
ESTUDIO DEL POTENCIAL ZONÓTICO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA Y SU PRESENCIA EN CASOS DE CÁNCER DE SENO

A. Ochoa-Cruz¹, A. Uribe², M. Gutiérrez¹

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 No. 43-82 Bogotá, Colombia

² Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 No. 43-82 Bogotá, Colombia
mfgutier@javeriana.edu.co

RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un retrovirus oncogénico que pertenece a la familia *Retroviridae* y es conocido por su distribución mundial. Fue aislado por primera vez en 1969 asociado a la leucosis enzoótica bovina (LEB) que es una de las neoplasias más comunes en ganado. Algunos investigadores han propuesto que este virus está asociado con el cáncer de seno en el hombre, lo cual supondría un comportamiento zoonótico, donde el BLV, puede infectar también al humano. Para demostrar esta hipótesis, se seleccionaron 56 casos diagnosticados con carcinoma canicular en el Hospital Universitario San Ignacio, en la ciudad de Bogotá, Colombia, en el año 2004. Los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina fueron procesados mediante la técnica de inmunoperoxidasa, con el fin de detectar la glicoproteína viral gp51 en el citoplasma de las células tumorales. Los resultados mostraron un 7% de muestras positivas, indicando que el virus estuvo presente en humanos y además confirmando estudios *in vitro* que reportan la susceptibilidad de células humanas a la infección con BLV. Estos resultados nos permiten sugerir la presencia de BLV como provirus activo que es capaz de producir las proteínas que luego usará su progenie al salir de la célula. De manera simultánea se evaluaron variables como el sitio de procedencia y de nacimiento, antecedentes propios y familiares de la presencia de cáncer y ocupación de los pacientes, con relación a la presencia del virus pero no se encontró relación estadística entre ellos.

Palabras clave: BLV, carcinoma canicular, virus de la leucosis bovina, zoonosis.

ABSTRACT

The bovine leukemia virus (BLV) is an oncogenic retrovirus which belongs to the *Retroviridae* family and is known for its worldwide distribution. It was discovered in 1969, producing an infection called enzootic bovine leucosis (EBL) which is one of the most common neoplastic diseases in cattle. Recently some investigations have shown that this virus could be associated with human breast cancer, which implies that BLV could be an agent of a zoonosis, with the ability to also infect humans. In order to demonstrate this hypothesis, 56 cases diagnosed as canicular carcinoma in the "Hospital Universitario San Ignacio" in Bogotá, Colombia, during the year 2004 were chosen for analysis. Immunohistochemistry (IHC) was used on routinely formalin-fixed, paraffin embedded tissue samples for the detection of the BLV glycoprotein gp51 in the breast cancer tumor cells. The results show 7% positive samples, indicating that the virus was present in humans as well as confirming *in vitro* studies which show the susceptibility of human cells to BLV infection. These results allow us to suggest that BLV is present as an active provirus capable of producing the proteins that its progeny virus particles will use to leave its host cell. At the same time patient variables such as: place of origin and of birth, previous history of cancer in the patient and his family, and occupation were evaluated in relation to the presence of the virus; but no statistical relationship was demonstrated.

Key words: canicular carcinoma, BLV, zoonosis.

INTRODUCCIÓN

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un retrovirus oncogénico del género Deltavirus, subfamilia *Oncovirinae*, familia *Retroviridae* conocido por ser un retrovirus tipo C de distribución mundial (Sommerfelt, 1999; Lew *et al.*, 2004; Giuseppe *et al.*, 2004). Fue aislado por primera vez en 1969 asociado a la leucosis enzoótica bovina (LEB) que es una de las neoplasias más comunes en ganado (Tajima *et al.*, 1998). Sus genes constituyentes son gag, pol y env quienes codifican para las proteínas de la cápside, para transcriptasa reversa y para las glicoproteínas de envoltura respectivamente. El gen gag es traducido en la proteína precursora Pr70 Gag que luego es madurada en tres proteínas: la proteína de la matriz p15, la proteína de cápside p24 y la proteína de la nucleocápside p12. El gen env posee la información para la proteína precursora Pr72 Env, que es clivada en el aparato de Golgi para dar origen a la glicoproteína gp51 de la superficie de la envoltura y a la glicoproteína transmembranal gp30 (Orlik y Splitter, 1996; Giuseppe *et al.*, 2004).

