11621
7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"IDENTIFICACION DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS CAPRINOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

GERARDO ARCILA LOPEZ - TELLO

ASESOR: M. EN C. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ

COASESOR: PhD JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. MEX. 2003

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

" IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T EN APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS CAPRINOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS CAPRINA"

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA:

GERARDO ARCILA LÓPEZ-TELLO

ASESOR: M EN C. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRÍGUEZ.
COASESOR: PhD JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2003

2

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS
"Identificación de subpoblaciones de linfocitos T en el aparato reproductor de ratas caprinas inoculadas con el virus de Artritis Encefalitis Caprina".

que presenta el pasante Gerardo Arcila López Rello
con número de cuenta 9603284 para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx a 25 de Febrero de 2003

PRESIDENTE	M.C. Saúl Arturo Mar Cruz	
VOCAL	Dr. Jorge Luis Tortoriello Pérez	
SECRETARIO	M.C. Humberto Alejandro Martínez Jaramillo	
PRIMER SUPLENTE	MVZ. José Baldomero Torres	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Guillermo Flores Cruz	

3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gracias a todos lo seres que han tenido influencia en mi existencia.

No pueden enseñártelo todo.
Solo pueden enseñarte ha encontrarlo
por ti mismo.
Galileo Galilei
(1564-1642)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice.

Resumen 1

Objetivo 2

Introducción 3
- Artritis Encefalitis Caprina 3
- Definición 3
- Etiología 3
- Epidemiología 4
- Patogenia 5
- Hallazgos Clínico-Patológicos 5
- Diagnóstico diferencial 6
- Diagnóstico de laboratorio 7
- Tratamiento 7
- Prevención 7
- Control 7
- Los Linfocitos T 9
- Origen 9
- TCR y Correceptores 10
- Linfocitos T CD4 10
- Linfocitos T CD8 14
- Linfocitos T γδ 14

Material y Métodos 17

Resultados 18

Discusión 27

Conclusión 28

Bibliografía 29

Anexos 33

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de Figuras.

Figura 1.- Estructura del VAEC 3
Figura 2.- Presentación clínica de la AEC 6
Figura 3.- Desarrollo de los Linfocitos T en Timo 11
Figura 4.- Estructura del TCR y Correceptores CD4 y CD8 12
Figura 5.- Interacción de linfocitos T CD8, con su célula blanco 15
Figura 6.- Microfotografías de linfocitos T CD4 *in situ* 21
Figura 7.- Microfotografías de linfocitos T CD8 *in situ* 23
Figura 8.- Microfotografías de linfocitos T γδ *in situ* 25

Índice de Cuadros.

Cuadro 1.- Función de las subclases de linfocitos T CD4 13
Cuadro 2.- Marcaje de subpoblaciones de linfocitos en glándulas anexas 20

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

Debido a la creciente importancia que ha ido tomando la Artritis Encefalitis Caprina en nuestro país y la poca información que existe sobre sus efectos en el aparato reproductor de los machos, el presente trabajo se enfoca en identificar que subpoblaciones de linfocitos T (CD4, CD8 y γδ), responden ante la presencia del virus en glándulas anexas de machos caprinos infectados naturalmente, inoculado con la cepa de referencia ATCC y el aislado realizado en la FES Cuautitlán ; así como en animales negativos a la infección, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

En los animales infectados naturalmente se encontró un fuerte infiltrado de linfocitos T CD4 en tejido prostático asociado a uretra, el infiltrado de CD8 en el mismo órgano fue moderado, al igual que el infiltrado de γδ. En la glándula bulbouretral el infiltrado correspondiente a CD4 y CD8 fue moderado, y el infiltrado γδ fue ligero. En ámpula y glándula vesicular no se observó infiltrado linfocitario.

En los animales inoculados con la cepa ATCC se encontró un moderado infiltrado para CD4 y CD8 en glándula bulbouretral, mientras que el infiltrado de γδ fue ligero. En ámpula y glándula vesicular no se observó infiltrado.

En los animales inoculados con el aislado FESC se encontró un moderado infiltrado de CD4 en glándulas bulbouretrales, también se observó moderado infiltrado de CD8 en la misma glándula, mientras que el infiltrado de γδ fue ligero.

Finalmente, en los animales Negativos a la infección no se observó infiltrado linfocitario en ninguna de las glándulas anexas, para ninguna de las subpoblaciones estudiadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO .

Identificar de forma cualitativa las subpoblaciones de Linfocitos T: CD4, CD8 y γδ, que se localizan en las glándulas anexas del tracto reproductor de machos caprinos infectados con el virus de Artritis Encefalitis Caprina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introducción.

Artritis Encefalitis Caprina.

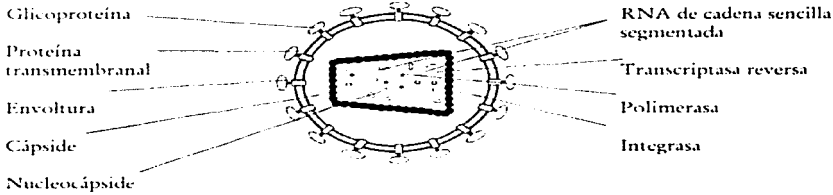
Definición:

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) es una enfermedad infecciosa de los caprinos ocasionada por un virus, se caracteriza por ser multisistémica con dos presentaciones: una en animales adultos con poliartritis degenerativa, mastitis indurativa, neumonía progresiva y pérdida de peso y otra en cabritos con leucoencefalomielitis.

Etiología:

Las características morfológicas, físicas y bioquímicas del virus de la AEC (VAEC), lo colocan dentro de la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*. Se trata de un virus envuelto, con una cadena doble de RNA, con un peso molecular de aproximadamente 5.5×10^6 daltons, contiene transcriptasa reversa dependiente de magnesio, que transcribe el RNA en DNA proviral de 9.5 kilobases. Al microscopio electrónico se observan partículas de tipo C, esféricas, de 70 a 110 nanómetros de diámetro, que contienen una nucleocápside densa. Se encuentra antigénicamente relacionado con el virus del Maedi –Visna o Neumonía Progresiva Ovina; no se ha observado reacción cruzada con el virus de la Anemia Infecciosa Equina, ni con otros retrovirus oncogénicos o no oncogénicos (Robinson y col., 1986; Dinter y col., 1990; Murphy y col., 1999)(Figura 1).

Figura 1.- Estructura de VAEC
Fuente: Murphy y col., 1999; modificado por Arcila, 2002.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Epidemiología:

La enfermedad ocasiona considerables perdidas económicas en la industria caprina y su distribución es mundial (Baba y col., 2000). La prevalencia de la infección, aún sin signos clínicos, varía ampliamente y puede alcanzar el 80% en hatos grandes, pero la cifra promedio probable es de 25%. La prevalencia es notablemente menor en países en desarrollo que no han importado animales de Norteamérica o Europa (Blood y col., 1992).

El primer aislamiento del VAEC en México se reporto en 1986, aunque ya existían estudios serológicos donde se reporta una seroprevalencia en un rango de 17% a 35%, en cabras importadas; así como la descripción de algunos casos que presentaban signos clínicos en algunos hatos del país (Gay y col., 1986; Daltabuit 1999).

Entre los animales susceptibles se encuentran los Caprinos de ambos sexos, todas las edades y razas, observándose una mayor presencia en animales lecheros, debido al tipo de manejo, más intensivo al que son sometidos. De forma experimental se han infectado ovinos, muflones y venados (Yahia, 1999).

