

**Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología**

**"Efecto *in vitro* de los virus de Leucosis Bovina e
Inmunodeficiencia Bovina sobre la proliferación de los
linfocitos bovinos".**

**Tutor:
Dr. José A. Bonilla.
C.I.B.C.M.**

**Ivannia Atmetlla Salazar
carné 900343**

A Dios, a mi familia
y a mis amigos.

Agradecimientos

Agradezco de una manera muy especial a todas las personas que de una u otra forma me ayudaron a llevar a cabo este trabajo, en especial a:

- Dr. José Alberto Bonilla, por su tutoría en este trabajo y por toda la ayuda y apoyo que siempre me brindó.
- Dra. Laya Hun por su colaboración en la revisión del trabajo, por su apoyo y por todos los consejos.
- Dra. Libia Herrero y Dr. Willbert Alfaro por sus sugerencias a la hora de revisar y corregir el trabajo.
- Dr. Juvenal Feoli por su colaboración para llevar a cabo el presente trabajo.
- Personal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, especialmente al señor Roberto Sánchez por su colaboración en la toma de muestras.

Indice

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Índice	iii
Resumen	iv
Objetivos	1
Introducción	2
Marco teórico	4
Materiales y métodos	7
- Muestras de sangre	
- Cultivos celulares	
- Antígenos BLV y BIV	
- Mitógenos	
- Obtención de linfocitos	
- Inoculación de los cultivos celulares con virus	
- Ensayo de linfoproliferación	
- Ensayo de inmunosupresión	
- Western blot para la determinación de BLV	
- Determinación colorimétrica	
Resultados	13
- Número óptimo de linfocitos	
- Mitógeno seleccionado	
- Obtención de antígenos virales	
- Concentración óptima de antígenos virales	
- Determinación de linfoproliferación e inmunosupresión	
Discusión	20
Referencias	24

Resumen

Como consecuencia del impacto en la salud pública que han tenido los retrovirus humanos HTLV y principalmente el VIH que induce el SIDA, la investigación en este campo se ha intensificado mucho en los últimos 15 años. Los retrovirus han sido implicados en un amplio espectro de patologías en humanos y animales, y muchos de ellos inducen síndromes de inmunodeficiencia.

A pesar de que el BIV fue descrito inicialmente en 1972, fue hasta mediados de la década de los 80, que se demostró la importancia del BIV como problema de salud animal. Recientemente las investigaciones se han intensificado debido a la similitud de éste virus con el VIH, lo que lo convierte en un excelente modelo animal para investigaciones sobre la inmunopatología de la infección y desarrollo de vacunas, con la ventaja de que también induce inmunodeficiencia cuando se inocula en conejos. Hasta el momento no se cuenta con estudios adecuados sobre la inmunopatología de la infección en bovinos y no se sabe a ciencia cierta si es el BIV el que induce la inmunosupresión o es el BLV. En nuestra experiencia en Costa Rica, la mayoría de los animales tienen la doble infección, lo que hace difícil determinar si uno, otro, o ambos virus son responsables de la inmunosupresión.

Es por esta razón, que decidimos hacer el estudio *in vitro* con linfocitos de ganado seronegativo, los cuales se infectaron con BIV, BLV y con ambos virus simultáneamente para luego determinar la capacidad de proliferación de los linfocitos y así poder sacar conclusiones en cuanto a la capacidad inmunosupresora de cada virus.

Objetivos

Estudiar *in vitro* el comportamiento tanto del Virus de Leucosis Bovina como del Virus de Inmunodeficiencia Bovina con el fin de establecer si tienen o no capacidad inmunosupresora y si dicha inmunosupresión es dada por uno de los dos virus, o por ambos de una manera sinérgica.

Objetivos específicos:

1. Estandarizar un método colorimétrico para la determinación de proliferación de linfocitos bovinos.
2. Determinar la capacidad inmunosupresora de los virus de leucosis bovina (BLV) e inmunodeficiencia bovina (BIV) sobre los linfocitos bovinos estimulados con mitógenos.
3. Determinar si la capacidad de inmunosupresión es consecuencia de la infección por cada virus individualmente o si actúan sinérgicamente.