Aproximadamente el 15% de todos los cánceres a nivel mundial parecen estar asociados con infecciones virales y varios virus animales y humanos ya son aceptados como causantes de malignidades específicas

como el virus del papiloma humano (HPV) que causa cáncer cervical y anogenital, el Epstein-Barr (EBV) que causa mononucleosis infecciosa y está muy relacionado al carcinoma nasofaríngeo (Wong *et al.*, 2002), el virus de la Leucemia murina (MLV) y el BLV con la leucemia bovina.

Lo que no está claro aún es la capacidad del BLV de infectar al hombre mediante el consumo de productos derivados de animales seropositivos. Tratando de avanzar en este conocimiento, en los años setenta se realizaron varias investigaciones cuyos resultados no mostraron la presencia de anticuerpos contra las proteínas gp51 y p24 del BLV en humanos, lo que por dos décadas validó la conclusión de que el BLV no era transmisible a humanos, razón por la cual a este agente infeccioso no se le había atribuido ninguna patología en el hombre (Buehring G. *et al.*, 2003).

En la década pasada Gertrude Buehring *et al.* en la Universidad de California, desarrollan dos técnicas 50 a 100 veces más sensibles que las utilizadas de rutina en el diagnóstico de BLV que eran la AGID (Inmunodifusión en agar) y la fijación del complemento; estas técnicas fueron las pruebas de ELISA e Inmunoblotting, con las cuales se logró comprobar la presencia de anticuerpos contra BLV en humanos en un 74% de los casos estudiados y se

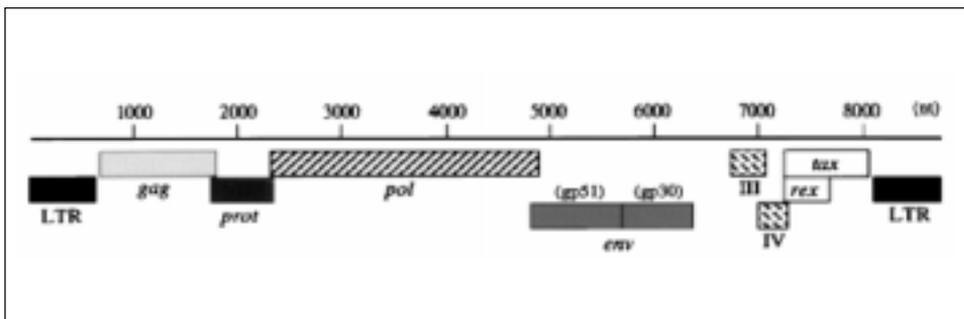


Figura 1: Genoma del BLV (Tajima *et al.*, 1998)

replanteó la hipótesis de una posible zoonosis. También se comprobó que los anticuerpos detectados no presentaban reacción cruzada con los tres retrovirus humanos; virus linfotrópico de células T humanas tipos 1 y 2 (HTLV 1 y 2) y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), ni con otros virus que causan enfermedades crónicas en humanos como hepatitis B, C y citomegalovirus, lo que demuestra que son específicos para BLV. (Buehring G. *et al.*, 2003).

Con el objeto de aportar nuevas pruebas del posible comportamiento zoonótico del BLV y sugerir la presencia de BLV como provirus activo, capaz de producir las proteínas que luego usará su progenie al salir de la célula, se continuó desde la Pontificia Universidad Javeriana con el proceso de encontrar la glicoproteína gp51 en casos diagnosticados de carcinoma canicular de seno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y muestreo

Este estudio de tipo descriptivo observacional de corte transversal, fue realizado en 56 tejidos diagnosticados para carcinoma canicular de seno en el Hospital Universitario San Ignacio, recolectados durante el año 2004, a los cuales se les buscó el antígeno gp51 del virus de leucosis bovina. Las muestras recolectadas fueron fijadas en formol e incluidas en parafina.