El modo de infección más frecuente es a través del calostro y leche provenientes de cabras infectadas, debido a la presencia de células mononucleares, contenidas en estas secreciones. Sin embargo se ha observado que algunos cabritos nacidos de hembras infectadas, pero alimentados con calostro o leche pasteurizados, han presentado anticuerpos contra el VAEC, indicando la posible infección *in-utero*, contacto con secreciones vaginales durante el parto o el contacto con otras secreciones de la hembra. La transmisión entre animales adultos se da por contacto estrecho entre los animales, es decir, en explotaciones intensivas los animales son confinados en grupos grandes, lo cual favorece el contacto de los animales susceptibles con secreciones de los infectados como saliva, moco, heces u orina. La vía de transmisión venérea no es tan eficiente como la vía calostral, sin embargo debe ser tomado en cuenta sobre todo en explotaciones que se encuentren en programas de control de la enfermedad. Se ha observado un mayor grado de seroconversión en hembras apareadas con machos infectados; así también se ha demostrado la presencia del VAEC en células presentes en el moco estral de cabras infectadas, células prepuciales y semen de machos caprinos infectados (Rowe, 1999; Travassos y col., 1999; Thibier y col., 2000), como en el caso de otros retrovirus, el virus de la inmunodeficiencia humana, el de la inmunodeficiencia del simio, el de la inmunodeficiencia bovina y el de la inmunodeficiencia felina, en las cuales ya se ha comprobado su transmisión por esta vía (Mermin y col., 1991; Miller y col., 1994 y Giradil y col., 1999; Jordan y col., 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Patogenia:

Al exponerse los caprinos al VAEC, se produce una infección sistémica persistente, durante la cual el virus infecta y se replica en células de la serie monocito-macrófagos, exclusivamente. Dentro de estas células, el virus inserta su información genética, adoptando su fase proviral; posteriormente los monocitos migran por vía sanguínea hacia los diferentes tejidos, donde se activan a macrófagos tisulares. Es en este punto donde el provirus es activado y comienza a producir las partículas infectantes (Dintel y col., 1990; Robinson y col., 1986).

El VAEC sigue tres estrategias principales para eludir al sistema inmune, lo cual le permite ocasionar una infección sistémica persistente.

1. El virus se adopta una forma proviral dentro de su célula receptora, insertando su DNA en el de la célula
2. Este virus se replica de manera preferente en los macrófagos.
3. Este tipo de virus, generalmente no estimula producción de anticuerpos neutralizantes, por lo cual continua su replicación sin ningún control de tipo humoral.
4. El virus presenta variaciones antigénicas importantes durante el curso de la enfermedad, lo cual evita su reconocimiento rápido por células de memoria.

(Dintel y col., 1999; Peterhans y col., 1999; Ellis y col., 1987).

Hallazgos Clínico-Patológicos:

A pesar de que se trata de una infección multisistémica, la enfermedad clínica se manifiesta de diferentes maneras, dependiendo de la edad del animal. La forma artrítica es una sinovitis crónica hiperplásica, que ocurre en caprinos adultos, observándose en la mayoría de los casos, en articulaciones carpales. El comienzo puede ser insidioso o repentino y unilateral o bilateral. Las cabras afectadas pierden peso gradualmente y desarrollan articulaciones hinchadas. Se encuentran echadas la mayor parte del tiempo y como resultado pueden ocurrir úlceras por decúbito. En algunos casos, ocurre dilatación de la bolsa atlántica y supraespinosa (fig. 2A). El curso de la enfermedad es largo, durando de varios meses hasta años (Blood y col., 1992). Los cambios histopatológicos observados se caracterizan por proliferación de la membrana sinovial con desarrollo de proyecciones vellosas en el lumen de la articulación. Posteriormente se presenta necrosis de la colágena, incluyendo la cápsula sinovial, tendones y ligamentos. Se presenta mineralización de los restos de cartílago necrosado. El líquido sinovial se observa pardo, sanguinolento, con alta presencia de células mononucleares (Dintel y col., 1999; Robinson y col., 1986)

A la presentación artrítica se puede asociar una neumonía progresiva, caracterizada por dificultad para respirar después de un leve esfuerzo, para progresar a disnea, aun cuando el animal se encuentra en reposo. Histopatológicamente se observa que los septos alveolares están engrosados de manera irregular, por linfocitos, y en menor medida macrófagos (Robinson y col., 1986).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las cabras lactantes pueden presentar una mastitis indurativa, ésta se presenta de 1 a 3 días después del parto; la ubre se encuentra firme o dura, con poca producción de leche, no existe mastitis bacteriana asociada y la recuperación no es completa. Histopatológicamente se observan algunos linfocitos diseminados por los septos acinares (Robinson y col., 1986).

La presentación en cabritos de 2 a 4 meses de edad es de tipo nerviosa, comienza con parálisis de los cuartos traseros, la cual puede ser uni o bilateral. Algunos pueden caminar en círculos e incluso presentar ceguera. En algunas semanas la parálisis se extiende a los cuartos delanteros. Si se recupera el animal quedan con parálisis residual, tortícolis o desviación de la cabeza. Usualmente presentan pelo áspero y músculos atrofiados (Fig. 2B). Sin embargo se encuentran afebriles y mantienen un buen apetito. Los sobrevivientes de la enfermedad nerviosa desarrollan artritis similar a la observada en caprinos adultos. Patológicamente se observa una encefalomielitis desmielinizante. En el líquido cerebro espinal aparece gran cantidad de células mononucleares, además de un infiltrado perivascular diseminado (Dintel y col., 1999; Storset y col., 1997).

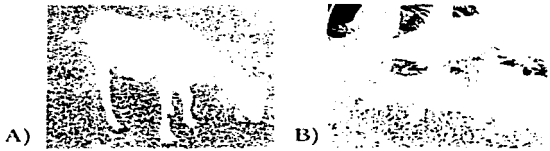


Figura 2.- Presentación clínica de la AEC.
A) Cabra adulta con artritis en articulaciones carpales, y dilatación de bolsa atlántica.
B) Cabrito con parálisis en tren posterior y en musculatura de cuello.

Diagnostico diferencial:

El diagnóstico diferencial de la forma artrítica de la enfermedad incluye otras causas de artritis infecciosa, como las causadas por micoplasmas, clamidias, *Corinebacterium spp.* y *Brucella spp.* La forma nerviosa debe diferenciarse de la ataxia ocasionada por deficiencia de cobre, listeriosis y toxoplasmosis (Blood y col., 1992).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diagnostico de laboratorio:

El virus se puede aislar a partir de sangre, separando las células mononucleares mediante gradientes y se cocultivan con células sinoviales caprinas no infectadas, se incuban por 2 o 3 semanas, observándolas constantemente para detectar la formación de sincitios (Dinter y col., 1999).

Los métodos mas eficientes para el diagnostico del VAEC son los serológicos. La respuesta inmune humoral generada por el virus es detectable a los 40 o 60 días postinfección, aunque se reportan respuestas positivas desde los 21 días. El título máximo de anticuerpos aparece de 40 a 77 días postinfección, progresivamente disminuye, pero sigue presente hasta 9 meses postinfección. Esta respuesta humoral, esta dirigida a la estructura interna proteica del virión (p28) y a las glicoproteínas de superficie del VAEC, los anticuerpos son detectables tanto en suero, como en líquido sinovial y semen (Dinter y col., 1999; Travassos y col., 1999; Ellis y col., 1987). Los métodos serológicos más usados son Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG), ELISA y Western Blot. La IDAG cuenta con una excelente especificidad pero baja sensibilidad. Las pruebas de ELISA utilizan antígenos recombinantes o preparados a partir de cultivo celular infectado, conteniendo principalmente la glicoproteína ENV. En forma similar a la utilizada en el VIH, el Western Blot es utilizado como una prueba confirmatoria a los resultados de ELISA (Peterhans, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la seroconversión puede suceder tardiamente, especialmente en hatos con baja seroprevalencia; por lo cual sería deseable detectar al virus, por medio de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa(PCR) (Peterhans, 1999).

Tratamiento:

No existe tratamiento para cualquier presentación de la enfermedad (Mattheus, 1999).

Prevención:

La inmunización con preparaciones de virus vivo o inactivado no protege a los animales de infecciones posteriores, ya que el VAEC no induce la producción de anticuerpos neutralizantes . La forma mas efectiva para evitar la entrada del VAEC a una explotación será la de impedir la entrada de animales portadores de la enfermedad (Dinter y col., 1999; Robinson y col., 1986).