Introducción

Los retrovirus (RV) son un grupo de virus pertenecientes a la familia Retroviridae, la que se divide a su vez en tres subfamilias: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* y *Spumavirinae*. En animales el número de enfermedades causadas por estos virus es alto. En bovinos se han descrito por lo menos tres retrovirus, uno de cada subfamilia. Así el Virus de Leucosis Bovina (BLV) pertenece a la subfamilia *Oncovirinae* (Miller et al., 1988) y causa la leucosis bovina enzoótica, una enfermedad que puede presentarse sin manifestaciones clínicas; a veces presenta una fase de linfocitosis persistente y raramente llega a inducir linfosarcoma; el Virus de Inmunodeficiencia Bovina (BIV) pertenece a la subfamilia *Lentivirinae*, (Van Der Maaten et al., 1972; Boothe and Van Der Maaten, 1974), el cual muestra similitud genética y biológica con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV) (Gonda et al., 1987) y el Virus Sincicial Bovino, perteneciente a la subfamilia *Spumavirinae*. (Malmquist et al., 1968).

Las infecciones por retrovirus en humanos y animales han sido extensamente estudiadas. Desde el descubrimiento del Virus de la Leucemia de Células T (HTLV) (Poiesz et al., 1980) y posteriormente la aparición del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Barre et al., 1983), el interés por el estudio de los retrovirus aumentó notablemente.

Se han buscado modelos para los ensayos y el posterior desarrollo de vacunas, no sólo para humanos, sino también para animales, (Letvin, 1992).

En la inmunosupresión causada por los retrovirus, el espectro de parámetros celulares y humorales alterados, así como la rapidez y grado de descenso de los linfocitos depende de la relación huésped-virus.

Existe con frecuencia un paralelismo estrecho entre susceptibilidad a las acciones oncogénicas e inmunosupresoras del virus. Las bases genéticas y fenotípicas de resistencia a la inmunosupresión causada por los retrovirus han sido hasta ahora poco estudiadas.

Por lo general, la replicación viral se lleva a cabo antes de que se presente la inmunosupresión. Sin embargo, en algunos modelos, se ha observado cierto grado de supresión aún cuando la replicación viral inició días después de la inoculación del virus. La inmunosupresión puede desarrollarse poco después de la infección; pero en casos de tumores avanzados inducidos por oncovirus, es más severa cuando aumenta el tiempo de infección. Este hecho es de interés por la latencia prolongada que caracteriza a las infecciones por VIH.

Se ha propuesto que tanto el BLV como el BIV causan inmunosupresión en el animal infectado, pero no se sabe con certeza si dicha inmunosupresión

es producida por un sólo virus o por la acción sinérgica de ambos. En Costa Rica, debido a que por lo general los animales están infectados simultáneamente con ambos virus, se ha dificultado su estudio. (Hidalgo.,1994)

Este trabajo se diseñó para estudiar el efecto de ambos virus sobre linfocitos de bovinos seronegativos, infectados *in vitro* con cada uno de los virus y con una mezcla de ambos. Con esto se pretende entender mejor su comportamiento y extrapolar posibles actividades inmunosupresoras; lo cual tiene mucha importancia debido a que tanto el BIV como el BLV se encuentran presentes en un alto porcentaje de los hatos de leche y de carne de Costa Rica. (Hidalgo., 1994)

Marco teórico

Los retrovirus son una familia de virus ARN que infectan vertebrados y que se transmiten tanto vertical como horizontalmente. Las consecuencias patológicas de la infección por retrovirus son diversas: muchos retrovirus no son patogénicos, mientras que algunos inducen enfermedades crónicas (con largos períodos de latencia) entre las que se incluye cáncer e inmunodeficiencias. (Varmus, 1988)

Los retrovirus se caracterizan porque se replican a través de un intermediario de ADN, en un proceso mediado por una ADN polimerasa ARN-dependiente codificada por el virus, llamada transcriptasa reversa. Los retrovirus también codifican las enzimas que dirigen la integración del genoma viral en el ADN de la célula huésped. El genoma viral integrado se llama " provirus " y sirve como patrón para la síntesis tanto de ARN genómico viral como de los ARN mensajeros. (Varmus, 1988)

Los retrovirus son de morfología heterogénea con tamaños entre 90 y 130 nm de diámetro. Tienen dos moléculas idénticas de ARN de banda simple y de polaridad positiva que se encuentran envueltas en un nucleoide protéico, el cual a su vez está rodeado por una membrana lipídica. La membrana del virus es tomada de la membrana celular de la célula huésped durante el proceso de " gemación " de las partículas virales. La membrana contiene glicoproteínas de transmembrana codificadas por el virus, éstas se proyectan hacia el exterior de la membrana y se observan como espículas al microscopio electrónico. Las moléculas de ARN viral tienen una " cap " en el extremo 5' y una cola de poliadeninas en el extremo 3'. Cerca de los extremos tiene un complicado sistema de genes reguladores que controlan la iniciación y progresión de la síntesis de ADN, integración, transcripción del provirus en ARN, procesamiento y empacamiento de partículas virales.