Determinación del antígeno gp51

Teniendo en cuenta que las muestras se encontraban en parafina, el procedimiento aplicado para la técnica de inmunoperoxidasa fue ajustado a los protocolos que se utilizan en el Departamento de Patología del Hospital Universitario San Ignacio. Antes de colorear el tejido fue necesario extraer el medio de inclusión para lograr una correcta penetración de los anticuer-

pos, lo que se consiguió mediante tres baños consecutivos de 10 minutos cada uno en Xilol. Como este solvente no es miscible con el agua, fue eliminado en dos baños de etanol absoluto, seguidos por una rehidratación en baños sucesivos de alcohol etílico a concentraciones decrecientes desde 100 hasta 80%, cada baño duró 3 minutos.

La prueba de inmunoperoxidasa utilizó un anticuerpo monoclonal producido en ratón (fabricado por VMRD.InC) que tiene especificidad por la glucoproteína gp51 del virus BLV, más exactamente contra su epítipo conformacional G, anticuerpo que luego fue detectado mediante un anticuerpo secundario con especificidad por la IgG de ratón, marcado con la peroxidasa.

Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo fue necesario agregar el sustrato, diaminobencidina (DAB), produciendo un precipitado insoluble de color pardo. Para observar el antígeno marcado en la lámina se contrastó la preparación con hematoxilina de Harris, colorante básico o catiónico con afinidad electrostática por los grupos fosfóricos ácidos del ADN, lo que le permitió colorear el núcleo celular. Esto sirvió para definir el entorno de núcleo y realzar su contenido cromatínico para observar mejor el antígeno buscado.

Para finalizar el procedimiento, el tejido fue deshidratado y aclarado para conseguir la conservación definitiva y facilitar su observación. Esta deshidratación se realizó a través de baños sucesivos de alcohol etílico de forma creciente hasta llegar al 100%, de 3 minutos cada uno.

Como control positivo del procedimiento se usó tejido de pulmón de murciélago infectado con el BLV (FA Substrate Slide for BLV, VMRE.Inc.), cada control contenía un 10% de células infectadas. Se usaron también dos controles negativos; el primero fue

la muestra procesada sin utilizar el anticuerpo primario y el segundo fue una muestra de tejido mamario sin patología alguna.

Variables del estudio

Con el fin de buscar alguna relación de la presencia viral con las características de la paciente, se analizaron las variables de edad, menarquia, gravidez, antecedentes de cáncer familiares y personales, ocupación y procedencia. La asociación de la presencia viral y cada una de las variables se estudiaron mediante pruebas no paramétricas, debido a que las variables utilizadas eran nominales. Se utilizó el programa estadístico Epi Info versión 3.2.2 para aplicar la prueba exacta de Fisher sobre tablas de contingencia y luego se aplicó estadística inferencial para buscar la relación entre lo encontrado en la muestra y la población que está afectada por este tipo de cáncer.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 56 casos de carcinoma canicular diagnosticados en el Hospi-

tal Universitario San Ignacio de la ciudad de Bogotá, Colombia, durante el año 2004. Se encontró 7% de positividad en la prueba de inmunoperoxidasa para la proteína gp51 del virus de la leucosis bovina, lo que sugiere la presencia de este virus en dicha patología. La positividad se dio por color marrón en el citoplasma de las células, sitio donde se localiza el antígeno gp51 del BLV (figuras 1 y 2). La razón de esto es que la glicoproteína gp51 es procesada en el citoplasma mediante clivaje, lugar donde se realiza el proceso de encapsulación viral (Jewell & Manky, 2000).

La tabla 1 presenta los resultados del análisis estadístico en donde se trató de determinar la asociación de la presencia viral con las variables independientes. Para tal fin se aplicó un χ^2 . En los resultados no se encontró relación estadísticamente significativa en cuanto a la relación entre las variables analizadas y la presencia del virus.