Control:

Para el control de la enfermedad se siguen tres estrategias principales:

- Detección de animales portadores mediante pruebas serológicas, realizadas cada 6 meses; 5 años o más sin reactores positivos, se considera como hato libre. Los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

animales positivos deberán ser aislados completamente del hato sano, las hembras portadoras deberán ordeñarse hasta el final; además se eliminarán lo más pronto posible.

- Separar a los cabritos de su madre antes de que éstos comiencen a consumir calostro. Estos cabritos se criarán separados del resto del hato, alimentados con leche de vaca o de cabra pasteurizada. Además, periódicamente se les deberán realizar pruebas serológicas en intervalos de 3 a 6 meses y eliminar inmediatamente a los reactores positivos.

- Realizar valoraciones serológicas a los sementales y al semen utilizado en la inseminación artificial, eliminando los animales y el semen reactor positivo.

(Robinson y col., 1986; Mattheus, 1999; Rowe 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los Linfocitos T.

La respuesta inmune contra los virus consiste en dos tipos:

- Inmunidad a virus mediada por anticuerpos producidos por linfocitos B; esta respuesta consiste en el bloqueo de la adsorción del virus por la célula blanco, estimulando la fagocitosis de los virus por macrófagos, iniciando la virólisis mediada por el complemento o causando la aglutinación viral, con lo cual reducen el numero de unidades infecciosas para cualquier invasión celular.
- Inmunidad a virus mediada por células, es quizás la mas importante para el control de enfermedades virales. Las principales células participantes en esta respuesta son los linfocitos T cooperadores, citotóxicos y de memoria y células NK (asesinas naturales).

(Tizard, 1998; Stites y col., 2000).

Debido a los objetivos de este trabajo se explicar con mayor detalle el origen y función de los Linfocitos T.

Origen:

Las células madre pluripotenciales localizadas en la médula ósea dan origen a las células progenitoras mieloides, linfoides, eritroides y megacariocitos. Las células progenitoras mieloides dan origen a los monocitos, que posteriormente serán macrófagos tisulares, granulocitos y mastocitos. Mientras que las células progenitoras linfoides originan a los linfocitos B y T. Los linfocitos B activados se diferencian en células plasmáticas, especializadas en la producción de anticuerpos. Los linfocitos T se diferencian en células T citotóxicas, las cuales destruyen células infectadas por virus, y células T cooperadoras, las cuales estimulan la respuesta inmune celular y humoral (Slauson y col., 2002).

Las células T se desarrollan a partir de células progenitoras derivadas de la medula ósea que sufren maduración en el timo. Tempranamente en su desarrollo, los timocitos expresan varias moléculas de superficie celular, como CD2, características de los linfocitos T, pero carecen de muchas otras como CD4 y CD8, por tanto se conocen como timocitos dobles negativos. El rearreglo de los genes TCR (*T cell receptors*) se inicia en la etapa doble negativa . Las células destinadas a convertirse en células T alfa/beta rearreglan primero en gen TCR beta y luego el gen TCR alfa. Si los arreglos conducen a la formación de proteínas funcionales TCR alfa y beta que pueden formar un dímero, el dímero alfa/beta y las moléculas CD3 se coexpresan en baja densidad en la superficie celular. En este punto de desarrollo los timocitos expresan CD4 y CD8 y se denominan timocitos doble positivos. Conforme los timocitos maduran, la densidad de expresión de TCR aumenta y las células pierden expresión de CD4 o de CD8 para convertirse en timocitos simples positivos. En esta etapa los timocitos han adquirido el fenotipo de células T periféricas, maduran y pronto salen del timo. Otro grupo de timocitos rearreglan los genes gama y delta, que darán origen a los Linfocitos T γδ, que al madurar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

podrán expresarse como doble negativo o como simple positivo CD8 (Stites y col., 2000; Slauson y col., 2002; Fink y col., 2000)(Figura 3).

TCR y Correceptores:

Los receptores de células T (TCR) son estructuras complejas, compuesta de diferentes tipos de proteínas, utilizadas para reconocer antígenos fijos al MHC tipo I y II y transducción de señales (Tizard, 1998).

El TCR está constituido por 2 cadenas de polipéptidos altamente variables, designadas como alfa(α) y beta(β), unidas entre sí por enlaces disulfuro. Cada cadena polipeptídica tiene una región variable y una región constante; la región variable de ambas cadenas forman el sitio de reconocimiento antigénico. Existe otra subpoblación de linfocitos T cuyos receptores están compuestos por cadenas gama(γ) y delta(δ)(Slauson, 2002).

El complejo de polipéptidos que forman el TCR α/β, o heterodímero, puede reconocer y unirse a antígenos presentados por moléculas del Complejo Mayor De Histocompatibilidad (MHC) clase I y II. Existe un complejo de polipéptidos que funcionan de forma auxiliar en la unión entre las células presentadoras de antígenos (APC), constando de 4 cadenas de polipéptidos no variables y un homodímero intra citoplasmático no variable, formando el complejo denominado CD3 (Slauson y col., 2002; Stites y col., 2000).

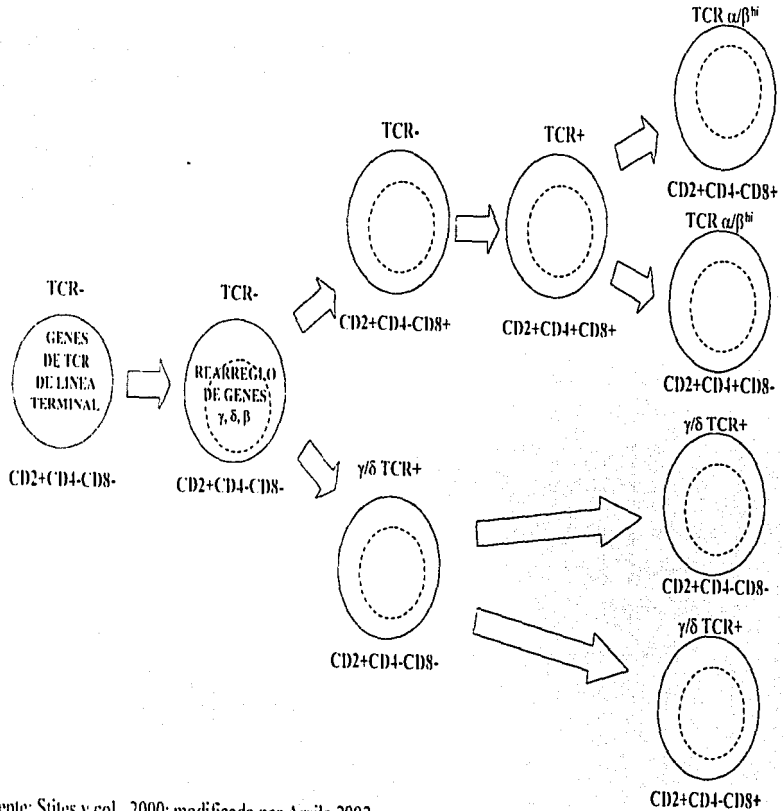
Para facilitar el envío de señales a través del complejo TCR, los linfocitos T expresan proteínas correceptoras de superficie, CD4 o CD8, que se asocian con los componentes del TCR durante el reconocimiento de antígenos. Esta expresión de CD4 y CD8 divide a las células en dos subpoblaciones: las que reconocen antígenos unidos al MHC clase II(CD4+) y aquellas que reconocen antígenos unidos a moléculas del MHC clase I(CD8+). El CD4 se enlaza a una región proximal a la membrana de las moléculas del MHC clase II que no participa de manera directa en el enlace de péptidos. Por otra parte, el CD8 se une a la región correspondiente de las moléculas del MHC clase I. Tanto el CD4 como el CD8 presentan grandes dominios intracitoplasmáticos de señalización que tienen actividad intrínseca de proteína tirosina cinasa(PTK), y las señales transmitidas por esos dominios al contacto con una molécula del MHC crean sinergia con señales que emanan del TCR (Stites y col., 2000)(Figura 4).

