

PROTEÍNAS SÉRICAS EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA (LBE)

Jorge E. Almansa M., DMV., M.Sc.; Olga C. Mariño J., Microbiol., M.Sc., Ph.D.;
Sixta T. Martínez., Química, M.Sc.; Martha Carpintero, Química, M.Sc.

RESUMEN

Basados en pruebas de electroforesis sobre acetato de celulosa e inmunolectroforesis en soporte de agarosa, se intentó establecer si los análisis de proteínas séricas de animales infectados con virus de leucosis bovina (VLB) eran de utilidad como indicadores de malignidad. Se analizaron 136 sueros de bovinos clasificados en tres grupos diferentes, así: 1) Ochenta y ocho animales aparentemente sanos con serología negativa para LBE por prueba de ID, 2) Diez y ocho animales aparentemente sanos con serología positiva por ID y recuentos hemáticos normales y 3) Treinta animales con serología positiva, linfocitosis persistente y evidencia de proceso clínico. La disminución de IgM, las paraproteínas y los cambios en la concentración de la fracción alfa globulínica encontrados por otros autores no pudieron confirmarse en este estudio. Las gammopatías pueden presentarse asociadas con la fase clínica o neoplásica y la linfocitosis persistente, aunque tal cambio no es constante. La electroforesis sobre acetato de celulosa mostró nuevamente ser una prueba útil en la evaluación general de los animales.

Palabras Claves Adicionales: Perfil electroforético, inmunodifusión, linfosarcoma bovino

ABSTRACT

Seric Proteins In The Differential Diagnosis Of Enzootic Bovine Leukosis

Enzootic bovine leukosis can be detected in various different clinical forms, the present work attempted to establish an indirect laboratory method to differentiate them. A total of 136 serums of cows classified in three groups as follows were studied: 1) Eighty eight healthy animals, with positive serology by ID, 2) Eighteen healthy animals, with positive serology to bovine leukosis and normal haematic chart, and 3) Thirty animals with positive serology and clinical evidence of bovine leukosis. All the serums were tested by cellulose acetate electrophoresis and in some cases also immunoelectrophoresis in agarose were carried out. No significant changes were established to achieve the searched differentiation. However, there were gammopathies in relation with two animals from the last group. Once again the usefulness of electrophoresis was confirmed as a good support of a clinician's evaluation.

Additional Index Words. Immunodiffusion, electrophoretic profile, bovine lymphosarcoma

La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa distribuida ampliamente en el mundo, la cual afecta animales adultos y se manifiesta como infección subclínica con merma en la capacidad de la respuesta inmune, linfocitosis persistente (LP), leucemia y linfosarcoma (Onuma *et al.*, 1990).

Las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad se deben principalmen-

te a la morbilidad y mortalidad directamente atribuibles al proceso, los tratamientos inútiles instaurados a los animales enfermos, las restricciones establecidas en el comercio nacional e internacional para los animales seropositivos, las bajas en producción, decomisos en mataderos y morbilidad o muerte relacionadas de manera indirecta con la enfermedad (infecciones secundarias) (Brennen *et al.*, 1989).

Para el desarrollo de programas de control de LBE, un aspecto fundamental lo constituye la disponibilidad de metodologías diagnósticas sensibles, económicas y confiables. En el caso de áreas de alta prevalencia en donde no se han iniciado programas de control, como sucede en Colombia, las técnicas que detecten cuando un animal seropositivo entra en una fase neoplásica, pueden resultar de gran ayuda y evitar gastos innecesarios. De estas técnicas unas buscan encontrar cambios en el comportamiento de proteínas séricas asociadas con malignidad, otras intentan identificar antígenos asociados con tumor (AAT), que puedan indicar cuando se produce la transformación (Aida *et al*, 1985, Neira *et al*, 1981) y posiblemente más tarde se logren determinar y cuantificar productos del oncogen involucrado en el proceso.