A y B corresponden a tejido de pulmón de murciélago infectado con el virus, donde

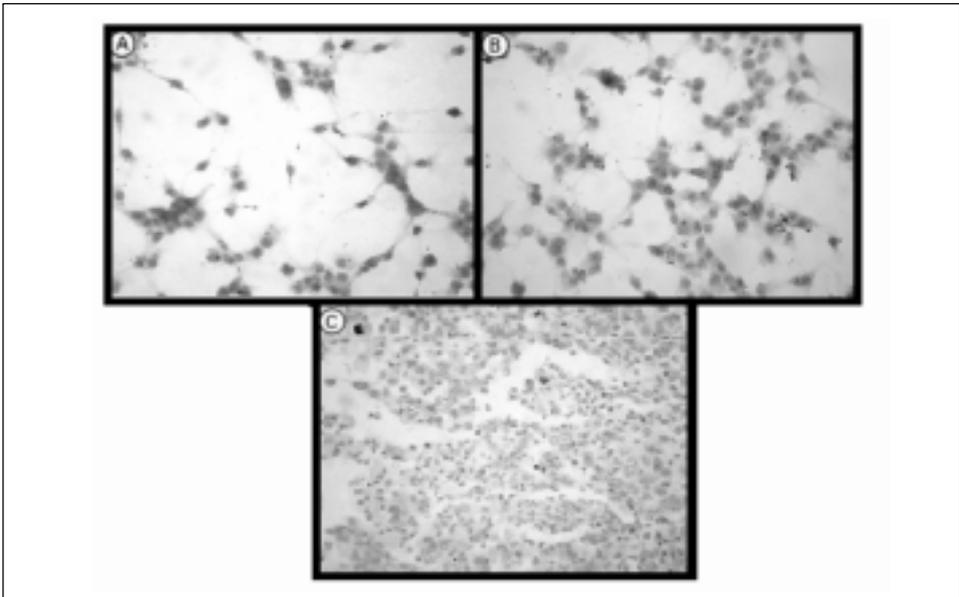


Figura 2:
Controles positivo y negativo del VLB en la técnica de inmunoperoxidasa

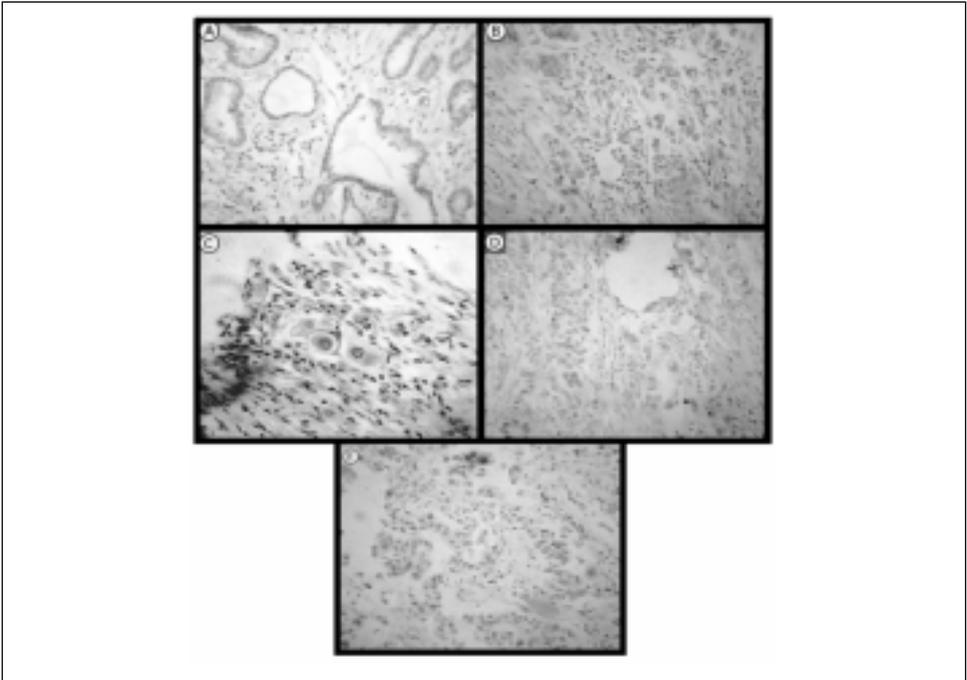


Figura 3: Muestras positivas con la técnica de inmunoperoxidasa

Tabla 1

Análisis estadístico de las variables: nótese que ninguna de las variables estudiadas presenta simultáneamente valores de OR superiores a 1, valores de IC que no pasen por 1 y valores p menores a 0,05. Por este motivo, ninguna variable se considera significativa