Linfocitos T CD4.

Los linfocitos T CD4 se diferencian en 2 grupos, linfocitos Th1 y Th2 . Este tipo de diferenciación estimulada por antígenos específicos tiene importantes repercusiones funcionales , debido a que los linfocitos Th1 promueven la inmunidad mediada por células, mientras que los linfocitos Th2 la inmunidad humoral. Los factores que más influencian la formación de estas subclases de CD4 son el tipo de antígeno identificado por el linfocito inmaduro, y la presencia de citosinas ante la cual se estimula la diferenciación (Slauson y col , 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

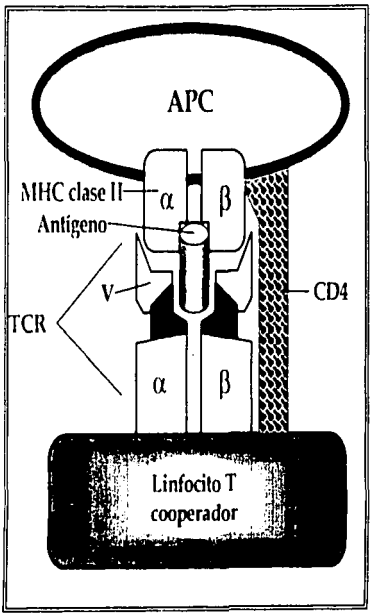
Figura 3.- Desarrollo de los Linfocitos T en Timo.



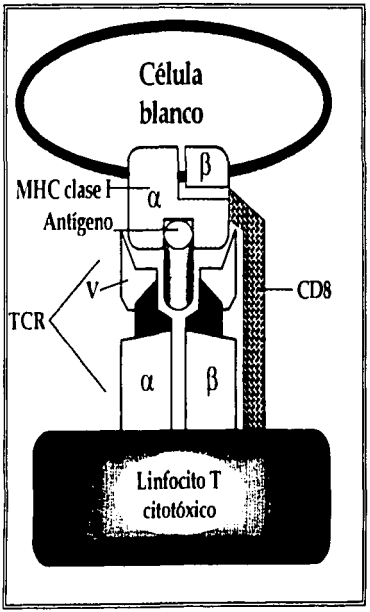
Fuente: Stites y col., 2000; modificado por Arcila 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4.- Estructura del TCR y de correceptores CD4 y CD8



Correceptor CD4



Correceptor CD8

Fuente: Tizard, 1997; Stites y col., 2000; modificado por Arcila 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las células presentadoras de antígeno (APC) presentan péptidos antigénicos derivados de patógenos intracelulares, unidos al MHC clase II. Los Linfocitos T CD4 inmaduros reconocen este complejo y se diferencian en Th1, que promueven la inmunidad celular estimulando la activación de macrófagos y la producción de IgGs opsonizantes, por parte de los linfocitos B. Las APC también pueden fagocitar agentes patógenos extracelulares, los cuales son degradados y sus péptidos antigénicos unidos a moléculas de MHC clase II, para presentarlos en la superficie de su membrana; los linfocitos T inmaduros reconocen los antígenos unidos al MHC y se diferencian en Th2, los cuales promueven la activación de linfocitos B, para la producción de anticuerpos neutralizantes e IgE, que inicia reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Durante las etapas tempranas de infección por patógenos intracelulares, las células dendríticas, los macrófagos y la células NK(natural killers), son estimuladas a producir IL-2 e INF-γ. IL-2 es un potente inductor de células Th1, y el INF-γ, inhibe a las células Th2. En contraposición la diferenciación de linfocitos T CD4 en presencia de IL-4 e IL-6 promueven la subclase Th2, inhibiendo a la otra subclase (Slauson y col., 2002; Shevach, 2000; Read y col., 2001).

La función de cada una de estas subclases de linfocitos T CD4 , esta expresada en función de las citosinas que producen, en el cuadro No.1 se enumeran estas citosinas y su función:

Subclase.	Citosina Secretada.	Efectos inmunológicos Principales.
Th1	INF-γ	Activa macrófagos, Promueve la proliferación de células B y cambio de clase a IgG1.
	IL-2	Promueve la diferenciación de células Th y Tc especificas a antígeno.
	TNF-β	Activa macrófagos y neutròfilos. Promueve el crecimiento de células B y la producción de inmunoglobulinas opsonizantes.
Th2	IL-4 e IL-13	Quimitoactismo de linfocitos, células cebadas y basófilos. Aumento en el crecimiento de células cebadas y eosinófilos. Promueve la proliferación de las células B y el cambio de clase a IgE e IgG4. Inhibe la diferenciación de células Th1. Inhibe la producción de citosinas por macrófagos. Aumenta el crecimiento y desarrollo de eosinófilos.
	IL-5	Promueve el crecimiento de las células B y la producción de inmunoglobulinas.
	IL-6	Inhibe la producción de citosinas, incluso INFγ, por células Th1, macrófagos y otras APC.
	IL-10	Inhibe la diferenciación de células Th1. Promueve el crecimiento de células B y la producción de inmunoglobulinas.

Cuadro No.1.- Función de las subclases de Linfocitos T CD4 (Stites y col., 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Linfocitos T CD8.

En el tejido periférico linfoide, los linfocitos T CD8 inmaduros se activan cuando encuentran antígenos unidos a MHC clase I, en la superficie de APC. Estos péptidos antigénicos presentados por el MHC clase I derivan de condiciones patogénicas intracelulares que expresan nuevos antígenos. Los linfocitos T CD8 activados son comúnmente denominados como células citotóxicas, ya que su función es la liberación de citotoxinas y secreción de citosinas. Las citotoxinas producidas por los CD8 son las perforinas y granzimas: Las perforinas son proteínas que se polimerizan dentro de la membrana superficial de las células blanco hasta formar estructuras circulares, a manera de poros, denominadas complejos de ataque de membrana(MAC), los cuales ocasionan la lisis osmótica de la célula blanco. Las Granzimas son estearasas de serina, que estimulan la apoptosis cuando éstas llegan al interior de las células blanco a través de los MAC de las perforinas (Tizard, 1998; Barouch y col., 2001).

Al mismo tiempo los Linfocitos T CD8 comienzan la síntesis y secreción de citosinas, entre las que se encuentran IFN-γ, TNF-α y TNF-β. El interferón gama (INF-γ) activa a los macrófagos para aumentar su capacidad de destrucción de los microorganismos fagocitados, además bloquea los receptores superficiales de otras células evitando que se adhieran agentes patógenos a ellos. El factor de necrosis tumoral alfa(TNF-α) estimula a los macrófagos e inicia los procesos apoptóticos en las células blanco. De manera similar actúa el TNF-β, sin embargo este también activa neutrófilos, células endoteliales y linfocitos B (Gao y col., 2000)(Figura 5).

En los linfocitos T CD8 también se distinguen 2 subclases, debido al tipo de citosinas que secretan. La subclase T1 secreta de manera característica IFN-γ mientras que la subclase T2 secreta IL-5. Ambas clases son citotóxicas, pero las células T1 utilizan la vía de las perforinas y de CD95, mientras que las células T2 se valen únicamente de las perforinas. Se ha demostrado que las perforinas se utilizan para destruir a las células infectadas por virus, y la vía de CD95 para regular el desarrollo de la célula T (Tizard, 1998).