El intermediario de ADN posee en cada extremo dos secuencias largas de terminación (LTR) que se forman por duplicación de las secuencias U3 y U5. Los LTR son importantes para la integración del retrovirus en el ADN de la célula huésped. El provirus puede permanecer latente integrado en el núcleo de la célula blanco por mucho tiempo, hasta que su expresión es inducida por diferentes factores, tanto celulares como exógenos. (Varmus, 1988)

El BLV es el retrovirus bovino mejor caracterizado (Ferrer, 1979., Malmquist., Van Der Maaten., Boothe, 1968., Cockerell et al, 1992). Este virus fue aislado por primera vez de linfocitos periféricos de un animal con linfosarcoma (Miller et al, 1969).

El BIV fue aislado por primera vez por Van Der Maaten y colaboradores en 1972 a partir de leucocitos y tejidos de una vaca Holstein con linfocitosis persistente, hiperplasia folicular generalizada, lesiones del sistema nervioso central, debilidad progresiva y emaciación. El aislamiento se produjo durante la búsqueda del agente causal del linfosarcoma bovino.

En Costa Rica el BIV fue diagnosticado por Hidalgo y colaboradores en 1994 en hatos de leche. Luego se aisló una cepa de BIV(CR1) (Hidalgo y col, 1994) la cual presentó en Western blot el mismo patrón de bandas que el virus de referencia R29.

Materiales y Métodos

Materiales

- **Muestras de sangre**

Las muestras de sangre necesarias para extraer los linfocitos para el estudio fueron suministradas por la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Para dicho propósito se seleccionó una ternera de 9 meses de edad, raza Holstein, la cual está seronegativa para ambos virus y que se encuentra permanentemente en dicha Escuela.

- **Células.**

Células FLK (riñón fetal de oveja)

Se utilizó la línea FLK infectada con BLV, las cuales se cultivaron con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 50 ug/ml de estreptomisina, 100 UI/ml de penicilina, 2 mM de glutamina, 5 mM de 2- mercaptoetanol, 10 mM de solución MEM de aminoácidos esenciales (Sigma), 45 mM de bicarbonato de sodio, 0.8 mM de glucosa y 25 mM de N-(2-hidroxitietil) piperazina-N-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES).

Células EREP (epitelio de embrión de conejo)

Las células se cultivaron de la misma manera que las anteriores.

Ambas líneas celulares se incubaron a 37°C en cámara húmeda y con una atmósfera al 6% de CO₂.

- **Antígeno de BLV y BIV.**

Sobrenadantes de los cultivos celulares se clarificaron a 10.000 g por 30 minutos a 4°C y luego se ultracentrifugaron a 90.000 g por 3 horas en un rotor Beckman type 28 a 4°C. El botón de partículas virales se resuspendió en 1 ml de solución balanceada de fosfatos de pH 7.2 (PBS) estéril.

- **Mitógeno**

Se utilizaron soluciones de Fitohemaglutinina-M (PHA-M, Sigma) y de Concanavalina A (Con-A, Sigma), las cuales se titularon en concentraciones finales entre 1 y 50 ug/ml.

Métodos.

Obtención de linfocitos.

Se utilizó sangre arterial o venosa obtenida en tubos estériles al vacío y anticoagulada con heparina. Las muestras de sangre se trasladaron lo antes posible al laboratorio para separar las células mononucleares por medio de un gradiente de Ficoll Hypaque. Se procedió a diluir la sangre 1:2 con PBS y se colocaron sobre un colchón de 2 ml Ficoll-Hypaque 1.044 (Sigma) al 5%. Se centrifugó a 1.800 rpm por 45 minutos a 20°C. La banda de células mononucleares se transfirió a otro tubo cónico y se lavó con PBS estéril pH 7.2. Posterior a los lavados, se resuspendió el botón de células en RPMI (Sigma) sin suero fetal bovino y sin rojo de fenol, suplementado de igual forma que el DMEM. Se contaron en cámara de Neubauer diluidos 1:2 en colorante azul tripán para verificar viabilidad y se ajustaron a 1×10^5 , 2.5×10^5 y 5×10^5 células por ml para determinar la concentración adecuada para el ensayo.

Inoculación de los cultivos celulares con virus.

Las líneas celulares se cultivaron en botellas de plástico de 150 ml. con 25 ml. de medio DMEM y 5 ml de BLV y BIV respectivamente. Se hicieron pasajes de las líneas celulares hasta detectar en el caso del BIV algún efecto

citopático y en el caso del BLV un Western blot positivo. Estos cultivos positivos se siguieron cultivando hasta obtener un volumen de sobrenadante de 100 ml. Aproximadamente.