Existe un número alto de patologías que alteran los parámetros de medición del comportamiento de las proteínas séricas (Kawai, 1977), entre las cuales merecen destacarse las que hacen relación a la transformación de células linfáticas. El hecho de que el virus de la LBE tenga como su célula blanco más importante al linfocito B (Lewin *et al*, 1987) y que se produzca LP, leucemia y o linfosarcoma, hizo pensar desde los primeros trabajos en la posible ayuda que los estudios de proteínas séricas podrían brindar en el diagnóstico de malignidad dentro de tal proceso. Es así como Matthaeus y Straub (1976), determinaron la presencia de paraproteínas de los tipos IgG e IgM, lo cual según los mismos autores, ya había sido encontrado en la linfomatosis del pollo y en linfomas humanos de célula B. En un estudio previo, también se había demostrado deficiente producción de IgM, al parecer como resultado de una disminución selectiva de linfocitos B productores de este tipo de Ig, en animales con LBE (Trainin, 1971). En Colombia, un trabajo realizado por el Instituto Colombiano Agropecuario demostró que los sueros de animales seropositivos presentan una elevación en la concentración de la frac-

ción alfa globulínica con detrimento de las concentraciones de albumina y gamma globulina (Neira *et al*, 1981). Más recientemente se observó alguna evidencia que señala la presencia de gamapatías mono y policlonales como posibles marcadores de malignidad en LBE (Almansa *et al*, 1988), lo cual está en concordancia con lo encontrado en afecciones similares en otras especies animales (Osburn *et al*., 1977). De igual forma, como se ha registrado una serie de cambios en las proteínas séricas relacionadas con LBE, otros trabajos no han podido demostrar modificaciones en los electroforetogramas de animales seropositivos (Jacobs *et al*, 1980).

Los hallazgos realizados en el laboratorio de inmunología del ICA-CEISA, así como los reportados en la literatura consultada, tanto en el caso de LBE como de enfermedades similares en otras especies animales, llevaron a pensar en la posibilidad de emplear las modificaciones séricas, concretamente la presencia de gamapatías y de paraproteínas, como marcadores de malignidad, en cuya demostración se emplean técnicas que a pesar de ser indirectas, resultan más simples que la producción y empleo de anticuerpos monoclonales contra AAT, dados los inconvenientes y costos de estos últimos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se realizó un muestreo no probabilístico, mediante el cual se analizaron 136 sueros provenientes de hembras bovinas mayores de dos años de edad, de la raza Holstein, pertenecientes a cinco hatos distintos, cuatro ubicados en la sabana de Bogotá y uno en el Valle del Cauca, con los cuales se conformaron tres grupos diferentes de animales de acuerdo con la apariencia clínica, evaluación hematológica y respuesta serológica frente a la LBE. El grupo 1 lo integraban 88 hembras aparentemente sanas provenientes de varios hatos, en el primero de los cuales, hasta la fecha de es-

tudio (año 1991), no se habían presentado reactores serológicos al virus de LBE en los últimos seis años. Sesenta y cuatro vacas de ese hato fueron utilizadas como controles, junto con 24 animales más provenientes de otros hatos. El segundo grupo se conformó con 18 hembras aparentemente sanas, con anticuerpos que presentaban al antígeno Gp-51 del virus de LBE detectados por la prueba de inmunodifusión (ID), y que no presentaban LP (algunos animales del hato 2 evidenciaron alteraciones hematológicas puntuales), y el tercer grupo se constituyó con 30 animales serológicamente positivos por la prueba de ID, que mostraron LP y alguna evidencia clínica de estar afectados por la enfermedad (pérdida de peso, aumento de tamaño de nódulos linfáticos superficiales, masas tumorales). Los animales de los dos últimos grupos pertenecían a explotaciones en donde la LBE era prevalente y en donde se han reportado casos clínicos de la fase neoplásica