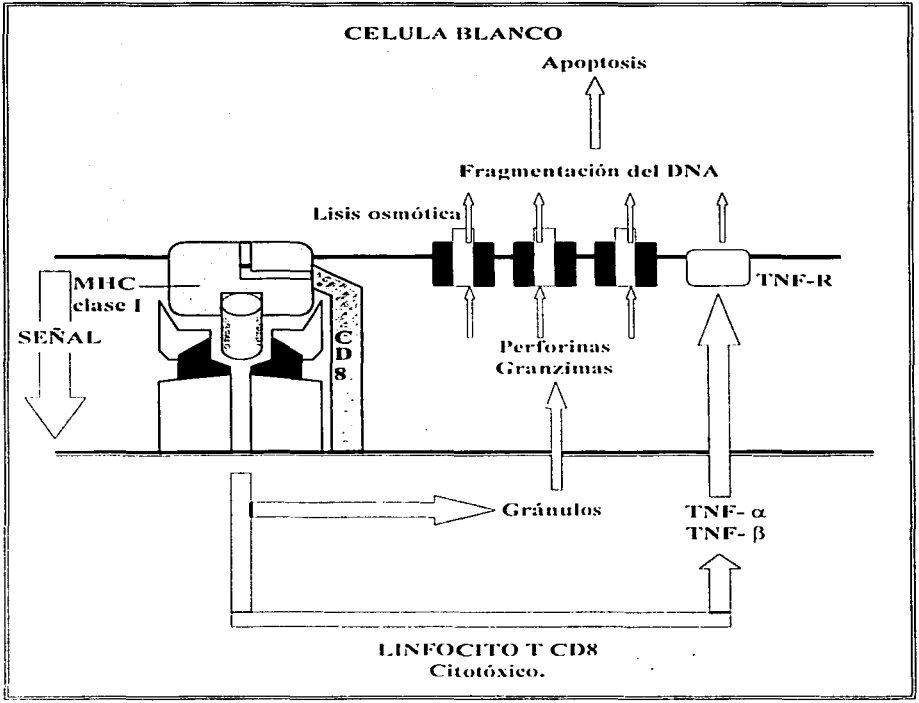
Linfocitos T γδ.

El 60% de los linfocitos presentes en sangre periférica de los rumiantes posee un TCR que consiste en 2 cadenas gama(γ) y delta(δ). Se distinguen 2 clases de linfocitos T γδ , inmaduros y maduros. La clase inmadura se localiza en la corteza externa del timo, expresando niveles bajos de MHC clase I y menores niveles de TCR γδ, además de no presentar el antígeno diferencial T19. Esta clase aparece durante la etapa fetal de desarrollo tímico. La población madura expresa mayores niveles de MHC clase I, y TCR γδ, además de presentar el antígeno T19, se localizan predominantemente en la médula del timo son observados en altas densidades alrededor y en ocasiones dentro de los corpúsculos de Hassal (Hein y col., 1991).

Una vez que abandonan el timo, las células recirculan de manera continua entre las superficies epiteliales, como piel, epitelio intestinal, epitelio del aparato reproductor,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5.- Interacción de Linfocitos T CD8 con célula blanco.



Fuente: Tizard, 1997;modificado por Arcila 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y torrente sanguíneo. Luego, pasan a través de los ganglios linfáticos y regresan a la sangre a través de la linfa (Tizard, 1998).

Estas células son CD4-CD8- o CD4-CD8+. Pueden producir citosina y tienen capacidad citolítica. En los rumiantes estas células son las que responden de manera predominante en reacciones de linfocitos mixtos, lo cual indica que pueden reconocer antígenos ligados a MHC extraños y también pueden ser citotóxicas (Tizard, 1998,; Stites y col., 2000).

Se han encontrado linfocitos T γδ en lesiones ocasionadas por ectima contagioso y por algunas micobacterias, representando una primera línea de defensa (Baldwin y col., 2002; Sopp y col., 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Material y Métodos.

Se emplearon bloques de parafina de glándulas anexas de machos caprinos, obtenidos en un trabajo previo, los cuales correspondían a los órganos de animales distribuidos en cuatro grupos, según su condición respecto al VAEC, previa evaluación mediante las pruebas de inunodifusión en agar-gel (AGID), ELISA, Western Blot (WB) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Grupo *IN*) 5 animales infectados naturalmente con virus de Artritis Encefalitis Caprina (VAEC).

Grupo *ATCC*) 3 animales inoculados con una cepa de VAEC de referencia ATCC No. VR0 5.

Grupo *FESC*) 3 animales inoculados con VAEC aislado FESC.

Grupo *NEG*) 3 animales negativos al VAEC.

Las glándulas accesorias obtenidas fueron ámpula, glándula bulbouretral, vesícula seminal y tejido prostático asociado a uretra. A estos bloques se les realizaron cortes de 6 a 10 micras de espesor y se fijaron sobre portaobjetos Posteriormente se procesaron mediante un Kit de peroxidasa (DAKO LSAB+KIT, No. de catalogo K0679), y anticuerpos monoclonales contra receptores de Linfocitos T CD4, CD8 y gama-delta de ovino, los cuales reconocen linfocitos de caprino, proporcionados por C.R. Mackay del Instituto Basel de Inmunología, de Suiza.

El procedimiento se describe en el Anexo I.

Se identificaron las subpoblaciones presentes, su localización y se evaluó el numero aproximado de células presente en el campo de 40x, ordenándose en 3 categorías, que se establecieron en base a criterio propio, ya que no existe literatura que reporte estos datos:

1. Escasas células por campo: de 1 a 5.
2. Moderadas células por campo: de 5 a 15.
3. Abundantes células por campo mas de 15.

Además de clasificarse por su distribución en focal o difuso.

Para obtener un control positivo, se obtuvo sangre periférica de una cabra, en tubos Vacutainer®, con EDTA. Posteriormente se realizo el método de minigradientes de ficoll para obtener las células mononucleares, ver Anexo II.

También se obtuvieron laminillas de tonsila, timo y bazo de caprino para demostrar la reacción cruzada de los anticuerpos monoclonales anti-ovino, con los receptores de caprinos (Larsen y col., 1990; Naessens y col., 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados.

Los resultados obtenidos por tejido se describen a continuación:

- Ámpula:

Marcaje para CD4: No existió marcaje especifico para este receptor en ninguna del las muestras procesadas en los 4 grupos experimentales (Fig. 6, 6.5., a 6.8.).
Marcaje para CD8: Se observo un escaso número de células por campo marcadas para este receptor, en el intersticio, en los cuatro grupos experimentales (Fig7, 7.5. a 7.8.).
Marcaje para Gama-Delta: No existió marcaje para este receptor, en los cuatro grupos experimentales (Fig. 8, 8.5. a 8.8.).

- Glándula Bulbouretral:

Marcaje para CD4: Se observó un moderado numero de células por campo marcadas, distribuidas en el intersticio de la glándula, con escaso marcaje de linfocitos intraepiteliales, en los grupos de animales infectados naturalmente, animales inoculados con el VAEC de referencia ATCC y animales inoculados con el VAEC aislado en FESC (Fig. 7, 7.1. a 7.3.). Mientras que en el grupo de animales negativos al VAEC no se observó presencia de marcaje (Fig. 6, 6.4.).
Marcaje para CD8: Se observó moderado número de células marcadas en el intersticio de la glándula con distribución difusa, en los tres grupos de animales infectados (Fig. 7, 7.1. a 7.3.). En el grupo de animales negativos no se observó presencia de marcaje (Fig. 7, 7.4.).
Marcaje para Gama-Delta: El marcaje se presentó en escasas células del intersticio y en algunos linfocitos intraepiteliales, con distribución focal, en los animales de los grupos de animales infectados naturalmente, animales inoculas con el VAEC de referencia ATCC y animales inoculados con el VAEC aislado en FESC (Fig.8, 8.1. a 8.3.). En el grupo de animales negativos no se observó marcaje (Fig. 8, 8.4.).

- Glándula vesicular:

No se encontró marcaje específico para ninguna de las subpoblaciones estudiadas en los 4 grupos (Fig. 6, 6.9. a 6.12., Fig. 7, 7.9. a7.12., Fig. 8, 8.9. a 8.12.).