Ensayo de Linfoproliferación.

Se colocaron por triplicado 200 μ l de las suspensiones de linfocitos preparadas anteriormente, en placas de 96 pozos fondo en " U ". Se agregaron Con A y PHA como mitógenos en diferentes concentraciones (1, 5, 10, 12.5, 25, 50, μ g/ml) para determinar tanto la concentración mas adecuada, como el mitógeno que produce la máxima estimulación.

Los linfocitos se incubaron a 37°C y en presencia de una atmósfera al 6% de CO₂ por 48 horas.

Ensayo de Inmunosupresión

Para determinar si los virus antes mencionados tienen o no capacidad inmunosupresora, se colocaron por triplicado, en las placas de 96 pozos preparadas anteriormente, concentraciones de 2, 5 y 10 mg/ml de cada virus en forma individual y de ambos virus juntos. Para determinar las concentraciones óptimas de virus a utilizar, se hizo una curva de calibración con albúmina con concentraciones de 5 a 25 mg/ml y se

interpolaron las concentraciones de los virus. Las concentraciones de proteínas virales a utilizar deben ser menores de 25 mg/ml para evitar estimulaciones inespecíficas.

Western blot para la determinación de BLV

Se realizó una electroforesis siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970) en geles discontinuos de poliacrilamida (PAGE) con 5% de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se utilizó un gel espaciador al 5% y un gel separador al 10%. La electroforesis de las proteínas virales se realizó en una cámara electroforética (SIGMA) a una corriente constante de 20 mA, por aproximadamente 2 horas. Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron en una cámara de transferencia a hojas de nitrocelulosa con un buffer de pH 8.3 de 0.025 M de Tris, 0.19 M de glicina y 20% de metanol. Se aplicó una corriente constante de 150 mA por 4 horas. Posteriormente se hicieron lavados del papel de nitrocelulosa con una solución de PBS, Tween 20 y caseína al 1% (buffer de lavado) durante toda la noche.

Al día siguiente, se puso a reaccionar con un suero positivo para BLV por 2 horas, se hicieron 3 lavados y posteriormente se agregó proteína G peroxidasa (diluida 1:500 en buffer de lavado) y se incubó toda la noche a

4°C. Para revelar la reacción se utilizó el sustrato 3,3 diamino-benzidina (DAB) a una concentración de 0.5 mg/ml en PBS, 0.5 ml. de DMSO y 0.03% de peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con ácido clorhídrico (HCL) 1 mM cuando se observaron bandas de color café-rojizo.

Determinación colorimétrica

Se utilizó una modificación del método descrito por Mesén y colaboradores. (Mesén et al,1993)

Para tal fin, se agregaron 50 ul por pocillo de una solución fresca de la sal de tetrazol 2,3 bis (2-methoxi-4-nitro-5-sulfofenil) 5 fenilaminocarbonil 2H-tetrazol hidróxido (XTT) a una concentración de 1 mg/ml en PBS estéril y a 37°C y como catalizador se utilizó N- metilfenacina metasulfato (PMS) a una concentración de 0.01-0.02 M en PBS estéril, a 37°C. Las células se incubaron de nuevo por 2 horas a 37°C en oscuridad y luego se cuantificó el cambio en el color en un lector Dyno tech (Kinetic Analyzer, Diagnostic Products Corporation) a una longitud de onda de 490 nm.

Resultados

Número óptimo de linfocitos

Las determinaciones iniciales del número óptimo de linfocitos por pozo, para la estandarización del método, dieron como resultado que el uso de 500.000 células por mililitro mostraba la mayor diferencia entre linfocitos estimulados y linfocitos no estimulados.

Mitógeno seleccionado

Se hicieron experimentos por triplicado para determinar el mitógeno que produce la máxima estimulación y la concentración más adecuada del mismo.

Se determinó que el mejor mitógeno para estimular linfocitos bovinos es la PHA-M, a una concentración de 10 ug/ml

Obtención de antígenos virales

Para la obtención de los antígenos virales se utilizaron cultivos de dos líneas celulares: células FLK para la obtención de BLV y células EREP para BIV. Estas células son permisivas a la replicación del virus.

La replicación del BIV en las células EREP se evidenció por el efecto citopático característico que se muestra en la fotografía 1.



Fotografía 1. Efecto citopático característico producido por el BIV en un cultivo de células EREP. Se observa una inducción de sincicios, característica de la infección productiva, debido a la fusión celular inducida por el virus.