Variabes	Riesgo relativo (OR)	Intervalo de confianza (I.C)	Valor p
Natural vs. Presencia viral	1.36	0.09 - 20.06	0.39
Procedencia vs. Presencia viral	0	0 - 8.4	0.24
Ocupación vs. Presencia viral	1.48	0.1 - 21.7	0.36
Antecedentes personales vs. Presencia viral	0	0 - 18.2	0.34
Gravidez vs. Presencia viral	1.10	0.08 - 62.11	0.49
Abortos vs. Presencia viral	0	0 - 4.61	0.15
Menstruación vs. Presencia viral	0.42	0.008 - 5.72	0.26
Antecedentes familiares vs. Presencia viral	2.42	0.16 - 36.3	0.22

el 10% de las células contienen la partícula viral; C muestra tejido de seno sin ningún tipo de cáncer, este tejido se utilizó como control negativo. Las células positivas se observan coloreadas con color carmesí, color

producto de la diaminobencidina, mientras que en el fondo de la lámina se observa en color púrpura debido a la hematoxilina de Harris, colorante de contraste. La conformación celular que muestran las láminas

de control positivo no tiene nada que ver con el efecto citopático del virus.

Tinciones positivas de cuatro tejidos positivos para la presencia del antígeno gp51 del virus de leucosis bovina (A, B, D y E). En la figura C se hace un acercamiento del tejido observado en D, donde se puede detallar el citoplasma coloreado por el cromógeno DAB, nótese que el núcleo no es coloreado de carmesí.

Si bien, cuatro de las ocho variables analizadas; lugar de nacimiento de la persona (natural), ocupación, gravidez y antecedentes familiares de cáncer presentaron valores de OR mayor que 1, ninguna de estas asociaciones fue significativa debido a que ningún OR fue mayor que 3,84 (valor del Chi^2 tabulado con un 95% de confianza para tablas de contención). Además como todo OR estuvo contenido dentro del intervalo de confianza, se aceptó la hipótesis nula, que dice que el virus no tiene relación con la variable evaluada en la población. La no significancia de las relaciones fue confirmada por el *Valor de p* que al ser mayor que el nivel de significancia (0,05) mostró que no hay asociación significativa y que no se está cometiendo error tipo 1 ni 2 (tabla 1).

DISCUSIÓN

Pocos son los reportes que se encuentran respecto a la presencia de BLV en células humanas. Un trabajo similar al nuestro fue realizado por Buehring *et al.*, en 2001 quienes buscaron la proteína p24 del BLV en tejido de seno, encontrando un 15% de positividad y utilizando el mismo método aplicado en nuestra investigación. Estos resultados los podemos comparar con los nuestros en donde buscamos el virus pero a partir de la proteína gp51 y hallamos un 7% de positividad para la presencia de BLV en casos diagnosticados con carcinoma canicular de seno. A diferencia de la p24, la

proteína gp51 implica la presencia del virus activo en el tejido ya que esta proteína es sintetizada por el virus durante el proceso de encapsidación de su material genético, lo que hace suponer que el BLV está insertado en el genoma en forma de provirus, capaz de producir proteínas virales estructurales, hecho que ya ha sido mostrado por otros autores como Buehring *et al.* en 2001. Por otra parte, algunos autores proponen que la proteína gp51 del BLV es más antigénica que la p24 ya que induce una respuesta más rápida y con mayores títulos de anticuerpos en animales (Giuseppe *et al.*, 2004).

Hasta la fecha, el BLV se ha conocido por infectar de manera natural a los bovinos y de manera inducida a los ovinos, en donde produce una infección similar a la producida en el ganado vacuno. Hasta la fecha no se le ha atribuido ningún otro huésped en donde pueda ocasionar lesión. Es por esto que los resultados obtenidos en esta investigación generan la inquietud de reevaluar el tropismo viral y pasar a proponer un comportamiento zoonótico con transmisión del animal al hombre. Además este hallazgo confirma estudios *in vitro* que reportan la susceptibilidad de células humanas a la infección con BLV (Graves & Ferrer, 1976; Altaner *et al.*, 1989).