- Tejido Prostático Asociado a uretra: De este tejido solo se procesaron muestras del grupo de animales infectados naturalmente y de animales negativos, por no disponer de los bloques de parafina de los animales de los dos grupos restantes.

Marcaje para CD4: En el grupo de animales infectados naturalmente se observó un abundante número de células marcadas, de forma difusa, correspondiendo con linfocitos intraepiteliales (Fig. 6, 6.13.) En el grupo de animales negativos no se observó marcaje (Fig. 6, 6.14.).
Marcaje para CD8: En el grupo de animales infectados naturalmente se observó un moderado número de células marcadas en el intersticio de la glándula, distribuidas difusamente (Fig. 6, 7.13.). En el grupo de animales negativos no se observó marcaje (Fig. 7, 7.14.).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Marcaje para Gama-Delta: El grupo de animales infectados naturalmente presentó un moderado número de células de distribución focal en intersticio y de linfocitos intraepiteliales (Fig. 8, 8.13.). En el grupo de animales negativos no se observó marcaje (Fig. 8, 8.14.).

En el Cuadro 2 se resumen estos resultados para su mejor comprensión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2.- Marcaje de subpoblaciones de linfocitos en glándulas anexas.

	Ámpula			*GBU			**G.VES.			***TEJ.PROST.ASOC.		
GRUPO	CD4	CD8	γδ	CD4	CD8	γδ	CD4	CD8	γδ	CD4	CD8	γδ
IN	-	+ F	-	++ D	++ D	+ F	-	-	-	+++ D	++ D	++ F
FESC	-	+ F	-	++ D	++ D	+ F	-	-	-	NR	NR	NR
ATCC	-	+ F	-	++ D	++ D	+ F	-	-	-	NR	NR	NR
NEG	-	+ F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- Negativo: -
- Escasas células por campo (1 a 5): +
- Moderadas células por campo (5 a 15): + +
- Abundantes células por campo (mas de 15): + + +
- NR: no realizado.

*GBU: Glándula bulbouretral. **G. VES: Glándula vesicular.

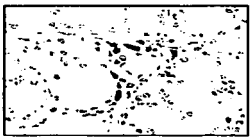
IN: Animales infectados naturalmente con el VAEC.
FESC: Animales inoculados con el VAEC aislado en FESC.
ATCC: Animales inoculados con el VAEC de referencia ATCC.
NEG: Animales negativos al VAEC.
-D: distribución difusa; F: distribución focal.
*** TEJ.PROS.ASOC.: Tejido prostático asociado a uretra.

TESIS CO
FALLA DE ORIGEN

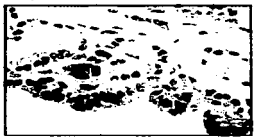
Figura 6.- Microfotografías de Linfocitos T CD4 *in situ*.

Glandula Bulbouretral(GBU)

➢ 6.1. Animal Infectado Naturalmente (40x).



➢ 6.2. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).



➢ 6.3. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).

➢ 6.4. Animal Negativo (40x).

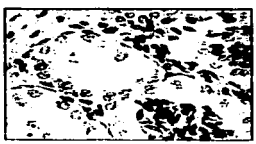
Ampula.

➢ 6.5. Animal Infectado Naturalmente (40x).

➢ 6.6 Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).

➢ 6.7. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).

➢ 6.8. Animal Negativo (40x).



TESIS
FALLA DE ORIGEN

Vesícula seminal.

➢ 6.9. Animal Infectado Naturalmente (40x).

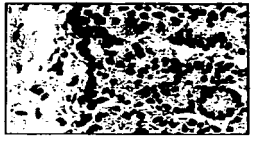
➢ 6.10. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).

➢ 6.11. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).

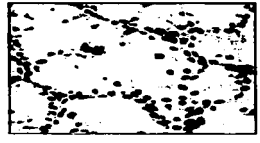
➢ 6.12. Animal Negativo (40x).

Tejido prostático asociado.

➢ 6.13. Animal Infectado Naturalmente (40x).



➢ 6.14. Animal Negativo (40x).

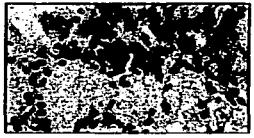


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7.- Microfotografías de Linfocitos T CD8 *in situ*.

Glandula Bulbouretral(GBU)

➢ 7.1. Animal Infectado Naturalmente (40x).



➢ 7.2. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).

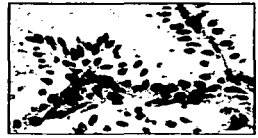
➢ 7.3. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).

➢ 7.4. Animal Negativo (40x).

Ampula.

➢ 7.5. Animal Infectado Naturalmente (40x).

➢ 7.6. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).



➢ 7.7. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).

➢ 7.8. Animal Negativo (40x).

FALLA DE ORIGEN

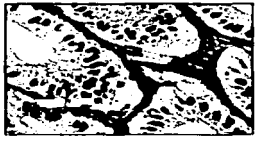
Vesicula seminal.

➢ 7.9. Animal Infectado Naturalmente (40x).

➢ 7.10. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).

➢ 7.11. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).

➢ 7.12. Animal Negativo (40x).



Tejido prostático asociado.

➢ 7.13. Animal Infectado Naturalmente (40x).

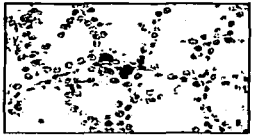
➢ 7.14. Animal Negativo (40x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

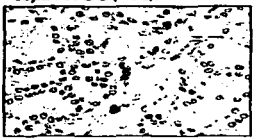
Figura 8.- Microfotografías de Linfocitos Gama-Delta *in situ*.

Glandula Bulbouretral(GBU)

➢ 8.1. Animal Infectado Naturalmente (40x).

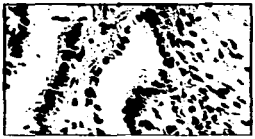


➢ 8.2. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).



➢ 8.3. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).

➢ 8.4. Animal Negativo (40x).

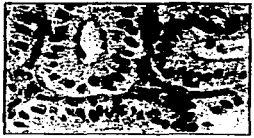


Ampula.

➢ 8.5. Animal Infectado Naturalmente (40x).

➢ 8.6. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).

➢ 8.7. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).



➢ 8.8. Animal Negativo (40x).

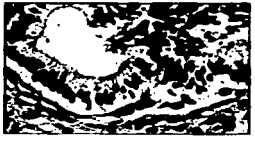
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Vesicula seminal.

➢ 8.9. Animal Infectado Naturalmente (40x).

➢ 8.10. Animal Inoculado con cepa ATCC (40x).

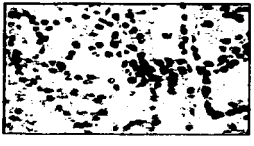
➢ 8.11. Animal Inoculado con Aislado FESC (40x).



➢ 8.12. Animal Negativo (40x).

Tejido prostático asociado.

➢ 8.13. Animal Infectado Naturalmente (40x).



➢ 8.14. Animal Negativo (40x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión.

Existe poca información disponible sobre la inmunidad en el aparato reproductor de pequeños rumiantes, y para el macho es prácticamente inexistente. Por lo cual se pueden comparar los resultados anteriores con otras enfermedades causadas por agentes de la misma familia, los cuales se han investigado más a fondo, y comparando la histología de otras especies, de las cuales si existe información.

Los retrovirus causantes de Inmunodeficiencia humana, bovina y del simio, presentan una transmisión por vía sexual, recientemente se ha aislado al VAEC del semen de machos caprinos infectados (Travassos 1999); este pone de manifiesto la importancia de los sementales en la prevalencia de la enfermedad en los rebaños. Otro dato es que se han observado lesiones importantes en órganos reproductores del hombre para el caso del VIH (Pudney 1991), en el simio (Miller 1994) y del toro (Gradil 1999), lo cual ocasiona una disminución en la fertilidad, pero en el caso del VAEC, no se observaron lesiones macroscópicas, y las lesiones microscópicas son mínimas, en glándulas accesorias, ya que testículo y epidídimo no se encuentran afectados, la calidad del semen no varía.