Por otra parte, la replicación del BLV se evidenció por medio de Western blot, como se muestra en la fotografía 2.



Fotografía 2. Western blot del virus de leucosis bovina utilizado para los experimentos (3) y la cepa de referencia (2).

Los antígenos virales clarificados y ultracentrifugados se utilizaron para realizar las pruebas de linfoproliferación.

Obtención de la concentración óptima de antígeno viral

Se determinó que las concentraciones óptimas de antígenos virales eran de 2.0, 5.0 y 10.0 mg/ml.

Determinación de linfoproliferación e inmunosupresión

La linfoproliferación se determinó colocando linfocitos con mitógeno y sin virus, la densidad óptica que se obtuvo corresponde al 100% de estimulación.

Las figuras 1 y 2 muestran los patrones de inhibición, expresados en porcentaje, de las pruebas de inmunosupresión. En la figura 1, los porcentajes de inhibición de la estimulación van de un 200% a un 270% para el caso del BLV; la mayor inhibición se presenta cuando la concentración viral es de 10 mg/ml. Para el caso del BIV los porcentajes de inhibición varían entre un 186% hasta un 245%, presentándose también la mayor inhibición cuando la concentración de BIV es mayor. Cuando se utilizaron los dos virus juntos, los porcentajes variaron entre un 184% y un 214%, sin embargo, en este caso, la concentración viral de 5.0 mg/ml presentó menor inhibición que la concentración de 2.0 mg/ml.

En la figura 2, los porcentajes para BLV variaron de un 72% hasta un 145%, correspondiendo la mayor inhibición con la mayor concentración viral. En el caso del BIV, los porcentajes van de un 70% a un 106%, sin embargo, la concentración de 5.0 mg/ml presentó la menor inhibición; y la mezcla de ambos virus presentó inhibiciones que van desde un 69% hasta

un 85%, presentándose la menor inhibición a una concentración de antígeno viral de 10.0 mg/ml.

Para la obtención de dichos porcentajes se utilizaron como blancos linfocitos sin mitógeno (0% de estimulación) y se calculó la diferencia con los linfocitos con mitógeno pero sin virus (100% de estimulación). Para corroborar que restos de los cultivos celulares no eran responsables de dicha inmunosupresión, se colocaron linfocitos con clarificados de las células sin infectar para ver el efecto celular sobre los linfocitos. Esto pudo llevarse a cabo solamente con las células EREP, ya que las células FLK son una línea celular infectada persistentemente con BLV.

Como se puede observar, tanto el BIV como el BLV por separado como ambos virus juntos inducen supresión, en un mayor o menor grado.