Para llegar a proponer un potencial zoonótico para el BLV se debe analizar la posibilidad de que las células humanas se hayan vuelto susceptibles a la infección con el virus, esto puede ser debido a mutaciones celulares expresadas en los receptores de las células humanas como consecuencia del proceso de transformaciones hacia carcinoma canicular de seno. Afirmar esta hipótesis requiere muchos más estudios; sin embargo, existen ejemplos como el del virus de la leucosis Murina (MLV): este virus normalmente sólo ataca ratones, ingresa a la célula mediante el receptor MCAT que es una proteína transmembranal transpor-

tadora de aminoácidos independiente de sodio. El cambio de dos aminoácidos en un receptor celular humano homólogo al utilizado por este virus en ratones llamado HCAT hace que la célula humana sea susceptible de infectarse con MLV. Los receptores presentan una homología del 87% pero normalmente el receptor celular humano no permite la unión del virus, a menos que cambie su conformación a consecuencia de una mutación en el genoma celular (Sommerfelt, 1999).

Otra muestra del potencial zoonótico del BLV es su estrecha relación con el HTLV tipos 1 y 2, que atacan humanos, de hecho estos tres virus constituyen un único subgrupo dentro de la familia de los retrovirus que está caracterizado por un contenido genético distinto a los demás retrovirus (Kerkhofs *et al.*, 1996; Tajima *et al.*, 1998; Sommerfelt, 1999). Está reportado que la región de encapsidación del HTLV-1 y HTLV-2 puede remplazar la señal primaria de encapsidación del BLV en el proceso de reconocimiento (Mansky y Wisniewski, 1998; Jewell y Mansky, 2000), lo cual da otro indicio de la estrecha relación de este virus bovino con los dos virus humanos. Esto muestra como el BLV, virus que tiene tropismo normalmente por bovinos, presenta una conformación tan similar al HTLV que en cierto momento al estar en contacto con humanos podría adaptar comportamientos que le permitan atacar a esta especie.

Entre las formas de transmisión del virus en ganado encontramos la transmisión vertical por vía galactógena, que le permite al virus infectar linfocitos B de placas de Peyer y de ahí seguir a los linfocitos T (DenBroeke *et al.*, 2001), otra forma de transmisión vertical es la vía transplacentaria o la infección intrauterina (Roberts *et al.*, 1981). Aun así la forma más común de transmisión es la horizontal a través de sangre o secreciones que son llevadas de un animal

a otro mediante instrumentos no desinfectados, (Buehring G. *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 1981). Para humanos la vía de contagio puede ser por ingestión de productos cárnicos o lácteos derivados de animales infectados con el virus. Existen trabajos que han demostrado la presencia de anticuerpos contra BLV en humanos sanos, especialmente IgG contra proteínas del virus contenidas en alimentos (Barnes *et al.*, 1988), lo que da indicios de que el hombre tiene suficiente contacto con este virus para desarrollar una respuesta inmunológica activa. A pesar de que muchos animales son diagnosticados y sacados del mercado, la mayoría de ellos no son detectados y continúan en la cadena de comercialización. (Buehring G. *et al.*, 2003). De hecho el BLV se ha encontrado en leche y calostro de animales infectados y se ha demostrado que puede ser transmitido de la madre a su cría por esta vía, lo que muestra una fuerte relación entre el virus y la lactancia (Choi *et al.*, 2002; Motón y Buehring, 2003).

En 1988, Barnes *et al.* detectaron anticuerpos en sueros humanos, los cuales pueden ser inducidos por partículas de BLV denaturadas por el calor, que fueron ingeridas en productos bovinos cocinados o pasteurizados, lo que indica que la producción de anticuerpos no sólo pudo haber sido debida a la entrada de la partícula viral completa (Buehring *et al.*, 2003). El proceso de pasteurización es capaz de eliminar virus como HIV y HTLV en leche humana y hay reportes de que el BLV es inactivado mediante pasteurización de leche bovina (Orloff *et al.*, 1993). Aun así la vía de contagio no está del todo clara y demanda de más estudios para ser esclarecida pero la posibilidad queda abierta ya que los antígenos virales se encuentran en tejido humano, como se reporta en este trabajo.