Serología clínica

A la totalidad de los animales se les tomó muestras de sangre sin anticoagulante por punción de la vena coxígea ventral, con la finalidad de realizar con los sueros obtenidos, la prueba de ID (ICA, 1978). A 16 animales del grupo 1 se les practicaron hemogramas completos, los cuales sirvieron como referencia, previa toma de muestras de sangre con anticoagulante (EDTA). A todos los individuos seropositivos se les practicaron también cuadros hemáticos. Las muestras sin anticoagulante se clarificaron por centrifugación a 250xg durante cinco minutos y los sueros obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Los animales que presentaron recuentos leucocitarios por encima de 9 500 células/mm³ de sangre durante dos tomas continuas, con intervalo de dos meses, se consideraron con LP (Schalm, 1966). La proteína sérica total fue evaluada emplean-

do el refractómetro de Goldgerg*. Cada suero se corrió por electroforesis en microcámara sobre membranas de acetato de celulosa (mac). Las muestras separadas y teñidas se graficaron mediante el densitómetro integrador Digiscreen Scanner R2, así como del integrador Shimadzu**. La concentración de cada fracción se obtuvo determinando el área bajo la curva y su porcentaje frente a los valores de concentración de proteína total, obtenida previamente por refractometría. Los datos resultantes fueron promediados, obteniéndose las respectivas desviaciones estándar con el fin de comparar con datos referenciales nacionales (Almansa y Mariño, 1987) e internacionales (Coles, 1968), buscando establecer características relacionadas con las propiedades de cada grupo. Cuarenta de los sueros pertenecientes a animales de los grupos 2 y 3 se corrieron por la técnica de inmunoelectroforesis (IEF), utilizando sueros del grupo 1 como control y antisuero total bovino preparado en conejo (ICA, 1978); las placas fueron teñidas con rojo Ponceau.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 resume la concentración proteica de las distintas fracciones séricas de los animales en estudio discriminados por hatos y por grupo. Dadas las diferencias en cuanto al comportamiento de proteínas, encontradas entre los hatos y relacionadas posiblemente con el distinto manejo, algún grado de actividad tóxica proveniente de agroquímicos empleados en los cultivos aledaños a las explotaciones y a la presencia de otros patógenos diferentes al virus de la LBE, se prefirió desglosar los resultados y mantenerlos así a lo largo de este acápite.

Entre los animales que conformaron el grupo 1 se observan diferencias en las concentraciones de las fracciones protei-

* Coulter Electronic, Inc Hialeah, Florida USA

** Gelman Instrument Inc Ann Arbor Michigan 48106 USA

*** Shimadzu corporation

cas relacionadas con los hatos de origen Mientras que en los animales de los hatos 1 y 2 se encuentran bajas concentraciones de albúmina y altas de gamaglobulinas, en los animales de los demás hatos la albúmina es más alta y las gamaglobulinas se hallan entre los valores reportados como normales. Tales resultados parecen ser el reflejo de

las distintas condiciones a las que se halla sujeto cada uno de los hatos, tales como tipo y calidad del alimento, control de parasitismos gastrointestinales y hepáticos, empleo de baños contra la mosca, entre otros. Es de resaltar que se encontraron recuentos diferenciales individuales hasta del 20% de eosinófilos. Los exámenes coprológicos de estos animales demostraron la presencia de huevos de parásitos gastrointestinales, strongylidos, *Dyctiocaulus Buxtonella*

Para conformar el segundo grupo se tuvieron en cuenta animales de los hatos 2,3,4 y 5, los cuales no presentaron LP, pero que eran serológicamente positivos a LBE por ID. Los animales de este grupo pertenecientes al hato 2 mantuvieron un alto promedio de gamaglobulinas y albúmina, mientras que en los animales de los hatos 3,4 y 5 de este grupo, los valores estuvieron entre los rangos normales. Estos hallazgos podrían ser consecuencia de un mejor estado nutricional del hato 2 acompañado de algún grado de parasitismo.

Los animales del tercer grupo presentaron serología positiva por ID y LP. Debido a que tras llevar a cabo las electroforesis de los 15 sueros provenientes de animales de los hatos 2, 3, 4 y 5 de este grupo, tan solo se observaron dos casos de gammapatía policlonal (Figuras 1 y 2), y se reunieron 15 sueros adicionales provenientes del Valle del Cauca, que reunían las condiciones del grupo, sin embargo, ninguno de esos animales presentó modificaciones en el comportamiento electroforético de las proteínas séricas

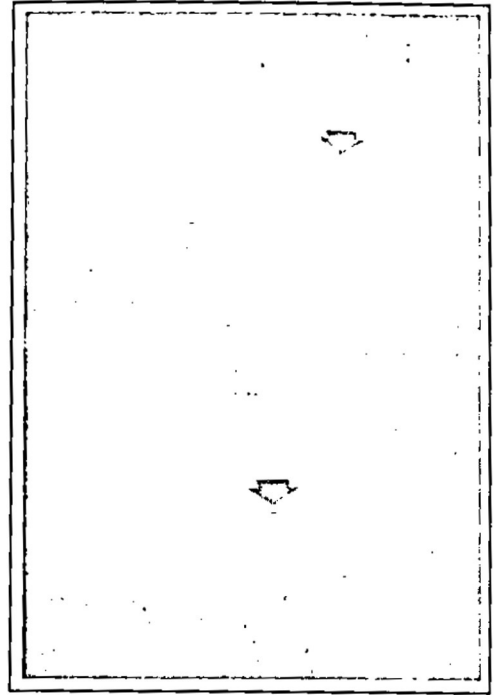


FIGURA 1. Electroforetogramas: a) Suero control de animal negativo a LBE; b) Suero de la vaca #110 del hato 2 en la que se aprecia un aumento en la concentración de gamaglobulinas (Gamapatía de tipo policlonal).

En general, los electroforetogramas obtenidos no presentaron diferencias claras entre los tres grupos, que pudieran ser atribuidas exclusivamente a una determinada fase de LBE. Por el contrario, las diferencias se apreciaron más entre los distintos hatos que entre los grupos como tales, lo cual dificultó su análisis. A pesar de no encontrar modificaciones constantes en los animales del tercer grupo, dos de las vacas manifestaron alteraciones compatibles con gammapatía policlonal (Tablas 1 y 2, Figuras 1 y 2), que pueden sugerir la instauración de la fase neoplásica. Vale la pena anotar que en un estudio previo (Almansa *et al.*, 1988) se encontraron cuatro animales que presentaban simultáneamente serología positiva a LBE, LP y cuyos análisis de necropsia e histopatológicos habían demostrado una LBE en fase neoplásica. El presente estudio preten-

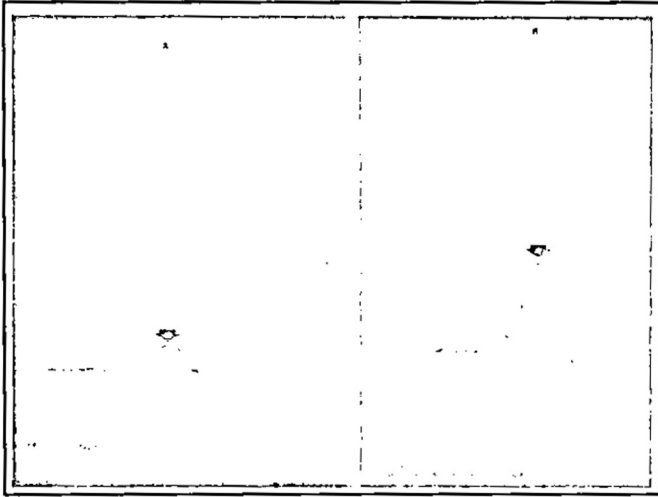


FIGURA 2. Electroforetogramas: a) Suero control negativo a LBE; b) Suero de la vaca #1090 del hato 3 en la que se aprecia un aumento en la concentración de gammaglobulinas gamapatía de tipo policlonal).

día, entre otras cosas, esclarecer si los cambios observados en los electroforetogramas de esos cuatro animales se producían de manera constante. Dada la dificultad de encontrar animales en fases terminales, se consideraron algunos cambios clínicos como indicadores, pero los mismos no son señal inequívoca de la fase tumoral. De esta manera, el aumento de tamaño de los ganglios regionales, e incluso según los más recientes trabajos en retrovirus bovinos, la LP, pueden en muchos casos no deberse a LBE, sino a otras patologías (Egberink y Horzinec, 1992 y Heeney *et al.*, 1988).

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos lo constituyeron las concentraciones de las distintas fracciones de proteína vistas en el hato 1, pues a pesar de tratarse de un grupo control, todos mantenían altas concentraciones de gammaglobulinas, lo cual se consideró como resultado del grado de parasitismo (estímulo constante del sistema inmune), y posiblemente

a cierto grado de compromiso de la función hepática (en los animales de este hato se presentan con regularidad casos de fotosensibilización, la fuente de agua recoge el riego de varios cultivos de papa y además, en la zona la *Fasciola hepática* es prevalente) No se encontró diferencia mínima significativa entre los promedios de valores obtenidos en cada uno de los grupos estudiados ($P > 0.05$).

Las pruebas de IEF no revelaron modificaciones cualitativas entre los animales de los tres grupos. No se evidenciaron paraproteínas y las líneas correspondientes a las gammaglobulinas fueron comparables con los controles.

Resulta de interés destacar que, si bien la LP no parece relacionarse directamente con la presencia de gammapatías, éstas pueden presentarse en fases neoplásicas, al menos en algunos casos.

TABLA 1. Concentración proteica de las distintas fracciones séricas por hato y grupo de animales (promedios y desviación estándar).

Descripción de grupos	n	Albumina	Alfa	Beta	Gama	Proteína total
Inmunodifus LBE (-)						
Hato 1	64	2 39± 35	1 195± 2	0 805± 15	3 236± 42	7 568± 54
Hato 2	15	2 649± 68	1 064± 16	0 730± 18	3 244± 6	7 708± 52
Hatos 3 4 5	9	2 948± 092	0 972± 07	0 626± 06	2 138± 44	6 68± 42
Inmunodifus LBE (+)						
Hato 2	9	3 088± 56	1 025± 17	0 801± 14	3 174± 63	8.011± 43
Hatos 3 4 5	9	2 367± 42	1 092± 19	0 727± 10	2 271± 33	6 88± 45
Inmunodifus LBE (+) Linfocito						
Persistenc	15	2 371± 43	1 033± 21	0 74± 13	2 476± 53	662± 60
Hatos 2 3 4 5	15	2 76± 36	876± 38	0 704± 0 96	2.26± 40	6 42± 58
Datos de referencia						
Coles		3 4	85	85	2 16	7 65± 5
Datos nacionales						
		3 17± 87	85± 2	84± 2	2 16± 85	7 01± 95

TABLA 2. Concentración proteica de las distintas fracciones séricas de las vacas 110 y 1090 del hato 2.

Albumina	Alfa	Beta	Gama	Proteína total
A 2 23	1 02	9	4 35	8 5
				7 65± 5
B 2 00	65	61	3 14	7 01± 9
* 3 4	85	1 8	2 16	6 4
** 3 17± 87	85± 26	84± 2	2 16± 85	7 65± 5
				7 01± 9

* Coles (16)

** Datos nacionales (15)

Cantidades en g 100 mL de suero

A= Vaca #110-hato 2

B= Vaca #1090-hato 3

Cuadros hemáticos

Identificación	Vaca No 110	Vaca No 1090
Hematocrito	34	35
Hemoglobina	12 2	12
Leucocitos	16 600/mm ³	19 600/mm ³
Neutrófilos	23%	41%
Linfocitos	60%	58%
Monocitos	0	0
Eosinófilos	8	1
Basófilos	0	0

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aida, Y.; Onuma, M.; Ogawa, Y.; Mikami, T.; Izawa, H. 1985 Tumor-associated antigens on bovine leukemia virus induced bovine lymphosarcoma identified by monoclonal antibodies *Cancer Res* 45 1174-1180
2. Almansa, J.; Mariño, O.C. 1987 Proteogramas séricos de bovinos bajo distintas condiciones de manejo (Material inédito)
3. Almansa, J.; Mariño, O.C.; Neira, L. R. 1988 Análisis electroforético de proteínas séricas bovinas Algunas observaciones clínicas *Rev Acovez* 12 (4) 6-14
4. Amborski, G F., Lo, J. L.; Seger, C.L. 1989 Serological detection of multiple retroviral infections in cattle bovine leukemia virus, bovine syncytial virus and bovine visna virus *Vet Microbiol* 20 247 253
5. Bendixen, H J 1959 Studies on leukosis in cattle Control of leucosis herds using hematological examination *Nord Vet Med* 11 733-738
6. Brennen, J, Van-Haans, M ; Savir, D.; Trainin, Z 1989 The implication of BLV infection in the productivity reproductive capacity and survival rate of dairy cow *Vet Immunol Immunohatol* 22 229-305
7. Coles, E. H. 1968 Patología y diagnostico veterinario Ed Interamer S A Mex pp 108 117
8. Egberink, H., Horzinek, M.C. 1992 Animal immunodeficiency viruses *Vet Microbiol* 33 311-331
9. Heeney, J.L., Valli, V.E.; Montesanti, J 1988 Alterations in humoral immune response to bovine leukaemia virus antigens in cattle with lymphoma *J Gen Virol* 69 659-666

10. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Bogotá (Colombia). 1978. Manual de Técnicas en Microbiología Doc de trab No 18. pp. 331-336
11. Jacobs, R.M.; Valli, O.; Wilkie, B.N. 1980 Serum electrophoresis and immunoglobulin concentrations on cows with lymphoma. *Am J Vet* 41, (12): 1942-1946
12. Kawai, T. 1977 Proteínas plasmáticas. Aplicación clínica. Ed. Méd Panamer Buenos Aires Trad. de "Clinical aspects of the plasma proteins" Igaku Shoin Ltda Tokyo Trad., M A. Mariño
13. Lewin, H.A.; Shook, L.B; Nolan, J.J. 1987 Altered expression of class II antigens on peripheral blood B lymphocytes // LB School and J B Tew (Ed) Antigen presenting cells Diversity, differentiation and regulation Alan R Liss, N Y , pp 211-220
14. Mathaeus, W.; Straub, O.C. 1976 Studies on the distribution of Gammaglobulins and abnormal globulins from serum of leukotic cattle and shepp. *Vet. Microbiol* 1 363-373
15. Neira, L.R.; Lozano, F.; Mariño, O.C. 1981 Estudios electroforéticos de las proteínas séricas de bovinos con linfosarcoma *Rev.Col Cienc Pec.* 3 (3): 149-160.
16. Onuma, M.; Aida, Y.; Okada, K.; Ohshima, K.; Kawakami, Y.; Isawa, H. 1985. Usefulness of monoclonal antibodies for detection of enzootic bovine leukemia cells. *Jpn J.Cancer Res* 76. 959-966.
17. Onuma, M.; Wada, M.; Yasutomi, Y.; Yamamoto, M.; Okada, H.M. Kawakami, Y. 1990. Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet Microb* 25: 131-141
8. Osburn, B.I.; Holmberg, C.A.; Terrel, T.G.; Coddington, J.; Greeley, K.; Henrickson, R V 1977 Polyclonal Gammopathies associated with chronic diseases in nonhuman primates *Am J Vet Res* 38 (5) 671-674
19. Schalm, O.W. 1966 Hematología veterinaria Uthea, Mexico 1a Ed Española pp 125-126
20. Trainin, Z.; Klepfer, U. 1971 Immunofluorescent studies on lymph nodes and spleens of leukotic cattle for cells producing IgM and IgG *Cancer Res* 31: 1968-1970