. O., 2012. Reporte de un caso clínico de leucosis enzoótica bovina. Informe de servicio social. FESC. UNAM, México.

Zavaleta, J. d. N., 2009. Respuesta serológica, carga viral y linfocitosis persistente en bovinos infectados por el virus de leucosis enzoótica bovina (vLEB). Tesis de maestría. México: UNAM.

Zavaleta, J. & García, D., 2017. La leucosis enzoótica bovina ¿es una enfermedad benigna?, En memorias del XLI Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, México.