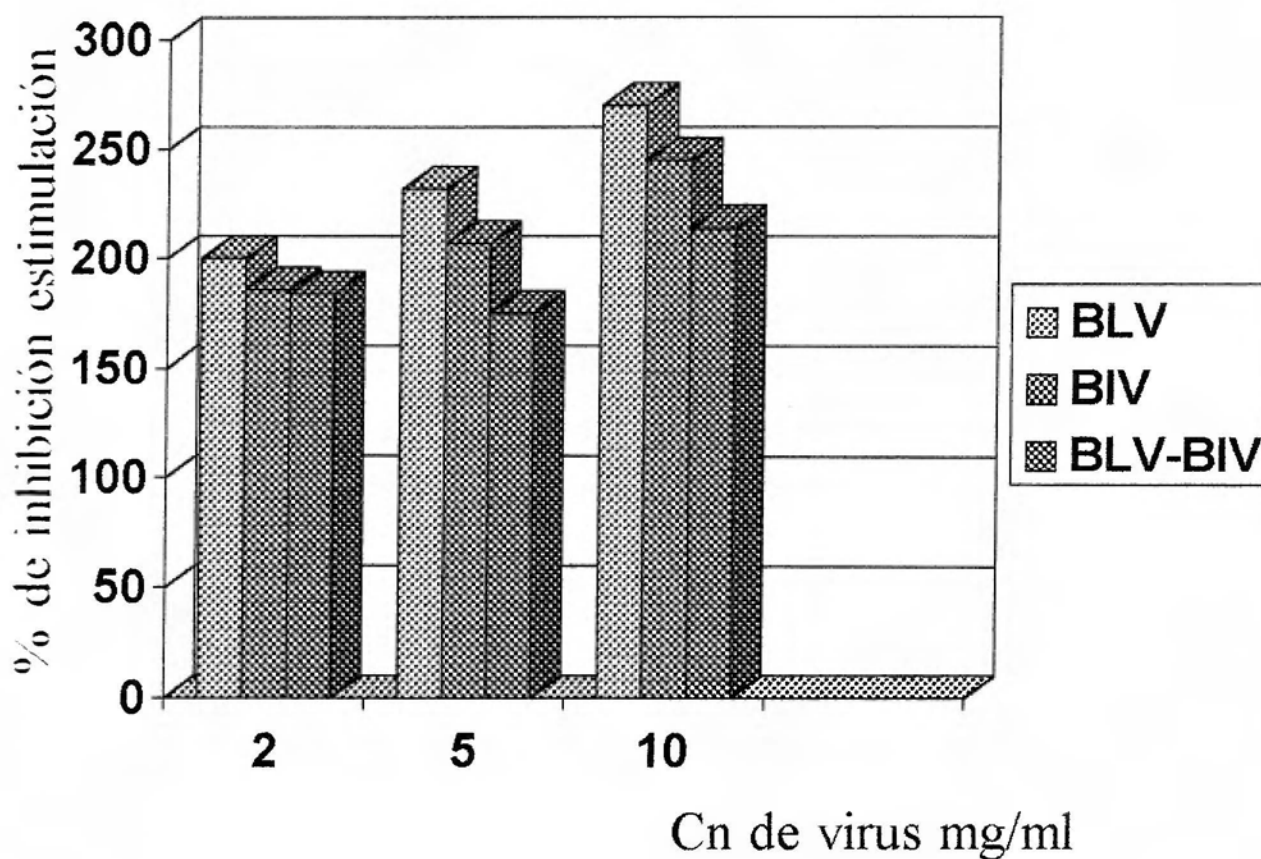


Figura 1: Gráfico del porcentaje de inhibición de la estimulación linfocítica frente a diferentes concentraciones de virus.

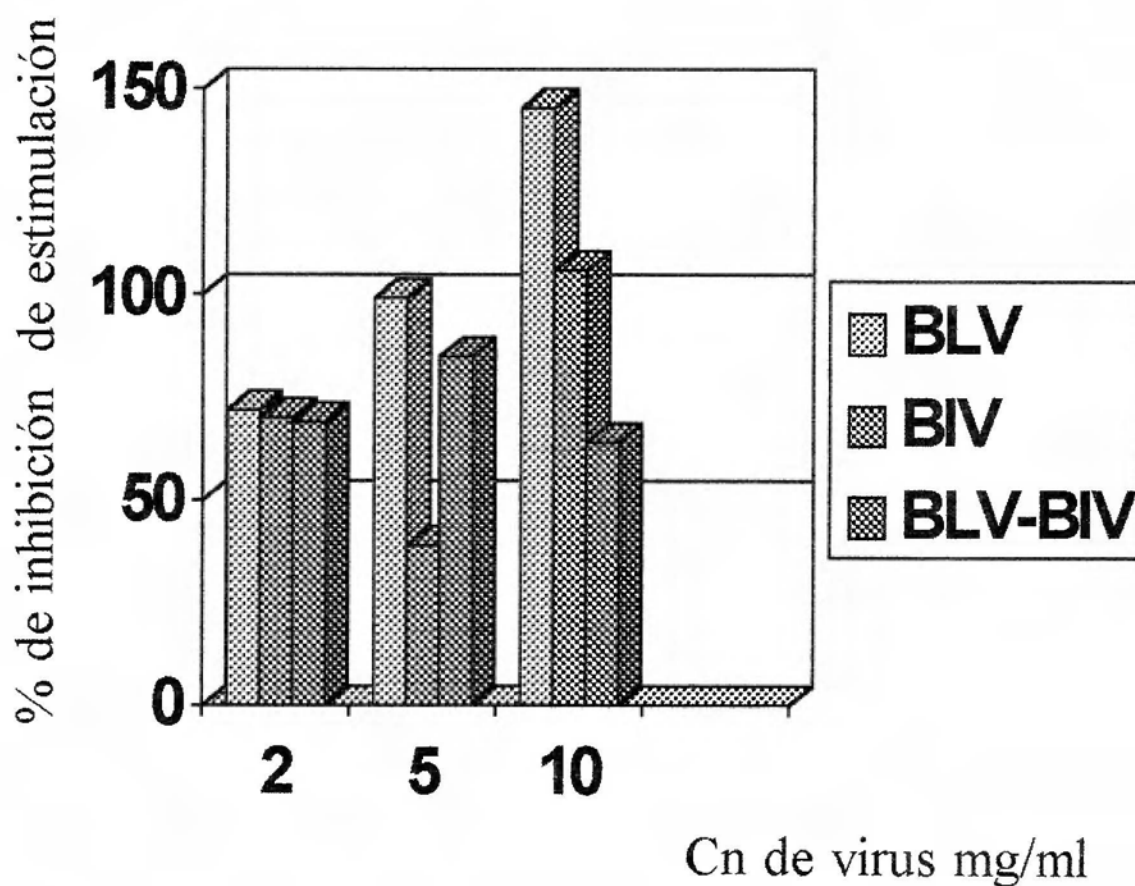


Figura 2: Gráfico del porcentaje de inhibición de la estimulación linfocítica frente a diferentes concentraciones de virus.

Discusión

El uso de un método colorimétrico que utiliza sales de tetrazol, como en este caso el XTT, permite determinar claramente diferencias medibles entre linfocitos estimulados y no estimulados. Este ensayo, que es llevado a cabo en placas de microtítulo con pipeteadores de repetición y un lector de ELISA, ofrece mayores ventajas en cuanto a costo y seguridad que los ensayos que utilizan la incorporación de compuestos radiactivos, tal como lo hacen los métodos de referencia, los cuales se basan en la incorporación de isótopos como la timidina tritiada ($^3\text{H-Tdr}$), un precursor de un nucleósido, dentro de las nuevas cadenas de ADN sintetizadas. La cantidad de $^3\text{H-Tdr}$ incorporada es luego determinada por conteo en líquido de centelleo.(Stites, DP., Stobo et all,1982). Los métodos radioactivos pueden ser parcialmente automatizados, manejar un número de muestras moderadamente grande y por ser muy sensibles son los que más se han usado tanto para el diagnóstico como para la investigación. Sin embargo, se deben tener en cuenta los riesgos que conlleva el trabajo con radioactividad, tanto para el medio ambiente como para el operador. El método colorimétrico para medir linfoproliferación es sencillo, confiable y económico y se recomienda su uso en para el área hospitalaria tanto para

apoyar el diagnóstico de problemas inmunológicos como para la investigación.

Se determinaron diversos factores que se deben tomar en cuenta a la hora de realizar las pruebas, entre ellos, el anticoagulante a utilizar, ya que se determinó que la heparina es el anticoagulante que produce menos daño a los linfocitos, ya que cuando se utilizó como anticoagulante ADC, los linfocitos no se estimulaban debido a la alta toxicidad del mismo. En un principio, los linfocitos extraídos se congelaron en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% para usarlos en las pruebas posteriores y obtener así la máxima homogeneidad en cuanto a las muestras, sin embargo, una vez descongelados no respondían a los mitógenos de la misma forma que los linfocitos recién extraídos.

El tiempo de incubación con el XTT y el número de células cultivadas influyen en forma importante en la señal de la densidad óptica. Según los resultados, el número de linfocitos adecuado para observar la mayor diferencia entre las densidades ópticas de los linfocitos estimulados y no estimulados es de 500.000 células por pozo, mientras que el método colorimétrico de referencia estandarizado por Mesén y colaboradores para linfocitos humanos utiliza menor número y obtiene buena estimulación.

El tiempo óptimo de incubación con XTT fue de 2 horas a 37°C y en oscuridad. El estado metabólico de las células influye en la cantidad de XTT reducido y por lo tanto en la intensidad y tiempo en que se desarrolla el color, por esto, a mayor actividad celular es necesario menos tiempo para reducir la misma cantidad de sustrato.

Aumentos en las densidades ópticas o falsos positivos podrían ser el resultado de una contaminación del cultivo debido al hecho de que las bacterias también pueden reducir el XTT.

Se debe tener especial cuidado al preparar la solución de XTT en el momento de usar (solución fresca) ya que es sensible a la luz, además es necesario utilizar medio de cultivo sin rojo de fenol, pues éste interviene en la absorbancia del color final que es un tono anaranjado-rojizo.

Como se pudo observar en los gráficos, ambos virus por aparte producen supresión, y la mezcla de ambos producen mayor supresión, sin embargo se debe tomar en cuenta que en estos casos la cantidad de virus agregada es mayor.

Debido a los resultados obtenidos y a que se analizaron pocas muestras de un solo animal, se deben considerar estos resultados como preliminares y continuar los estudios, ya que si bien se pudo demostrar la supresión que producen los virus, el comportamiento no es claro debido a que en los

experimentos se presentaron dos patrones de inmunosupresión, y no se puede generalizar a todo el ganado. Las variaciones en los porcentajes de inhibición de la estimulación de un experimento a otro se pueden deber a condiciones propias de la vaca, tales como presencia de infecciones, estados de estrés y aplicación de tratamientos experimentales en la Escuela de Veterinaria.

Referencias

1. AMBORSKY, G.F., J.L. lo y C.L. Seger, 1989: Serological detection of multiple retroviral infections in cattle: Bovine Leukemia Virus, Bovine Syncytial Virus and Bovine Visna Virus. *Vet. Microbiol.* 20, 247-253.
2. BARRE, F., CHERMAN JC, REY F., et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-871.
3. BENDINELLI, M., D. MATTEUCCI and H. FRIEDMAN, 1985: Retrovirus induced acquired immunodeficiencies. *Advan. Can. Res.* 45: 125-181.
4. BOOTHE, A.D y VAN DER MAATEN, 1974: Ultrastructural studies of a Visna like syncytial-producing virus from cattle with lymphocytosis. *J. Virol.* 13, 197-204.
5. BOYUM, A, 1968: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scan.J Clin. Lab. Invest.* 21 (suppl.B9), w1-114.
- BROWLIE, J.,M.E. COLLINS y P. HEATON, 1994: Bovine immunodeficiency-like virus, a potential cause of disease in cattle? *Vet. Rec.* 134, 289-291.

6. CARPENTER, S.,L.D. MILLER, S. ALEXANDERSEN, C.A. WHETSTONE,M.J. VAN DEER MAATEN, B. VIUFF, Y. WANNEMUHLER, J.M. MILLER y J.A ROTH, 1972: Characterization of early pathogenic effects following experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *J. Virol.* 66. 1074-1083.
7. COCKERELL, G.L., H. ENNIS y M.A GONDA. 1992: Seroprevalence of bovine virus in dairy cattle herd. *Vet. Microbiol.* 31. 109-116.
8. DIGIACOMO, R.F., 1992: The epidemiology y control of bovine leukemia virus infection. *Vet. Med.* 87: 248-257.
9. EGBERINK, H and M.C HORZINEK, 1992: Animal immunodeficiency viruses. *Vt. Microbiol.* 33: 311-331.
- 10.FERRER, J.F, 1979: Bovine Leukosis: Natural transmission y principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 1281-1286.
- GONDA, M.A., 1992: Bovine Immunodeficiency Virus. *AIDS* 6. 759-776
- 11.HIDALGO, G., M. FLORES y J.A BONILLA. 1994: Detection and isolation of Bovine Immunodeficiency Viru (BIV) in dairy herds of Costa Rica. *J. Vet. Med.* (Submitted), 12pp.
- 12.LAEMMLI, UK. Cleavage of estructural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

- 13.LETVIN, N.L.,1992: Animal models for the study of human immunodeficiency virus infections. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 481-485.
- 14.MESEN, M.G., W.CARTIN y J.A.BONILLA, 1993: Modificación de un método colorimétrico que usa XTT para la determinación de linfoproliferación. *Rev. Cost. Cienc. Med: (Costa Rica)* 14: 19-25.
- 15.MILLER, J.M., L.D. MILLER, C. OLSON y K.G. GILLETE, 1969: Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte culture with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 43 1297-1305.
- 16.MORENO, E., G. DOLZ., J.A. BONILLA, C. JIMENEZ, L. RODRIGUEZ, Y. SALAZAR, M. RAMIREZ, E. BOLAÑOS, M. MORA y S. SILVA, 1992: Serological studies on bovine leukemia virus infection in Costa Rica by ELISA, Immuno-diffusion and Western blot tests. *Proc. FAO/IAEA/SIDA, IAEA-TECDOC.* 657: 99-114.
- 17.POIEZ.B.J., F. W. RUSCETTI, A. F. GAZDAR, P. A. BUNN, 1980: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh cultured lymphocytes from a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 77, 7415- 7419.

18. RODRIGEZ, L. y J. ALVARADO, 1980: Estudio de leukosis vírica bovina en hatos lecheros del valle central de Costa Rica. Cien. Vet. (Costa Rica) 2: 183-194.
19. STITES, D.P., STOBO, J.D., FUDENBERG, H.H., WELLS, J.V. 1982: Basic and Clinical Immunology. 4th ed. Los Alamos, California: Lange Medical Publication. 366.
20. VAN DER MAATEN, M.J., A.D. BOOTHE y C.L. SEGER. 1972: Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. J. Nat. Cancer Inst. 49, 1649-1657.
21. WHETSTONE, C.A., M.J. VAN DER MAATEN y J.W. BLACK, 1990: Humoral immune response to the bovine immunodeficiency-like virus in experimentally and naturally infected cattle. J. Virol. 64, 3557-3561.