Dentro del ciclo viral normal cursado por el BLV en bovinos, su tropismo inicial es por linfocitos B y luego pasa por linfocitos

T terminando en células del epitelio mamario, lo cual podría estar asociado con la disminución de la producción de leche en las vacas afectadas (Motón y Buehring, 2003). Para que la síntesis de leche se dé, la célula debe estar diferenciada, lo que quiere decir que el virus podría tener un efecto de bloqueo en la diferenciación celular de tejido mamario. Hay evidencia de que en bovinos el BLV es capaz de inhibir ciertas vías de reparación del ADN, lo cual puede producir una acumulación de errores durante largos períodos de tiempo potencialmente asociados con el desarrollo del cáncer (Philpott y Buehring, 1999). También se piensa que el virus puede tener actividad en la proliferación celular debido al producto del gen *tax*, que es clasificado en el grupo de oncogenes inmortalizantes junto con la proteína E1A del Adenovirus y las E6 y E7 del papilomavirus humano entre otras (Ratsch *et al.*, 2001). Es recomendable utilizar técnicas que busquen la presencia y actividad de este gen y que permitan observar si en realidad el BLV sólo se encuentra en células malignas, no descartando aun la posibilidad de que se encuentre en células no malignas pero expresándose en una tasa mucho menor a la que permite detectar la inmunoperoxidasa.

Con el objetivo de determinar si ciertas variables de la población utilizada para el estudio tenían relación con la presencia del virus, se escogieron las variables de lugar de nacimiento (Natural), Procedencia (lugar donde habita) y ocupación con el fin de buscar posibles vías de contagio de humanos con el BLV, ya que el habitar en una zona rural o desempeñarse en algún tipo de labor que implicara el contacto con bovinos podría indicar que el virus se transmite por contacto directo, o por ejemplo al ingerir leche sin pasteurizar, práctica que es más común en las zonas rurales que urbanas del país. Aun así no se encontró relación entre éstas y la presencia del BLV lo

que concuerda con los resultados de Buehring *et al.* en 2003, quienes encontraron que sólo un 9,7% de los sujetos con los que realizó su estudio tenían algún tipo de contacto directo con bovinos o sus productos biológicos y estos sujetos no eran más propensos a presentar anticuerpos contra BLV.

Las variables de edad, antecedentes familiares y personales de cáncer, número de embarazos, número de abortos y presencia o no de menopausia se tomaron con el objetivo de observar posibles factores de riesgos para contraer la infección, pero al igual que con las anteriores variables no se encontró relación con la presencia del virus.

Hay varias razones que hacen al BLV un virus potencialmente asociado al cáncer de seno en humanos, como por ejemplo el haberlo encontrado en dicho tejido como se reporta en este trabajo, o los estudios que han comprobado la relación con la enfermedad como tal en bovinos (Motón y Buehring, 2003). Aun así la presencia del BLV en el tejido analizado no puede dar aun por sentado su papel en la patología, ya que existen otros factores relacionados con este tipo de cáncer que pueden tener impacto como por ejemplo los antecedentes familiares de cáncer, la exposición a radiaciones, el consumo de tabaco, menarquia temprana, menopausia, estrés, etc.

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia del antígeno gp51 en el 7% de los casos de carcinoma canicular de seno, estos resultados sugieren que el virus de la leucosis bovina tiene carácter zoonótico y confirman que el virus es capaz de infectar células humanas; sin embargo, el papel del virus en la patología o su grado de asociación no está claro aún y se necesitan otros estudios para dilucidar el papel que el BLV juega en el cáncer de seno. No se encontró asociación

entre las variables y la presencia del virus en tejido con carcinoma canicular de seno.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Olga Mariño y Jorge Almanza quienes nos guiaron en el desarrollo de este trabajo. A los técnicos del Departamento de Patología por su colaboración y ayuda en el montaje de las pruebas.