Esto se podría explicar ya que el infiltrado linfocitario corresponde en su mayoría a linfocitos T CD4, que son células auxiliares, mientras que las células con funciones citotóxicas como los linfocitos T CD8 y Gama-Delta, se encuentran en menor cantidad, por lo cual el daño tisular es mínimo aún en animales infectados.

Tizard en 1998 menciona que en algunas situaciones clínicas, si la cuenta de CD4 es alta, significa que la reactividad linfocitaria se ha incrementado, debido al aumento de células auxiliares, mientras que una cuenta alta de CD8 implica depresión de la reactividad linfocitaria. Jolly en 1997 reporta que la proporción de CD4/CD8 en sangre periférica de cabras infectadas con VAEC, decreció en forma importante y los niveles de linfocitos T γδ, también se incrementó. Sin embargo, en un estudio similar realizado por Grezel y colaboradores en el mismo año observaron que la presencia del VAEC no alteraba esta proporción. Sharmila en el año 2000 concluyó que la presencia del VAEC estimula la producción de IL-15 e IL-16, importantes estimuladores de linfocitos T CD4. Los trabajos anteriores podrían tomarse como antecedentes importantes para el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, si bien no se midieron proporciones de CD4/CD8, es claro que existe una respuesta mayor de linfocitos T CD4 en algunas de las glándulas anexas, lo cual sugiere que la actividad linfocitaria se encuentra incrementada debida a la presencia del VAEC.

Anderson y Pudney en 1999 reportaron que en el ser humano la presencia de linfocitos T en glándulas accesorias de individuos aparentemente sano es normal. Sin embargo en los animales negativos al virus no se observó la presencia de marcaje en ninguno de las glándulas, a excepción de ámpula donde se reconocieron algunos linfocitos T CD8, lo cual podría indicar que su presencia es normal en esta glándula. Histológicamente se han observado la presencia de células mononucleares en el intersticio de las glándulas anexas, sin embargo no se marcaron por medio de la técnica empleada en este trabajo, la posible explicación de este hecho puede ser atribuida ha que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estas células corresponden ha células NK, las cuales no presentan correceptores CD4 o CD8 ni γδ, y hasta cierto punto su morfología es similar a la de linfocitos T.

Otro factor que pudo afectar estos resultados esta relacionado con el hecho de que se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-ovino, debido a la imposibilidad de conseguir monoclonales específicos de caprinos; Larsen y colaboradores en 1990 reportaron que si bien existe un 70 u 80% de reconocimiento de receptores de linfocitos T de bovinos y caprinos mediante el uso de monoclonales anti-ovino, existe la posibilidad de que de 20 a 30 % de los linfocitos no sean reconocidos.

Conclusión.

Se encontró una respuesta mayor de linfocitos T CD4 en tejido prostático asociados a uretra y en glándula bulbouretral, mientras que el infiltrado de linfocitos T citotóxicos como los CD8 y Gama-Delta son poco frecuentes. Lo cual se explica por que no se observa daño tisular significativo. En ámpula y glándula vesicular no se observó este infiltrado. Además en ninguna de las glándulas accesorias de los animales negativos se observaron linfocitos marcados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bibliografía:

Anderson D.J., Pudney J. Mucosal Immun ology. Human Genital Tract Immunity and Experimental Models. Academic Press. U.S.A. 1411-1422, 1999.

Baba S.S., Fotabe A.I., Baba M.M. y Rimstad E. Preliminary survey for antibodies against caprine artritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant GAG proteins: studies among small ruminant populations in north-eastern Nigeria. Small Ruminant Research. 37: 137-140, 2000.

Baldwin C.L., Sathiyaseelan T., Naiman B., White A.M. Brown R., Bulmerman S., Roger A. & Black S.J. Activation of bovine peripheral blood γδ T cells for cell division and IFN-γ production. Veterinary Immunology and Immunopathology. 87: 251-259, 2002.

Barouch D.H., Letvin N.L. CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses to lentiviruses and herperviruses. Current Opinion in Immunology. 13: 479-482, 2001.

Blood D.C., Radostits O.M., Arundel J.H. & Gay C.C. Medicina Veterinaria. Séptima Edición. Editorial Interamericana, McGraw-Hill. España. 1008-1009, 1992.

Caro M., Gallego M.C., Buendía A.J., Navarro E. & Navarro J.A. Postnatal evolution of lymphocyte subpopulations in peripheral blood and lymphoid organs in the goat. Research in Veterinary Science. 65: 145-148, 1998.

Daltabuit M., de la Concha A., Espinosa L.E.L., Loza E. & Aguilar A.: Isolation of Caprine Arthritis Encephalitis Virus from goats in Mexico. Canadian Veterinary Research. 63: 212-215,1999.

Dinter Z., Moerin B. Virus Infections of Ruminants. Editorial Elsevier. USA. 441-452, 1990.

Ellis T.M., Wilcox G.E. & Robinson W.F.: Antigenic Variation of Caprine Arthritis Encephalitis Virus During Persistent Infection of Goats. Journal of General Virology 68: 3145-3152, 1987.

Fink P.J.McMahanC.J. Lymphocytes rearrange, edit and revise their receptors to be useful yet safe. Immunology Today. Vol.21,2000.

Gao F.G. Jakobsen B.K. Molecular interactions of correceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functionàl coordination with the T-cell receptor. Immunology Today. Vol.21,2000.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gay G., Valdivieso N., Tron F. y Enríquez O. **Informe preliminar del aislamiento del virus productor de Artritis Encefalitis Caprina en México.** Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México-SARH. México DF. 1986: 215.

Gradil C.M., Watson R.E., Renshaw R..W., Gilbert R.O. & Dubovi E.J. **Detection of bovine Immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls.** Veterinary Microbiology. 70: 21-31, 1999.

Grezel D., Forestier J., Guiguen F. & Mornex J.F. **T-lymphocytes population in the blood of caprine artritis encephalitis virus-infected gotas.** Veterinary Immunology and Immunopatology. 57: 99-104, 1997.

Hein W.R. & Mackay C.R. **Prominence of γδ T cells in the ruminant immune system.** Immunology Today. 12: 30-34, 1991.

Hopkins J. & Dutia B.M. **Monoclonal Antibodies to the Sheep Analogues of Human CD45 (Leucocyte Common Antigen), MHC Class I and CD5. Differential Expression after Lymphocyte Activation In Vivo.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 24: 331-346, 1990.

Ismail H.I., Hashimoto Y., Kon Y., Okada K., Davis W.C. & Iwanaga T. **Lymphocyte subpopulations in the mammary gland of the goat.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 52: 201-212, 1996.

Jolly P.E., Gangopadhyay A., Chen S., Gopal Redy P., Weiss H.L. & Sapp W.J. **Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis encephalitis virus.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 56: 97-106, 1997.

Jordan H.L., Howard J.G., Bucci J.G., Butterworth J.L. & English R. **Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats.** Journal of Reproductive Immunology. 41: 341-357, 1998.

Larsen R.A., Monaghan M.L., Park Y.H., Hamilton M.J., Ellis J.A. & Davis W.C. **Identification and Characterization of Monoclonal Antibodies Reactive with Bovine, Caprine and Ovine T-Lymphocyte Determinants by Flow Microfluorimetry.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 25:195-208, 1990.

Mattheus J. **Diseases of Goats.** Second Edition.Editorial Blackwell Science.UK. 80-87, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mermin J.H., Holodniy M., Katzenstein D.A. & Merigan T.C. **Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by polymerase chain reaction.** Journal of Infectious Diseases. 164: 386-388, 1991.

Miller C.J., Vogel P., Alexander N.J., Dandekar S., Hendrickx A.G. & Marx P.A. **Pathology and Localization of Simian Immunodeficiency Virus in the Reproductive Tract of Chronically Infected Male Rhesus Macaques.** Laboratory Investigation. 70: 255-262, 1994.