LITERATURA CITADA

- ALTANER, C.; ALTANEROVA, V.; BAN J. 1989. Human cells of neural origin are permissive for bovine leukemia virus. *Neoplasma*. 36: 691-695.
- BARNES, R.; JOHNSON, P.; FINN, R. & HARVEY M. 1988. Human serum antibodies reactive with dietary proteins. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87: 184-188.
- BUEHRING, G.; CHOI, K.; JENSEN, H. 2001. Bovine leukemia virus in human breast tissues. In: 23rd Congress of the International Association for Breast Cancer Research. *Breast Cancer Res* 3: (suppl 1): A14.
- BUEHRING, G.; PHILPOTT, S.; CHOI, Y. 2003. Human have antibodies reactive with Bovine Leukemia Virus. *Aids research and human retrovirus*. 19: 1005-1113.
- CHOI, K.Y.; LIU, R.B.; BUEHRING GC. 2002. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J Virol Methods* 104: 33-39.
- DEN-BROEKE, V.; CLEUTER, Y.; BESKORWAYNE, T.; KERKHOFS, P.; SZYNAL, M.; BAGNIS, C.; BURNY, A.; GRIEBEL, P. 2001. CD154 Costimulated Ovine Primary B Cells, a Cell culture system that supports productive infection by bovine leukemia virus. *Journal of Virology* 75: 1095-1103.
- GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F.; RUTILL, D.; MIA, G., 2004. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 11: 147-151.
- GRAVES, D.C.; FERRER, J.F. 1976. *In vitro* transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res* 36: 4152-4159.
- JEWELL, N.; MANSKY, L. 2000. In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *Journal of General Virology* 81: 1889-1899.
- KERKHOFS, P.; ADAM, E.; DROGMANS, L.; PORTETELLE, D.; MAMMERICKX, M, BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. 1996. Cellular pathways involved in the ex vivo expression of bovine leukemia virus. *J Virol* 70: 2170-2177.
- LEW, A.; BOCKB, R.; MOLLOY, J.; MINCHIN, C.; ROBINSON S.; STEER P. 2004. Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5'Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *Journal of Virological Methods* 115: 167-175.
- MANSKY, L.; WISNIEWSKI, R. 1998. The Bovine leukemia virus encapsidation signal is composed of RNA secondary structures. *Journal of Virology* 72: 3196-3204.

- MOTTON, D., BUEHRING, G. 2003. Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 86: 2826-2838.
- ORLIK, O., SPLITTER, G., 1996. Progression to persistent lymphocytosis and tumor development in bovine leukemia virus (BLV)-Infected cattle correlates with impaired proliferation of CD41 T Cells in Response to gag- and env-Encoded BLV proteins. *J Virol* 70: 7584-7593.
- ORLIK O.; BAN J.; HLA VATY J.; ALTANER C, KETTMANN R.; PORTETELLE D.; SPLITTER G.; 1997. Polyclonal bovine sera but not virus-neutralizing monoclonal antibodies block bovine leukemia virus (BLV) gp51 binding to recombinant BLV receptor BLVRcp1. *J Virol* 71: 3263-3267.
- ORLOFF, S.; WALLINGFORD, J., MCDUGAL, J., 1993. Inactivation of human human immunodeficiency virus type I in human milk: Effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J Hum Lact* 9: 13-17.
- PHILPOTT, S., BUEHRING, G. 1999. Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: Role of tax gene. *J Natl Cancer Inst* 91: 933-942.
- RATSCH, S.B.; Q. GAO, S.; SRINIVASAN, D.E.; WAZER & BAND, V. 2001. Multiple genetic changes are required for efficient immortalization of different subtypes of normal human mammary epithelial cells. *Radiat Res* 155: 143-150.
- ROBERTS, D.H.; LUCAS, M.H.; WIBBERLY, G.; CHASEY, D. 1981. Survival of bovine leucosis virus in bovine whole blood, serum and plasma. *J Biol Stand* 9: 469-473.
- SOMMERFELT, M. 1999. Retroviral receptors. *Journal of General Virology* 80: 3049-3064.
- SOTA, M. 2004. *Manual de procedimientos de leucosis bovina enzoótica*. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires.
- TAJIMA, S.; IKAWA, Y.; AIDA, Y. 1998. Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-Infected cattle throughout the course of B-Cell Lymphosarcoma Development. *J Virol* 72: 7569-7567.
- TAJIMA, S.; AIDA, Y. 2003. The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) tax protein restricts transactivation not only via the BLV Enhancer but Also via Other Retrovirus Enhancers. *Journal of Virology* 74: 10939-10949.
- WONG, M.; PAGANO, J.; SCHILLER, J.; TEVETHIA, S.; RAAB, N.; GRUBER, J. 2002. New Associations of Human Papillomavirus, Simian Virus 40, and Epstein-Barr Virus with Human Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 94: 1832-1836.

Recibido: 27.03.2006

Aprobado: 31.08.2006