Murphy F.A.,Gibbs E.P.J., Horzinek M.C. & Studdert M.J. **Veterinary Virology.** Third Edition. Academic Press. USA. 364-373, 1999.

Naessens J. & Howard C.J. **Monoclonal antibodies reacting with bovine B cells (BoWC3, BoWC4 and BoWC5).** Veterinary Immunology and Immunopathology. 27: 77-85, 1991.

Peterhans E., Zanoni R. & Bertoni G. **How to succeed as a virus: strategies for dealing with the immune system.** Veterinary Immunology and Immunopathology. 72: 111-117, 1999.

Peterhans E. **Lentivirus of Small Rumiants: CAEV and Maedi Visna Virus.** 26th World Veterinary Congress: WVA Lyon Francia, 23rd-26th Septiembre, 1999.

Pérez-Martínez M., Mendoza M.E., Mena R., Luna J. y Romano M.C. **Análisis Cuantitativo de Linfocitos Totales y Subpoblaciones T (CD4+, CD8+) en el Endometrio de Cabras Prepúberes y Primalas Inducidas al Estro.** XII Reunión Nacional Sobre Caprinocultura. México, 1997.

Pudney J. & Anderson D. **Orchitis and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infected Cells in Reproductive Tissues from Men with the Acquired Immune Deficiency Syndrome.** American Journal of Pathology. 139: 149-160, 1991.

Read S. & Powrie F. **CD4 regulatory T cells.** Current Opinion in Immunology. 13: 644-649, 2001.

Robinson. WF. & Ellis TM. **Caprine arthritis encephalitis virus infection: from recognition to eradication.** Australian Veterinary Journal, 63: 237-241, 1986.

Rowe J.D. **Epidemiology of the CAEV: Horizontal Transmission of the Virus.** 26th World Veterinary Congress: WVA Lyon Francia, 23rd-26th Septiembre, 1999.

Sharmila C. Okwumabua O. Punna S. Reedy P.G. **Caprine lentivirus infection alters expression of interleukin-15 and 16.** Sixth International Veterinary Immunology Symposium, Uppsala, Sweden, 2000.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Shevach E.M. Suppressor T cell: Rebirth, function and homeostasis. Current Biology. 10: 572-575, 2000.

Slauson D.O. & Cooper B.J. Mechanisms of disease, a textbook of comparative general pathology. Third Edition.Editorial Mosby. USA. 247-263, 2002.

Sopp P. & Howard C.J. IFNγ and IL-4 production byy CD4, CD8 and WC1 γδ TCR+ T cells from cattle lymphnodes and blood. Veterinary Immunology and Immunopathology, 81: 85-96, 2001.

Stites D.P., Terr A.I. & Parslow T.G. Inmunología básica y clínica. Novena Edición. Editorial Manual Moderno. México. 46-161, 2000.

Storset A.K., Evensen O. & Rimstad E. Immunohistochemical Identification of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in Paraffin-embedded Specimens from Naturally Infected Goats. Veterinary Pathology. 34: 180-188, 1997.

Thibier M. & Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science. 62: 233-251,2000.

Tizard I. Inmunología Veterinaria. Quinta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México. 102-131, 153-165, 193-202, 1997.

Travassos C.E., Benoit C., Valas S., Da Silva A.G. & Perrin G. Caprine arthritis encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. Small Ruminant Research. 32: 101-106, 1999.

Yahia Ch. Cross Species Infection of Small Rumiant Lentiviruses. 26th World Veterinary Congress: WVA Lyon Francia, 23rd-26th Septiembre, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo I.

Desparafinado y Rehidratación.

1.- Colocar las laminillas en xileno durante 5 minutos, repetir dos veces.
2.- Eliminar exceso de líquido y rehidratar las laminillas en dos cambios de alcohol etílico absoluto por tres minutos cada uno.
3.- Eliminar el exceso de líquido y colocar en alcohol etílico al 96% por 3 minutos.
4.- Eliminar exceso de líquido y colocar en alcohol etílico al 90% por 3 minutos.
5.- Eliminar el exceso de líquido y colocar las laminillas en agua destilada por 30 segundos.

Bloqueo de la peroxidasa endógena.

1.- Eliminar el exceso de líquido y secar alrededor del tejido.
2.- Cubrir el tejido con suficiente peróxido de hidrogeno al 3%, incubar de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente.
3.- Lavar con PBS y dejarlas en un baño del mismo.

Digestión:

1.- Eliminar el exceso de líquido y secar alrededor del tejido.
2.- Aplicar sobre el tejido una solución de Tripsina al 0.025%, incubar por 6 minutos a temperatura ambiente.
3.- Lavar con PBS y dejarlas en un baño del mismo.

Bloqueo de receptores inespecíficos.

1.- Eliminar el exceso de líquido y secar alrededor del tejido.
2.- Cubrir el tejido con suficiente solución al 1% de Albúmina Sérica Bovina, e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4.- Lavar con PBS y dejarlas en un baño del mismo.

Reacción del anticuerpo primario.

1.- Eliminar el exceso de líquido y secar alrededor del tejido.
2.- Agregar de 100 a 200 µl del anticuerpo monoclonal, previamente diluido 1:2 en una solución de Albúmina Sérica Bovina al 1%, cubriendo todo el tejido.
3.- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda.
4.- Lavar con PBS y dejarlas en un baño del mismo.

Reacción del anticuerpo secundario.

1.- Eliminar el exceso de líquido y secar alrededor del tejido.
2.- Cubrir el tejido con suficiente solución de anticuerpos biotinados e incubar de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
3.- Lavar con PBS y dejarlas en un baño del mismo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Reacción con Estreptavidina .
1.- Eliminar el exceso de líquido y secar alrededor del tejido.
2.- Agregar suficiente solución de estreptavidina marcada con peroxidasa para cubrir el tejido. Incubar de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda.
3.- Lavar con PBS y dejarlas en un baño del mismo.

Reacción del sustrato.
1.- Eliminar el exceso de líquido y secar alrededor del tejido.
2.- Aplicar suficiente sustrato y cromógeno para cubrir el tejido.
3.- incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
4.-Lavar con agua destilada.

Contratinción.
1.- Cubrir el tejido con suficiente Hematoxilina de Harris e incubar por minuto y medio.
2.- Lavar por 5 minutos con agua destilada.
3.- Lavar con solución de carbonato de litio o agua amoniacal, 10 veces.
4.-Colocar las laminillas en agua destilada por 2 minutos.

Montaje.
1.- Deshidratar los cortes con alcoholes progresivos del 80 hasta el 100, de 3 a 5 minutos.
2.- Aclarar con dos cambios de xilol.
3.- Montar las laminillas con resina y cubreobjetos.

Anexo II.

1.- Centrifugar la sangre por 10 minutos, a temperatura ambiente y a 1700 – 2000 rpm en centrifuga clínica.
2.- Colectar el plasma, cuidando de no remover la capa de células blancas.
3.- Colectar en su totalidad la capa blanca, en 600µl y mezclar con 300µl de PBS para reconstituirlos.
4.- Transferir la sangra reconstituida a tubos con ficoll, pipeteando sobre el borde del tubo, para formar una capa de sangre sobre el ficoll.
5.- Centrifugar por 15 minutos a 1700 – 2000 rpm.
6.- Después de centrifugar en el gradiente se observaran 4 capas, de abajo hacia arriba: eritrocitos, ficoll, células blancas, y PBS/plasma. Transferir a otro tubo las células blancas y añadir 500µl de PBS y mezclar por inversión.
7.- Centrifugar por 4 minutos a 1700 – 2000 rpm, decantar el sobrenadante y añadir 1ml de PBS.
8.- Resuspender en vortex y repetir el lavado dos veces mas.
9.- Realizar un frotis sobre portaobjetos limpios y fijar con metanol por 5 minutos.
10.- Posteriormente se procesaran junto con los cortes de parafina utilizando la misma metodología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN