

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.**

**“ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE SEMEN PROVENIENTE
DE MACHOS CAPRINOS INFECTADOS CON ARTRITIS
ENCEFALITIS CAPRINA (AEC).”**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
SANDRA IRMA CRUZ RAMÍREZ.**

**ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRIGUEZ.
COASESOR: M EN C. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis padres

Les doy las gracias por haberme dado la vida, por apoyarme en mis decisiones tomadas durante todo este tiempo, por creer en mí en las buenas y en las malas. Gracias a ellos soy lo que soy hoy en día, una mujer con futuro.

A César Martínez y a María Fernanda gracias por su tiempo y su cariño.

A Hugo Ramírez Álvarez

Por su gran ayuda durante la elaboración de éste trabajo, por su amistad y por compartir sus conocimientos.

A el Dr. Humberto Alejandro Martínez con mucha admiración y respeto por todas las enseñanzas y el tiempo que me brindó, por ser una guía para mí y por su amistad.

A la UNAM y a la FES Cuautitlán que durante el tiempo que estuve en ella, fue como mi segunda casa.

AGRADECIMIENTOS

A la QFB Luz Rosales Montaña por su ayuda en la elaboración de la técnica de microscopía electrónica.

A todos mis amigos: Eloisa, Dalila, Leticia, Rocío, Marcela, Deyanira, Consuelo, Coco, Alma, Adela, Isabel Hernández, Graciela Castañeda, Lourdes Jara, Cesar, Rodolfo, Erik, Esaú, Alexis, Oscar Chávez, Gerardo Arcila, Carlos Zamora.

INDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Antecedentes de la enfermedad y distribución geográfica.....	8
Etiología.....	8
Características del virus.....	9
Especies susceptibles.....	9
Transmisión.....	10
Patogenía.....	11
Signos clínicos y lesiones.....	12
Diagnóstico.....	14
Diagnóstico diferencial.....	15
Inmunidad.....	15
Control y erradicación.....	17
Tratamiento.....	17
Justificación	18
Hipótesis	20
Objetivos	21
Material y métodos.....	22
Resultados.....	27
Discusión.....	33
Conclusión.....	36
Bibliografía.....	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Frotis de espermatozoides de macho caprino negativo a AEC por inmunocitoquímica.....	19
Figura 2.- Frotis de espermatozoides de macho caprino positivo a AEC por inmunocitoquímica.....	19
Figura 3.- Frotis de espermatozoides de caprino positivos al virus de AEC por inmunocitoquímica.....	20
Figura 4.- Frotis de espermatozoides de caprino negativos al virus de AEC por inmunocitoquímica.....	20
Figura 5.- Ultra micrografía de transmisión donde se observan cortes transversales (T) y longitudinales (L) de espermatozoides de caprino infectado con AEC donde es posible apreciar el desprendimiento de la membrana (M) del acrosoma (A).....	21
Figura 6.- Ultra micrografía de transmisión donde se observan cortes transversales (T) y longitudinales (L) de espermatozoides de caprinos infectados con AEC donde es posible apreciar el desprendimiento de la membrana (M) del acrosoma (A) y posibles estructuras sugestivas de partículas virales (PV). Cola del espermatozoide (C).	21

Tabla 1.- Pruebas utilizadas en el diagnóstico de AEC	10
Tabla 2.- Resumen de los resultados obtenidos en los parámetros evaluados del semen de caprinos naturalmente infectados y no infectados.	18
Tabla 3.- Conteo total de células mononucleares en líquido seminal de machos infectados naturalmente con virus de AEC y machos no infectados.....	22

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de partículas virales en espermatozoides de machos caprinos infectados con el virus de la artritis encefalitis caprina (AEC), utilizando para ello 6 machos caprinos de las razas Toggenburg (n = 3) y Criollos (n = 3); con edad promedio de un año, alojados en el área de experimentación animal de la Coordinación General de Estudios de Posgrado del Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo cuatro.

Los grupos experimentales se dividieron en 2: Grupo I (Criollos) control negativo y Grupo II (Toggenburg) infectados naturalmente.

Se tomaron muestras de semen por medio de electroeyaculador una vez al mes durante diez meses.

En el semen recolectado se evaluaron características como volumen, color, Ph y motilidad, no observándose ninguna diferencia entre los grupos. Se realizaron frotis del semen y se probaron por la técnica de inmunocitoquímica, evidenciando ligeras reacciones de la unión de antígeno-anticuerpo en el flagelo y cabeza de los espermatozoides de los animales infectados naturalmente y no así para los animales usados como control negativo. Por otro lado, se realizó la infección *in vitro* de espermatozoides provenientes del grupo control negativo con la cepa VR 905, 75.G63., aislado por Crawford (1980), obtenida de la ATCC (American Type Culture Coleccion). Los resultados observados fueron el desprendimiento de la membrana del espermatozoide tanto en el acrosoma como en la cola, encontrando este efecto tanto en los espermatozoides infectados *in vitro* así como en espermatozoides no infectados con el virus de AEC. Adicional a esto se observó en la cabeza de un espermatozoide una estructura semejante a la partícula desnuda del virus de AEC.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que es posible que los espermatozoides de caprinos puedan estar interaccionando con el virus de AEC como lo demostró la prueba de inmunocitoquímica, sin embargo no fue posible corroborar fehacientemente la presencia de partículas virales por microscopía electrónica, por lo que se considera importante realizar otros estudios de microscopía electrónica en espermatozoides obtenidos de

animales infectados experimentalmente y utilizar técnicas más sensibles para la identificación de partículas virales.

INTRODUCCION

Desde la llegada de los españoles a México y desde el inicio de la caprinocultura, esta especie ha sido relegada a los campesinos de menores recursos en las áreas más inhóspitas del país, considerándose como una actividad secundaria en el ramo pecuario (French, 1970).

Las cabras han proporcionado al hombre excelente carne roja y su demanda no ha cesado de incrementarse hasta el presente. Su consumo es mundial, debido a la buena adaptabilidad de la especie a diversos medios, a su fácil manejo y a la alta tasa productiva.

El número de razas y tipos descritos sobrepasa las 300, algunas altamente especializadas en la producción de leche, carne, pelos (mohair y cashmere) y pieles (Arbiza y De Lucas, 1996).

Se adapta a gran diversidad de sistemas de manejo y a la ingestión de múltiples alimentos, posee alta tolerancia a las aguas salinas y requiere menos líquidos que otras especies de rumiantes, como animal pequeño es de muy fácil manejo y en muchas regiones es cuidada y pastoreada por mujeres, ancianos y niños; son animales sexualmente precoces ya que presentan la pubertad a los 8 o 10 meses, poseen una alta tasa reproductiva por su alta prolificidad, son buenas madres. Muestran una alta rentabilidad, principalmente por su menor costo de alimentación, instalaciones, buena demanda y precios de sus productos.

También han ido desapareciendo las leyendas negras urdidas contra la cabra como animal erosionante, depredador o desertificante (Arbiza y De Lucas, 1996).

La carne de cabra es consumida en amplias regiones del mundo y no tiene tabúes religiosos como la carne de cerdo. El valor alimenticio de esta carne es similar a la de otras carnes rojas de rumiantes. Su contenido de proteínas es ligeramente mayor que la carne bovina y tiene un contenido mucho menor de grasa comparado con la carne de ovino, porcino y bovino (Arbiza y De Lucas, 1996).

En México la población caprina en 1990 era de 10,438,999 cabezas y en el año de 2003 fue de 8,991,752 cabezas (SAGAR, 1990-2003).

Sin embargo la producción caprina enfrenta retos, como la presencia de enfermedades que merman el rendimiento productivo. Por ello es necesario llevar a cabo estudios que nos

permitan saber el grado de dispersión de las enfermedades dentro de los hatos caprinos, ya que conociendo lo anterior estaremos en posibilidad de controlar los padecimientos que afectan a esta especie.

Dentro de las enfermedades que afectan a la cabra en México se encuentran: Linfadenitis caseosa, Queratoconjuntivitis, Ectima contagioso, Paratuberculosis, Complejo respiratorio caprino y Artritis encefalitis caprina entre otras (Piojan y Tórtora, 1986).

El semen presenta un gran riesgo en cuanto a la difusión de enfermedades infecciosas, sin embargo en muchos casos falta información precisa, tanto en lo que se refiere a la presencia de agentes infecciosos en el semen, como a la transmisión de enfermedades producidas por tales agentes (Hare, 1985).

Para realizar el diagnóstico de las enfermedades transmitidas por semen es necesario obtener el semen de los animales por medio de dos técnicas:

La primera comprende la electroeyaculación, es decir la estimulación eléctrica del tracto reproductivo a nivel de nervios simpáticos lumbares y sacros, de tal forma que al realizar descargas rítmicas a través de un electrodo introducido por el ano del macho, produce la erección y protusión del pene para finalmente eyacular. La respuesta se da después de 3 a 5 estímulos espaciados cada 5 a 6 segundos y con voltajes no superiores a 12 V. La recolección puede ser con el animal de pie o acostado. Debe cepillarse el prepucio para quitar impurezas. En cuanto al tubo colector debe estar a una temperatura de 37.5 – 38°C y protegido de la luz. El eyaculado obtenido suele presentar cambios físicos y bioquímicos de aquel obtenido con la vagina artificial, de tal forma que contiene mayor cantidad de plasma. En algunas ocasiones se puede contaminar con orina (Arbiza, 1986).

La segunda técnica y la más empleada por obtener semen con características similares al de montas naturales es la obtenida por medio de la vagina artificial. En esta se emplea un tubo aislante de 15 a 20 cm. de largo y 3.5 a 5 cm. de diámetro al cual se le coloca un tubo de látex y uno de polietileno, sujetos por un extremo y por el otro se le agrega agua a 41°C hasta llenar y formar una cámara. En uno de los extremos se coloca un pequeño cono del mismo material, el cual se encuentra unido al tubo colector que debe estar de 37.5 a 38°C .

La utilización de la vagina artificial requiere del entrenamiento del macho con hembras en celo o bien ovariectomizadas y estrogenizadas (Arbiza, 1986).

Después de la recolección del semen, sigue su evaluación para determinar su calidad. Los parámetros que se evalúan se dividen en macroscópicos y microscópicos, los primeros dan tan solo una idea aproximada de la calidad y se refieren al color, volumen, densidad y pH. Los segundos indican el valor real del eyaculado e involucran cuatro medidas principales que son: motilidad, concentración, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y porcentaje de anomalías en los espermatozoides (Arbiza, 1986).

Las enfermedades de mayor importancia que pueden transmitirse a través del semen son: Fiebre aftosa, Lengua azul, Campilobacteriosis, Brucelosis, Leptospirosis y Toxoplasmosis (Hare, 1985).

Entre las enfermedades virales que se transmiten por semen en ovinos y caprinos se encuentran, Peste bovina, Estomatitis vesicular, Pseudorrabia y probablemente Artritis Encefalitis Caprina

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC), es una enfermedad viral crónica y progresiva que afecta aparatos o sistemas de los caprinos domésticos, tanto a cabras productoras de pelo como productoras de leche de todas las edades y posiblemente de todas las razas. (Crawford y Adams, 1981; Álvarez, 1984; Trigo, 1991).

Antecedentes de la enfermedad y distribución geográfica.

La enfermedad de AEC se describió por primera vez en Suiza en 1950 (Trigo et al., 1998). Posteriormente fue descrita por autores germanos a fines de los años 60s. La Artritis Encefalitis Caprina está ampliamente distribuida en el mundo, pero es más prevalente en países industrializados (Australia, EE.UU., Canadá, Francia, Noruega y Suiza) la seroprevalencia en estos países es de 65% a 81%. En países en vías de desarrollo (Perú, Kenya, México, África del Sur) tienen un bajo nivel de cabras positivas. (Smith y Sherman, 1994). Así el virus de la artritis encefalitis caprina fue reconocido a principios de los años 70 (Pawlisch y Maes, 1984; James, 1990; Putney y Montelaro, 1990) y aislado por primera vez en 1980 en E.U. por Crawford et al., a partir de membrana sinovial de una cabra afectada con artritis. En México se tuvieron las primeras evidencias del aislamiento e identificación del virus en 1986 (Gay et al., 1986). Fue hasta 1998 donde Leyva et al., presentaron la primera evidencia clínica, serológica, histopatológica, inmunocitoquímica y ultraestructural del virus, posteriormente se logró el aislamiento en México por Daltabuit et al., en 1999.

Etiología

El virus de AEC pertenece al género lentivirus que se encuentra dentro de la familia de los retrovirus, los cuales infectan a varias especies entre las que se encuentran, primates los cuales son infectados con el virus de inmunodeficiencia de los simios (SIV), carnívoros que son infectados por el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), equinos que son infectados por el virus de anemia infecciosa equina (EIAV) y en bovinos que son infectados por dos virus los cuales provocan las enfermedades de inmunodeficiencia bovina y la enfermedad de Membrana (JDV). En ovejas se presenta la enfermedad conocida como Maedi Visna (MVV) (Levy, 1993; Daltabuit, 1999).

En los humanos también se presentan enfermedades producidas por lentivirus, como es el virus de inmunodeficiencia humana (VIH -1 y 2) que es responsable de la enfermedad degenerativa letal conocida como SIDA. (Levy, 1993)

Características del virus

El virus de AEC mide aproximadamente 120nm de diámetro, está compuesto por una membrana externa lipídica de 2 capas y una nucleocápside. El centro o núcleo del virion “core” está rodeado por la cápside. La superficie del virion está provista de proyecciones o espículas de 9 a 10 nm de longitud, cubiertas por una envoltura glicoproteica (gp90) unida covalentemente a una segunda glicoproteína (gp135) que se localiza en la parte externa del virion. El genoma del VAEC está compuesto de ARN de cadena sencilla con aproximadamente 9,200 pares de bases. Tiene una organización similar al de otros retrovirus y conserva los 3 genes principales propios de la familia: gag, pol y env. El gen gag codifica para las 3 proteínas estructurales del núcleo; matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC); el gen pol para la proteasa viral (PR), la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN); el gen env para las glicoproteínas de superficie (SU) y para la glicoproteína transmembranal(TM). Al igual que el VIH, que es el lentivirus más estudiado, el VAEC presenta genes regulatorios dentro de los que se han podido identificar los genes tat, rev y vif (Aguilar y Tesoro, 2001).

El virus es usualmente cultivado en subcultivos tempranos de membrana sinovial de cabras. El ciclo de crecimiento de los virus va de 15 a 20 horas en estas células. Los viriones maduros son producidos por brotes de membrana celular, a través de largos números de partículas son producidas por brotes de retículos endoplásmicos dentro de vesículas intra citoplasmáticas. La replicación del virus en cultivos celulares es acoplada por fusión celular (formación de células gigantes multinucleadas), el cual es el mayor efecto citopático del virus (Narayan et al., 1980; Klevjer- Anderson and Cheevers, 1981). Este efecto citopático es difícil de observar en lesiones de animales enfermos.

Especies susceptibles

Todos los caprinos de cualquier edad y raza son susceptibles. Presentándose en cabritos la forma leucoencefálica. En cabras adultas hay una poliartritis degenerativa crónica, mastitis intersticial, encéfalomiелitis, neumonía intersticial y endometritis (Ellis et al., 1986;

Ali,1987; Narayan, 1990; Trigo, 1991; Petursson et al., 1992; Leyva, 1994; Trigo et al., 1998).

Existe un estudio donde se describe la transmisión de lentivirus entre borregos y cabras (Shah et al., 2004), además Morin et al., en el 2003 reportaron la infección experimental en bovinos utilizando el virus de AEC.

Transmisión

Las principales formas de transmisión de la enfermedad ocurren a través de calostro o leche contaminada, sin embargo en útero la transmisión parece darse en niveles muy bajos. (Matthews, 1999). La infección horizontal entre cabras no lactantes parece ser limitada y requiere de meses o años de contacto, en la mayoría de los casos por el intercambio de sangre, el empleo de agujas y equipo para tatuajes entre animales infectados y no infectados. Cuando las cabras están en producción láctea a través de las máquinas de ordeño sobre todo si no hay una correcta desinfección de pezoneras y manos del ordeñador, aumenta la posibilidad de transmisión de animales seropositivos a seronegativos, por el constante hacinamiento entre ellos (Perrin y Polack, 1987; Péretz y Cimarosti, 1990; Perrin, 1991; Péretz , 1993; Rowe y East, 1997).

Es posible encontrar el virus de artritis encefalitis caprina en el semen de machos infectados, por lo que existe un riesgo potencial de transmisión de la enfermedad por esta vía o a través de la inseminación artificial (Travassos et al., 1998 y 1999). Se sugiere que la presencia del virus en células infectadas se puede encontrar en secreciones prepuciales y en aspirados seminales a partir del epidídimo de machos infectados. (Rowe y East, 1997).

Además existen comportamientos que se presentan en la época de apareamiento que podrían favorecer la transmisión del virus tales como: lamido de ojos, olfateo y consumo de orina (Petursson et al., 1992; Olvera, 1994; Greenwood et al., 1995; Rowe y East, 1997).

Patogenía

Los cabritos que consumen el calostro o leche contaminada con macrófagos infectados, toman intactas las partículas virales las cuales entran por el intestino hacia el sistema retículo endotelial y estabilizan la infección. (Narayan y Cork, 1990). En este momento adquieren la infección y pueden presentarse los signos de la enfermedad o pueden desarrollarse en meses o años más tarde. La exposición de las cabras a AEC por medio de la ingestión de calostro infectado produce una infección sistémica persistente durante la cual los virus infectantes se mantienen en niveles mínimos en células de la serie monocito-macrófago. Los monocitos derivan de la médula del hueso y circulan en la sangre por un periodo inconstante antes de localizarse en tejidos donde maduran a macrófagos. Los monocitos infectados contienen los genomas virales pero ninguna partícula infecciosa, cuando ellos maduran a macrófagos y se induce la transcripción del RNA entonces sí producen partículas infecciosas (Narayan et al., 1983) y la replicación y excreción extracelular que estimularán la respuesta inmune del huésped (Zink et al., 1987; Zink y Narayan, 1989; Nazara, 1991; Werling et al., 1994).

Subsecuentemente, la infección de mononucleares alcanzan al órgano blanco que puede ser líquido sinovial, pulmón, plexo coroideo, ubre, donde la activación o replicación del virus en conjunción con la maduración de macrófagos induce estas lesiones linfoproliferativas. (Ellis et al., 1988).

El inicio de la enfermedad aparece con la activación del virus en células infectadas. Un gama interferón derivado linfocitario puede jugar un rol crucial en la patogénesis de AEC retardando la maduración de monocitos, madurando lentamente los virus, incitando la característica respuesta inmunoproliferativa de AEC, las lesiones aumentan la expresión de la 1ª clase de antígenos de histocompatibilidad en macrófagos (Zink et al., 1987)

La infección de cabras con virus de AEC induce a una fuerte respuesta humoral y celular, pero ninguna es protectora. En realidad AEC es una enfermedad inmunopatológica en donde las lesiones resultan de una reacción inmune a los antígenos virales especialmente a las glicoproteínas. (Adams et al., 1983; McGuire et al., 1986).

Signos Clínicos y lesiones

La enfermedad se puede presentar afectando a diferentes partes del organismo como: sistema nervioso central (SNC), aparato locomotor, aparato respiratorio y glándula mamaria. En el sistema nervioso se produce, una leucoencefalomielitis, la cual se presenta en cabritos entre 2 y 6 meses de edad, presentan paresia del tren posterior que progresa rápidamente a una parálisis irreversible finalizando con la muerte del animal, también llegan a presentar fiebre y otros problemas nerviosos como depresión, cojera, reflejos pupilares anormales, opistotonos, tortícolis, vueltas en círculos y disfagia (Trigo, 1998). A nivel microscópico podemos encontrar encefalitis desmielinizante no supurativa. Las células inflamatorias que son una mezcla de macrófagos, monocitos, linfocitos y células plasmáticas se acompañan de desmielinización. En casos muy severos se llegan a encontrar destrucción de los axones y acumulación de células inflamatorias en centros germinales (Nazara y Trigo 1985; Trigo, 1991; Heckert, 1992; Petursson, 1992).

En ocasiones los cabritos llegan a sobrevivir y cuando son adultos desarrollan la artritis.

La segunda forma clínica se produce en animales adultos mayores de un año de edad. Se genera una artritis polisinovitis crónica hiperplasia unilateral o bilateral con carácter prolongado y progresivo, afección de los tejidos periarticulares donde las articulaciones carpales están siempre involucradas, provocando alteraciones en las articulaciones del menudillo, hombro, coxofemoral y atlanto-occipital. En las primeras fases de la artritis, es notable un incremento en el volumen de la articulación, con consistencia blanda, dolorosa y caliente al tacto, al transcurrir la enfermedad el tejido periarticular, tendones, cápsula sinovial y superficie articular se endurece debido al depósito de minerales (Hekert, 1992; Petturson et al., 1990; Trigo, 1991; Leyva, 1994; Rowe y East, 1997). La lesión principal es la sinovitis proliferativa de las articulaciones con hiperplasia de células mononucleares. Progresivamente se observan cambios degenerativos, como fibrosis, necrosis y

mineralización de las membranas sinoviales y de las estructuras colagenosas peri articulares llegando incluso a presentar fusión ósea en las infecciones crónicas. El fluido sinovial es de color café o rojo y con volumen variable, tornándose un poco más viscoso. En algunos casos por el dolor y desviación de la articulación, los animales pierden peso. (Arbiza, 1986; Narayan y Cork 1990).

En el caso de la mastitis, a menudo es llamada “ubre dura” debido a la apariencia firme de la ubre durante la infección. La ubre está fría y no hay presencia de eritema. Es muy difícil sacar la leche de la ubre y hay aumento la cuenta celular. (Mc Guire, 1987; Saunders, 1998) Al examen histopatológico de la glándula mamaria las lesiones encontradas son: infiltración de células mononucleares e histiocitos en el estroma periductual, en casos muy avanzados, la afluencia de éstas células es mucho mayor y se acumulan en formas de nódulos hasta formar centros germinativos alrededor de los ductos de la glándula (Trigo, 1991; Amerighno, 1993; Leyva, 1994)

En caso de una infección respiratoria, la infección más frecuente es una neumonía intersticial. En general las regiones infectadas se presentan inflamadas, firmes a la palpación y no se colapsan, pero tienen focos de color blanco o gris. (Pétursson et al., 1992). En las infecciones respiratorias, microscópicamente observamos que los septos alveolares están irregularmente engrosados por la presencia de un infiltrado de células mononucleares, linfocitos y macrófagos. En los casos crónicos se observa un aumento de tejido conectivo a nivel de los septos alveolares y los conglomerados de células mononucleares formando grandes centros germinativos (Ellis, 1986; Robinson, 1986; Piojan y Tórtora, 1986; Ali, 1987).

Diagnóstico

El diagnóstico de AEC es complejo debido al largo período de incubación que caracteriza a la enfermedad y por otro lado no todos los animales clínicamente enfermos presentan anticuerpos, mientras que otras cabras que poseen anticuerpos están aparentemente sanas (Grewal et al., 1986).

Tabla 1.- Pruebas utilizadas en el diagnóstico de AEC

PRUEBA	DETERMINACIÓN
Inmunodifusión en agar gel (IDAG)	Detección de anticuerpos vs la gp 135 y p 28. Tiene una excelente especificidad pero insuficiente sensibilidad
Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)	Se basa en detectar la reacción Antígeno , Anticuerpo
Microscopia electrónica	Morfología e identificación viral
Western blot (WB)	Todas las proteínas del virus
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Detección del ácido nucleico del virus y producción de antígenos recombinantes para usarlos en otras pruebas
Inmunoperoxidasa	Detección de antígenos gp135 y p28 utilizando anticuerpos peroxidados vs la gp caprina
Cultivo celular	Detección del virus por efecto citopático,

	Immunofluorescencia, Electrónica.	Microscopia
--	--------------------------------------	-------------

Fuente: Ramírez, 1998

Diagnóstico diferencial

En animales jóvenes: traumatismos a nivel de columna vertebral, abscesos en vértebras, enfermedades como Listeriosis, Toxoplasmosis, Enterotoxemia, Onfaloflebitis, Deficiencia de cobre y en animales adultos enfermedades infecciosas ocasionadas por: *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Brucella*, *Erysipelotrix*, *Chlamidias*, *Mycoplasmas* (Piojan y Tórtora, 1986).

Inmunidad

En la infección primaria de monocitos inmaduros y maduros la replicación viral es mínima; cuando se da la diferenciación de monocitos infectados a macrófagos hay un incremento en la expresión viral y por lo consiguiente en las respuestas inflamatorias. El aumento en la replicación viral produce una cantidad considerable de interferón- γ (IFN γ) por los linfocitos T y células asesinas naturales; lo que induce a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo I y II, de antígenos de la superficie viral, en macrófagos tisulares infectados y finalmente, a la producción de citosina y otros mediadores inflamatorios por el sistema inmune. La infección por el virus a los monocitos/macrófagos ocasiona variaciones en la producción y actividad de las citosinas, que son moléculas inmunoreguladoras con actividad como la estimulación y proliferación de fibroblastos y células epidermales, maduración de células T y activación de células B. La interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF) son citosinas producidas en macrófagos. Por lo que ésta variación en las citosinas causa una desregulación en la respuesta inmune. (Zink et al., 1987; Jackson et al., 1991; Pétursson et al., 1992; Werling et al., 1994; Lechner et al., 1997).

El interferón secretado por el incremento en la replicación viral, inhibe la proliferación y maduración de monocitos, además cursa una dramática reducción en la fusión del virus con las células del hospedador, en la que está involucrada la gp 50 y debido a ello reduce la eficiencia de diseminación del virus. Sin embargo, el interferón en macrófagos incrementa la expresión antigénica, además induce a la secreción de prostaglandina E_2 (PgE_2) por los macrófagos, la cual tiene funciones inmunosupresoras, incluyendo la inducción de células del fenotipo supresor-citotóxico y la supresión de la proliferación de células T (Zink et al., 1987; Zink y Narayan, 1989; Fenner et al., 1993). La secreción local de PgE_2 por macrófagos en órganos blancos puede explicar porque se encuentra en el exudado de estos órganos un gran número de células $TC8^+$ (linfocitos T citotóxicos) y un reducido número de células $TC4^+$ (linfocitos T cooperadores). Curiosamente la PgE_2 también inhibe la proliferación de fagocitos mononucleares, por lo que se sugiere la posibilidad de un lazo de retroalimentación, incrementando el efecto inhibitorio del interferón en estas células (Zink y Narayan, 1989; Narayan et al., 1992).

En un animal vivo la producción local de interferón puede inhibir la transmisión del virus de célula a célula, esto puede explicar porque raramente se encuentran células multinucleadas en los tejidos blanco inflamados de rumiantes infectados con lentivirus (Zink y Narayan, 1989).

La glicoproteína gp 135 y la proteína p28, revisten un gran interés por su importancia en la respuesta inmune humoral del huésped y por la inducción de la artritis en cabras infectadas con el virus, como resultado de un proceso inmunopatológico por la expresión de este. Aunque estudios recientes han confirmado que la proteína de transmembrana también juega un papel importante en la respuesta inmune y desarrollo de la artritis (Ellis et al., 1986; Lichtensteiger et al., 1991; Perrin, 1991; Bertoni et al., 1994; González, 1994; Rosati et al., 1995).

Las cabras que son infectadas experimentalmente con virus de AEC producen una respuesta humoral, detectada en los primeros 40 a 60 días con la prueba de ELISA, aunque se presentan algunas respuestas tempranas a los 21 días, alcanzando un título máximo entre 49 y 77 días, con una disminución progresiva pero quedando presente por lo menos 9 meses. Se sabe que estos virus usualmente no inducen la producción de anticuerpos neutralizantes,

pero si una fuerte producción de anticuerpos precipitantes (Adams et al., 1980; Cheevers et al., 1988; Vitu et al., 1993). Cuando la inmunidad pasiva desaparece en los cabritos, los anticuerpos contra las proteínas codificadas *gag*, son los primeros que se detectan en animales infectados, seguidos por anticuerpos contra proteínas codificadas *env*; por lo que los anticuerpos contra la proteína de transmembrana son detectados después de los anticuerpos contra la p25 (Rosati et al., 1995).

Se ha comprobado que la seroconversión de animales serológicamente negativos a animales serológicamente positivos, puede ser demorada por muchos meses después de la infección natural con el virus de AEC y considerando que en muchos hatos caprinos se tiene entre 65 y 81% de animales seropositivos a el virus de AEC; se puede pensar que todos los animales de un hato en un determinado tiempo van a presentar la infección (Rimstad et al., 1993)

Control y erradicación

Sin duda un programa para la erradicación de AEC sería el sacrificio de los animales seropositivos y certificando rebaños negativos (OIE, 2003) así como implementando medidas preventivas de manejo que garanticen el menor riesgo posible de transmisión de la enfermedad como: Separar a los cabritos de sus madres después del parto para evitar el contacto con las secreciones maternas y evitar el consumo de calostro, ofrecer a los cabritos sustitutos lácteos o calostro y leche de origen bovino, disponer de cabras seronegativas comprobadas para utilizarlas como nodrizas para que aporten calostro y leche al recién nacido, en animales adultos tener separados a los seronegativos de los seropositivos por espacio mínimo de 3 metros, desinfección del equipo de ordeño e iniciar la ordeña en los animales negativos y concluir con los positivos, monitorear cada seis meses para los animales jóvenes y cada año a los animales adultos. (Ellis, 1983; East, 1987; East y Rowe, 1987; Gaskin, 1990; Robinson y cols, 1986; Pétursson, 1992).

Tratamiento

No existen tratamientos que protejan contra el virus de artritis encefalitis caprina. Se pueden usar fármacos desinflamatorios como meglumina de flumixin (Finadyne, Schering-Plough) para disminuir el dolor. (Matthews, 1999).

JUSTIFICACION

La producción eficiente de carne, leche y otros productos animales depende primero y sobre todo de la reproducción exitosa.

Actualmente la tecnología en reproducción animal, ejerce la mayor presión de selección en los gametos del macho. El macho es muchísimo más capaz de ofrecer una cosecha de células germinales que la hembra y los espermatozoides de un semental se utilizan para fertilizar tantas hembras como sea posible (1 macho para 15 hembras)

La evaluación de la calidad seminal es una consideración importante cuando se valoran niveles de fertilidad y cuando se diagnostican desórdenes reproductivos del macho.

Así que la infección por enfermedades que afectan el tracto reproductor, como es el caso del virus de la Artritis Encefalitis Caprina pueden resultar en una gran pérdida para los productores caprinos, por tal motivo es importante poder identificar este tipo de infecciones para poner en practica medidas sanitarias que prevengan o controlen la enfermedad en hembras y machos (Travassos et al., 1998 y 1999).

El semen puede infectarse a partir de microorganismos procedentes de los testículos, glándulas anexas, tracto urinario o de la cavidad prepucial (Hare, 1985).Algunos autores hipotetizan que la presencia de células inflamatorias por lesión o infección en algún nivel del tracto genitourinario pueden conducir a la presencia de células de defensa infectadas en el semen o en el prepucio, aumentando el riesgo de transmisión venérea de AEC, debido a que el virus se replica en células monocito – macrófago eludiendo a la respuesta inmune. Los macrófagos infectados de la superficie de las mucosas pueden transferir el virus o posiblemente el espermatozoide pudiera servir de transporte del virus a un animal susceptible, como en el caso de lengua azul en cerdos (Dinter y Morein 1990; Guiguen et al., 1990; Lichstensterger et al., 1991; Gazit, 1992; Gopal et al., 1993; Rimstad et al., 1993).

Aunque los reportes que demuestran la transmisión del virus de AEC a través del semen no aclaran que parte del semen está relacionado con la transmisión del virus, por lo que el presente trabajo pretende generar información de la importancia de la diseminación del virus por esta vía y en particular de la participación de las células espermáticas.

HIPOTESIS

Es posible encontrar con la técnica de inmunocitoquímica antígenos virales de AEC y con la ayuda de microscopía electrónica partículas virales en espermatozoides de machos caprinos infectados con artritis encefalitis caprina (AEC).

OBJETIVO GENERAL

1.- Detectar la presencia de partículas virales en espermatozoides de machos caprinos positivos al virus de artritis encefalitis caprina, por la técnica de inmunocitoquímica y microscopía electrónica

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Detectar la presencia de partículas virales en espermatozoides de machos caprinos positivos al virus de artritis encefalitis caprina por medio de la técnica de inmunocitoquímica.

2.- Detectar la presencia de partículas virales en espermatozoides de machos caprinos positivos al virus de artritis encefalitis caprina por medio de la técnica de microscopía electrónica.

MATERIAL Y METODOS

*** Localización**

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio L-504 de Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo Cuatro, ubicado en la Carretera Cuautitlán Teoloyucan Km. 2.5 Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

*** Animales**

Se emplearon machos caprinos, de la raza Toggenburg y criolla. Estos animales contaban con un año de edad en promedio. Se formaron dos grupos: un grupo fue utilizado como control negativo ($n = 3$) que consistió en animales criollos y un segundo grupo de cabras naturalmente infectadas con el virus de AEC ($n = 3$) de raza Toggenburg.

Se mantuvieron en corrales convencionales de malla de alambre, con techo de lámina y piso de concreto el cual se aseaba diariamente, alimentándose en comederos y bebederos de lámina. Los animales negativos se encontraban separados de los positivos por 30m.

Su alimentación se basó en pacas de alfalfa achicalada, alimento balanceado para ganado lechero bovino, avena y agua *ad libitum*.

Se identificaron individualmente por medio de números y letras. Los grupos fueron manejados de manera independiente y apegándose a estrictas normas de bioseguridad como desinfección de botas antes de entrar a los corrales, hacer la limpieza y alimentando primero a los animales negativos y después a los positivos, cada grupo tenía sus instrumentos de limpieza y la distancia mencionada anteriormente.

*** Serología**

El estado serológico de los machos fue determinado por las pruebas de inmunodifusión (Veterinary Diagnostic Technology, USA) y Western Blot (WB) (Ramírez, 2002) las cuales detectan anticuerpos contra el virus de AEC.

*** Colección de muestras**

A cada grupo se le tomaron muestras de semen una vez al mes por un período de 10 meses. Se realizó el rasurado y antisepsia del prepucio, se sacó el pene de la vaina prepucial sujetándolo con una gasa húmeda, se introdujo el electrodo del electroeyaculador con una corriente de 9-15 amperes en el recto del animal, adicionándole vaselina para facilitar su introducción. Se colocó el pene dentro de una bolsa plástica estéril con el tubo de ensaye graduado para colectar el semen. Inmediatamente se dieron de 3 a 4 descargas con el electroeyaculador, por un intervalo de 5 segundos.

Las muestras obtenidas se llevaron a baño maría a una temperatura de 37°C para hacer un registro de algunas características del semen (volumen, color, pH y motilidad) y la presencia de células inflamatorias en líquido seminal. En otro portaobjetos se realizó un frotis con el semen fijándose con alcohol metílico y observándose al microscopio óptico con el objetivo 40X para realizar el conteo de células mononucleares.

*** TÉCNICA DE INMUNOCITOQUIMICA**

En cada frotis se realizó la prueba de inmunocitoquímica para observar partículas virales de AEC de la siguiente manera: primeramente se realizó la eliminación de la peroxidasa endógena colocando a los frotis una solución de metanol al 2.5% en PBS (solución amortiguadora de fosfatos) con un pH de 7.4 y posteriormente se adicionó H₂O₂ (peróxido de hidrógeno al 30%). Se colocaron las laminillas en una cámara húmeda con la solución antes preparada, procurando cubrir totalmente la muestra del frotis.

Se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo de incubación, se enjuagaron con PBS. Ya eliminada la peroxidasa endógena se bloqueó con albúmina sérica bovina al 3% durante una hora incubándose a temperatura ambiente, enseguida se lavó con PBS dos veces. El bloqueo se realizó para que los anticuerpos específicos al virus no se unan a otras estructuras y se evite las reacciones falsas positivas.

En seguida se incubaron los frotis con acetona durante media hora, en cámara húmeda y refrigeración con el fin de abrir los poros de la membrana del espermatozoide y permitir la entrada de los anticuerpos obtenidos de un suero control, inmediatamente se lavó con PBS. Acto seguido a cada portaobjetos se agregó 200ul del suero diluido (diluido 1/50 en PBS) incubándose las laminillas una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Dicho suero fue obtenido de una cabra positiva a AEC, evaluada por PCR, IDAG y WB. Posteriormente se lavaron las laminillas con PBS dos veces

Finalmente se incubó con el segundo anticuerpo constituido por un Anti-anticuerpo de cabra peroxidado (Anti-Goat IgG, Fc Fragment). Adicionando a cada portaobjetos 200ul del conjugado diluido en solución buffer (1:1000) e incubándose en cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las laminillas con PBS y fue adicionado como sustrato tetracloruro de diaminobenzidina (DAB) preparándose de la siguiente manera: se disolvieron 5 mg de DAB en 10 ml de solución reguladora Tris HCl 0.1M, pH 7.6. Filtrándose con papel Whatman No.1 posteriormente se añadió 0.1 ml de H₂O₂ (al 3%), esta solución se vertió sobre los portaobjetos y se incubaron durante 7 a 10 minutos, para luego enjuagarlos con agua

destilada; inmediatamente se detectó la formación de un complejo Ag-Ac mediante una coloración café marrón.

Enseguida se realizó la contra tinción con hematoxilina para contrastar la muestra y se lavaron los portaobjetos con agua destilada durante cinco minutos. Se colocaron en una caja de tinción de vidrio conteniendo Hematoxilina de Harris, durante treinta minutos y se lavaron con agua corriente.

Después de lavar se rehidrataron utilizando alcoholes graduales (80%, 90%, 96%, 100%) y xilol. Los frotis se observaron al microscopio óptico con un medio de montaje a base de una solución de fosfato de glicerol y Azida de sodio al 1% como inhibidor de contaminantes.

TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Con el fin de determinar la ubicación de la posible presencia de partículas virales se realizó la infección de espermatozoides *in vitro* de semen proveniente de machos caprinos criollos negativos. El semen fue colectado de la misma forma en la que se obtuvo el semen de los animales descritos anteriormente. Después por centrifugación se separó el líquido espermático de las células espermáticas y éstas fueron depositadas en cajas tipo falcon con medio de cultivo Dulbecco adicionado con 5% de suero fetal bovino, antibióticos y antimicóticos.

Se obtuvieron tres cajas de cultivo con espermatozoides de las cuales: A) caja incubada durante tres horas sin virus, B) caja incubada con virus durante una hora y media y C) caja incubada con virus durante tres horas.

El virus utilizado fue el de la cepa VR 905, 75.G63, aislado por Crawford (1980) obtenido de la ATCC (American Type Culture Collection). La cantidad de inóculo viral fue de 0.1 ml obtenido directamente de la cepa de referencia y se administró sobre los cultivos de espermatozoides, se recolectó y se inició el procedimiento para microscopía electrónica.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del virus con los espermatozoides, éstos se fijaron con glutaraldehído, se lavaron 3 veces con PBS y se realizó la post-fijación con

tetroxido de osmio al 1% (se colocó en una proporción 1:1 con respecto a la muestra) por una hora y media en agitación, posteriormente se lavó con buffer 5 veces por 7 minutos.

Para la deshidratación de las muestras se utilizó la técnica modificada por Rosales Montaña Luz (LRM) que consiste en deshidratar con alcoholes de concentración ascendente, comenzando con alcohol al 50%, 60%, 70% y 80% todos ellos por tres minutos, continuando con alcohol al 90% 5 minutos, alcohol al 96% 15 minutos (con uranilo) y finalmente con alcohol al 100% 15 minutos.

Para la infiltración de las muestras se ocupó oxido de propileno por 10 minutos, oxido de propileno mas resina en proporción 2:1 por 1 hora y oxido de propileno mas resina en proporción 1:1 toda la noche. Al siguiente día se pre-incluyeron con resina epóxica y finalmente se incluyeron en cápsulas de gelatina con resina epóxica dejando polimerizar a 60° C durante 24 horas.

Los cortes semifinos y finos se cortaron en un ultramicrotomo marca ultra-cut Reichert, los cortes finos se contrastaron con metales pesados de uranilo y plomo y fueron observados en el microscopio electrónico de transmisión (Frances y cols., 1987).

RESULTADOS

Las características evaluadas en el semen de los dos grupos de machos caprinos tanto naturalmente infectados y no infectados se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2.- Resumen de los resultados obtenidos en los parámetros evaluados del semen de caprinos naturalmente infectados y no infectados, donde no se encontraron diferencias entre ambos grupos (por lo que se muestra un solo resultado).

PARAMETROS EVALUADOS

DIAMETRO TESTICULAR	24-31.5cm
VOLUMEN	0.5-1.5 ml
COLOR	BLANCO - CREMOSO
MOTILIDAD	80 - 90
PH	6.8 - 7.0
ALTERACIONES	NINGUNA

Inmunocitoquímica

Con la técnica de inmunocitoquímica se pudo evidenciar reacciones antígeno-anticuerpo en los espermatozoides del grupo de animales naturalmente infectados con AEC, no así en el grupo de animales no infectados (Figura 1 y 4). El marcaje se encontró principalmente en la cabeza del espermatozoide como se puede observar en las Figuras 2 y 3.

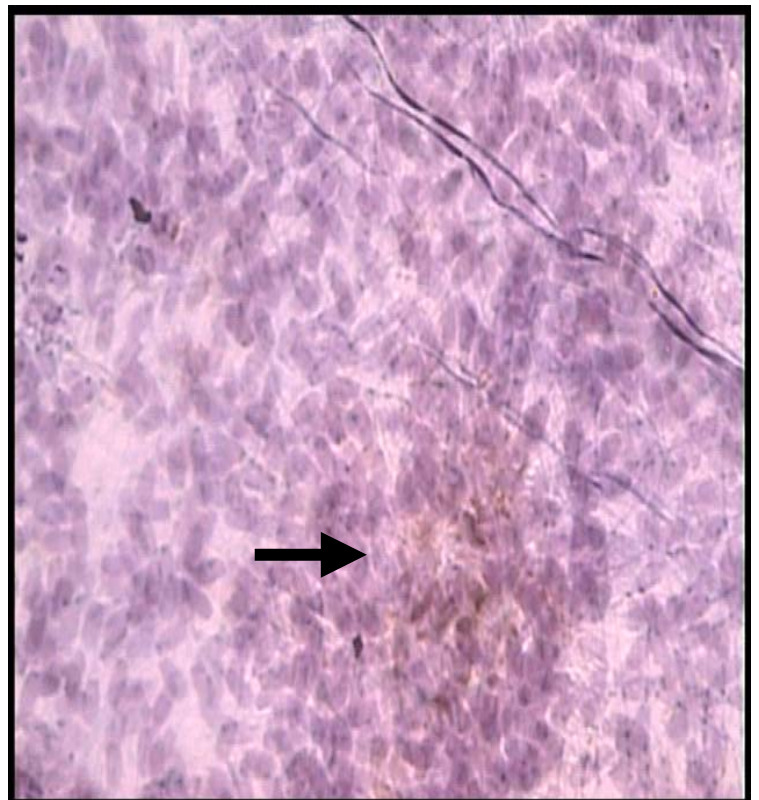
Microscopia electrónica.

En los espermatozoides se encontraron estructuras sugestivas de la presencia del virus de AEC en la porción de la cabeza del espermatozoide (Figura 6). Un hallazgo interesante que se encontró en ambos grupos de espermatozoides infectados y no infectados fue el desprendimiento de la membrana celular en la porción del acrosoma como se observa en la Figura 5 .



Figura 1.- Frotis de espermatozoides de macho caprino negativo a AEC por inmunocitoquímica

Figura 2.- Frotis de espermatozoides de macho caprino positivo a AEC por inmunocitoquímica



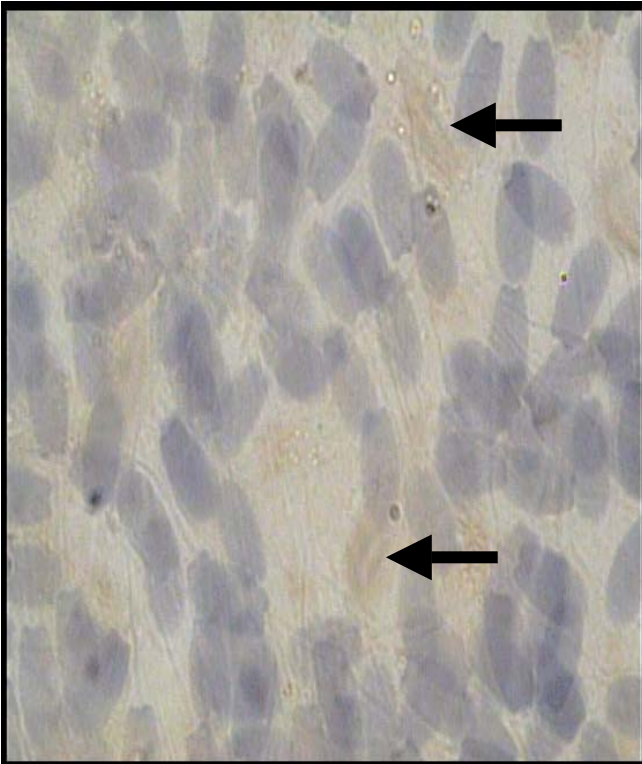


Figura 3.- Frotis de espermatozoides de caprino positivo a el virus de AEC por inmunocitoquímica

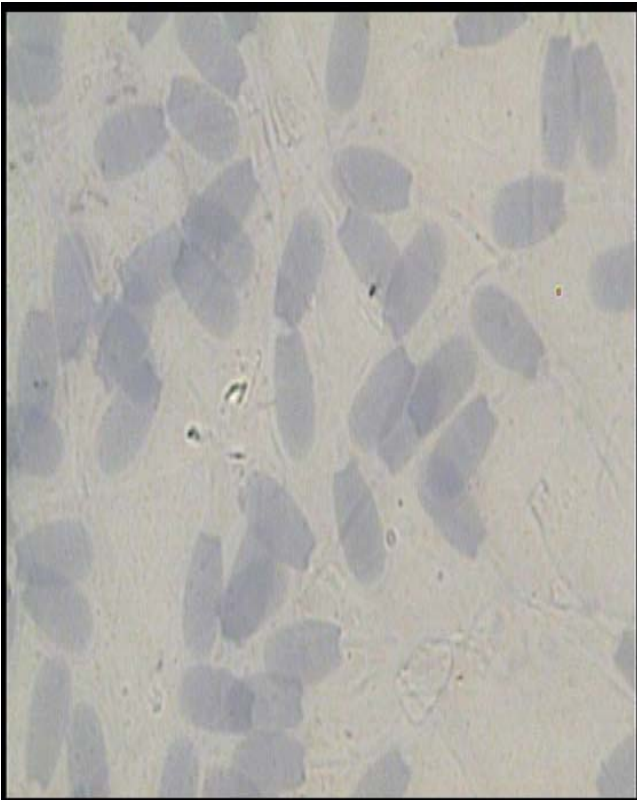


Figura 4.- Frotis de espermatozoides de caprino negativo a el virus de AEC por inmunocitoquímica



Figura 5.- Ultra micrografía de transmisión donde se observan cortes transversales (T) y longitudinales (L) de espermatozoides de caprino infectado con AEC donde es posible apreciar el desprendimiento de la membrana (M) del acrosoma (A)

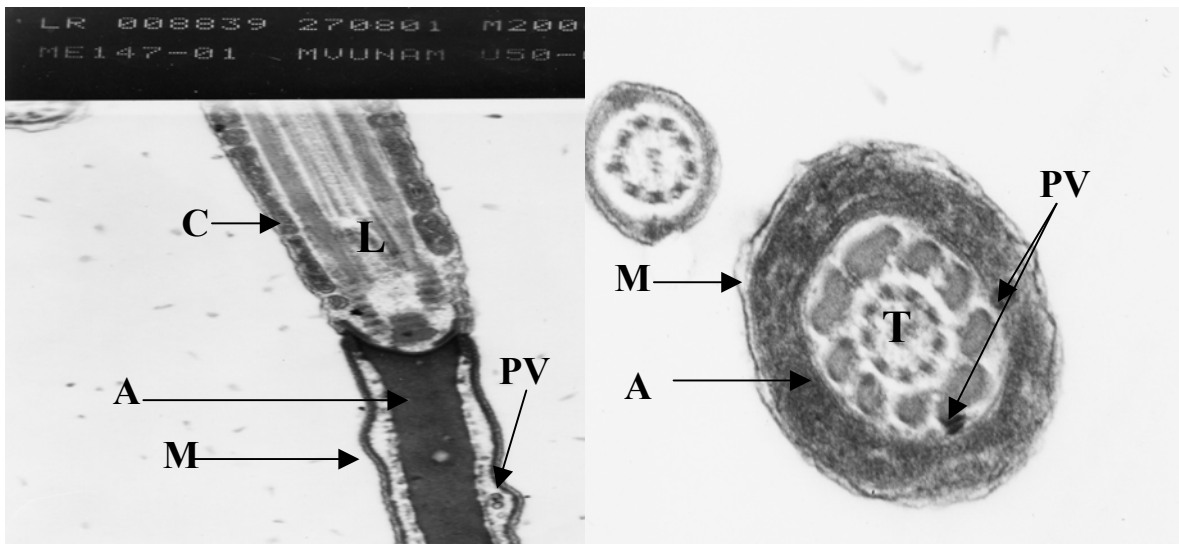


Figura 6.- Ultra micrografía de transmisión donde se observan cortes transversales (T) y longitudinales (L) de espermatozoides de caprinos infectados con AEC donde es posible apreciar el desprendimiento de la membrana (M) del acrosoma (A) y posibles estructuras sugestivas de partículas virales (PV). Cola del espermatozoide (C).

El conteo de células inflamatorias encontradas en líquido seminal de los machos caprinos se observa en la tabla 3.

Tabla 3.- Conteo total de células mononucleares en líquido seminal de machos infectados naturalmente con virus de AEC y machos no infectados.

	LINFOCITOS	MONOCITOS	MACROFAGOS	TOTAL
Machos No Infectados.	11	14	13	38
Machos Naturalmente Infectados.	21	13	16	40

DISCUSIÓN

Existen pocos estudios sobre la transmisión vía sexual del virus de AEC, y solo tres trabajos que reportan la presencia del virus en semen de cabras infectadas (Travassos et al., 1998 y 1999; Martínez et al., 2005). A pesar de la falta de estudios en el área, se ha demostrado que el virus de AEC se puede eliminar por semen (Travassos et al., 1998). Este hecho se ha reportado en otros retrovirus, como lo describe Miller et al., 1994. Los cuales usaron 13 simios (*Macacus Rhesus*) infectados con virus de inmunodeficiencia del simio (VIS) y se identificó la presencia del virus con las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, encontrando células infectadas con VIS en todos los niveles del tracto reproductor de los monos, además de encontrar el virus infectando células en el epitelio de la mucosa del prepucio; concluyendo que la patología en el tracto reproductor de monos y pacientes con VIH es similar.

Miller et al. 1994 no consideraron evaluar el efecto del virus sobre los espermatozoides, pero sí apreciar el posible papel que desempeñan como portadores del virus. El presente trabajo también tuvo como objetivo obtener información sobre la función que desempeñan los espermatozoides de caprinos en la transmisión de la AEC. Dentro de los resultados obtenidos se observó marcaje de espermatozoides, con la técnica de inmunocitoquímica específicamente en la cabeza del espermatozoide en machos infectados naturalmente (Figura 2 y 3). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kiessling et al., 1989 quienes encuentran la presencia de partículas virales de retrovirus murino en la cabeza del espermatozoide, además encontraron la presencia de anticuerpos que reconocieron proteínas virales por la técnica de Western blot, lo cual concuerda con lo que se realizó en el presente estudio. Los resultados reportados por Kiessling et al., 1989 sugieren que los espermatozoides pueden ser un vehículo importante en la diseminación de retrovirus murino, tal como podría estar sucediendo para los retrovirus de rumiantes.

Miller et al., 1994 mencionan que usando un anticuerpo monoclonal contra la proteína p27 del Virus de la Inmunodeficiencia del Simio se pudo detectar antígenos en secreciones congeladas de tejidos, utilizó la técnica de avidina-biotina-peroxidasa, con diaminobenzida

como cromógeno y contrateñida con Hematoxilina de Meyers. Técnica muy parecida a la realizada en este estudio, siendo la única diferencia, que en este trabajo se utilizó un anticuerpo policlonal.

Con el fin de confirmar la posible presencia del virus en espermatozoides en el presente trabajo fue necesario complementar el estudio utilizando la técnica de microscopía electrónica, la cual nos permitió identificar con la observación directa, la presencia de partículas virales en los espermatozoides como lo reportó Kiessling y cols., 1989.

Se sabe que los virus que se eliminan por semen, aun en el caso de enfermedades donde la vía de transmisión es muy importante (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) la cantidad de partículas que se puede detectar es mínima como lo reportan Van Voorhis et al., 1991; es por ello que en el presente estudio los resultados positivos obtenidos en las muestras de semen son muy significativos. Es importante mencionar que la realización de este estudio *in vitro* con el uso de espermatozoides infectados con la cepa de referencia de ATTC de AEC, puede proponer un modelo de infección *in vitro* para retrovirus, apoyándose con la técnica de inmunocitoquímica y microscopía electrónica.

Es importante resaltar que el desprendimiento de la membrana del acrosoma en el espermatozoide como se observa en la Figura 5, es algo relacionado con el procesamiento de la muestra y no por la infección del virus en los espermatozoides; ya que esto se observó en espermatozoides infectados y no infectados. Con la microscopía electrónica se pudieron observar estructuras sugestivas a partículas virales complementado el hallazgo con la reacción de inmunocitoquímica en los espermatozoides.

Por otro lado existen diversos reportes en animales donde se menciona la transmisión de retrovirus enfocados específicamente a hembras, seguido de estudios en mujeres y muy pocos en el caso de hombres en el aparato reproductor; por lo que el presente trabajo da pauta a la realización de más investigaciones en esta área.

Cabe mencionar que no existen datos sobre la función y presencia de células mononucleares en el aparato reproductor de rumiantes, y muy pocos en otras especies como

el estudio reportado por Miller y cols., 1994 donde se menciona la presencia de células mononucleares en casos de próstatitis y epididimitis de individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia del simio y que en un momento dado éstas células pueden encontrarse en semen.

Foote, 1989 menciona diversas características para evaluar la calidad del semen y en particular sobre los espermatozoides; sin embargo en el presente estudio solo se evaluó la motilidad, color, pH y viabilidad, de las cuales no se encontraron diferencias entre los grupos negativos y positivos a el virus de AEC. Tampoco se encontraron diferencias con respecto a la presencia de linfocitos, monocitos y macrófagos entre ambos grupos.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados observados en la técnica de inmunocitoquímica y con el apoyo de la microscopia electrónica se puede sugerir que los espermatozoides infectados pueden estar interaccionando con el virus de AEC, confirmando que los machos tienen importancia como diseminadores de la enfermedad.

Para confirmar que el espermatozoide tiene importancia en la transmisión se sugiere realizar otros estudios más sensibles y específicos tales como hibridación *in situ* en espermatozoides de machos infectados .

BIBLIOGRAFIA

1. Adams D.S, Crawford TB, Klevjer-Anderson P. A pathogenic study of early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. *Am J Pathol* 1980; 99(2): 257-278.
2. Adams DS, Klevjer-Anderson P, Carlson JL, Mc Guire TC, Gorham JR. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 1983; 44: 837 –840.
3. Aguilar Setien, Tesoro Cruz E. Memorias. Cátedras de enfermedades infecciosas de las cabras inmunología y diagnóstico. 2001.
4. Ali O A. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat. *Vec Rec* 1987; 121:131-132.
5. Álvarez VJ. Seroprevalencia de la Artritis encefalitis Caprina en algunos estados de la república. Tesis de licenciatura. FESC UNAM. Cuautitlán, México. 1984.
6. Amerighno E, Rivera H, Rosadio R, De MartiJ. La artritis encefalitis caprina viral (AECV) en el Perú, estudio clínico, serológico, histopatológico y aislamiento. *Rev Latamer Peq Rumin* 1993; 1 (1) : 63-75.
7. Arbiza Aguirre S I, Producción de caprinos. FESC, 1986.
8. Arbiza Aguirre S I, De Lucas Tron J. Producción de carne caprina UAEM, 1996. pp.9-19
9. Bertoni G , Zahno LM, Zaroni R, Vogt HR, Peterhans E, Ruff G, Chevers WP, Sonigo P, Pancino G, Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the

caprine arthritis-encephalitis virus GP 38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J Virol* 1994; 68(11): 7139-7147.

10. Cheevers WP, Travis CM. The lentiviruses: Maedi visna, caprine arthritis encephalitis and equine infectious anemia. *Adv Vir Res* 1988; 34: 189-215.
11. Crawford TB, Adams PS. Caprine arthritis encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *JAVMA* 1981; 178 (7): 713-719.
12. Daltabuit Test. M., De la Concha-Bermejillo A., Espinosa L. E. L., Loza Rubio E. Aguilar Setien A. Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in México. *Can J Vet Res* 1999; 63: 212-215.
13. Dinter Z, Morein B. Virus infections of ruminants. Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V. 1990.
14. East, N.E., Rowe, J. D., Madewel, B. R., Floyd, K., Serologic prevalence of caprine arthritis- encephalitis virus in California goats dairies. *J Am Vet Assoc* 1987; 190, 182-186.
15. Ellis TM, Carman H, Robinson W F, Wilcox G E. The effect of colostrum derived antibody on neo-natal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Aust Vet J* 1986; 63 (8) : 242-245.
16. Ellis TM, Robinson WF, Wilcox GE. Effect of colostrum deprivation of goats kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust Vet J* 1983;60: 326-329.
17. Ellis TM, Robinson WF, Wilcox GE. The pathology and etiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Aust Vet J* 1988; 65(3):69-73.

18. Fenner FJ, Mc Auslan BR, Mims CA, Sambrook J, White DO. *Veterinary Virology* . 2ed. USA: Academic Press Inc,1993.
19. Foote RH, Value of testicular and sperm profiles in optimizing reproductive success: lessons learned from selective breeding programs of domestic and laboratory animals. Sperm measures and reproductive success. Institute for Health Policy Analysis. Forum on Science health and environmental risk assessment. In: Burger Jr. EJ, Tardiff RG, Scialli AR, Zenick H, editors. *Progress in Clinical and Biological Research* 32.New York, Ithaca. Alan R. Liss, Inc. 1989:107-126.
20. Frances W, Doane and Nan Anderson. *Electron microscopy in diagnostic virology*. A Practical Guide and Atlas. Cambridge University Press, 1987 . First published.
21. French M.H.Observaciones sobre las cabras. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). 1970; 28-41
22. Gaskin JM, Testing for caprine arthritis-encephalitis (CAE). *Dairy Goat J* 1990; 68(4): 231-237.
23. Gay, G. y cols.. Informe preliminar del aislamiento del virus productor de la Artritis Encefalitis Caprina en México, Reunión de investigación Pecuaria México. S.A.R.H. 1986; 215.
24. Gazit A, Sarid R, Mashiah P, Archambault D, Dahlberg JE, Tronick SR, Yaniv A. Defective viral particles in caprine arthritis encephalitis virus infection. *Virology* 1992; 189: 344-349.
25. González MG. Estudio de la enfermedad viral: Artritis Encefalitis Caprina por medio de la prueba de inmunodifusión, frotis de líquido sinovial y biopsia de

muestras obtenidas a partir de cabras de rastro y de algunos casos clínicos (tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México UNAM, 1994.

26. Gopal RP, Walther SJ, Walid H. Detection of caprine arthritis –encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (11): 3042-3043.
27. Greenwood PL North RN, Kirkland PD. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales, Australia. *Aust Vet J* 1995; 72:341-344.
28. Grewal AS, Greenwood PE, Burton RW, Smith JE, Batty EM, North R. Caprine retrovirus infection in New South Wales : Virus isolations, clinical and histopathological findings and prevalence of antibody. *Aust Vet J* 1986 ; 63 (8) : 245-248.
29. Guiguen F, Lerondelle C, Favier C. Réponses du chevreau á des monocytes infectés in vitro par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre. *Ann Rech Vét* 1990; 21:179-185.
30. Hare. W.C.D Enfermedades transmisibles por el semen y las técnicas de transferencia de embriones. OIE. Serie Técnica No.4. 1985.
31. Heckert RA, Mc Naab WB, Richardson SM, Briscoe MR. Evaluation on an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can J Vet Res* 1992; 56: 237-241.
32. Jackson MK, Knowles DP, Stem TA, Harwood WG, Robinson MM, Cheevers WP. Genetic structure of the pol-env region of the caprine arthritis encephalitis lentivirus genome. *Virology* 1991; 180: 389-394.

33. James FE. Comparative features of retroviral infections of livestock. *Comp. Immun. Microbiol Infect Dis* 1990; 13 (3); 127-136.
34. Kiessling AA, Crowell RC, Connell RS Sperm associated retrovirus in the mouse epididymis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 84 : 8667-8671
35. Klevjer-Anderson P. and Cheevers W.P. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* 1981; 110: 113-119.
36. Lechner F, Machado J, Bertoni G, Seow HF, Dobbela DA, Peterhans E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J Virol* 1997; 71 (10): 7488-7497.
37. Levy J. A. The transmission of HIV and factors influencing progression of AIDS. *Am J Med* 1993; 95: 86-100.
38. Leyva GVH. Estudio radiológico hematológico, patológico y al microscopio electrónico, de cabras seropositivas al virus de la Artritis Encefalitis Caprina. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México. UNAM, 1994
39. Lichtensteiger CA, Knowles DP, Mc Guire TC, Cheevers PW. Recombinant GP 135 envelope glycoproteins of caprine arthritis-encephalitis lentivirus variants inhibit homologous and heterologous variant-specific neutralizing antibodies. *Virology* 1991; 185:2-9.
40. Matthews J. G. Diseases of the goat 2da. Edition. Blackwell Science 1999:80-86.
41. Martínez R H A., Ramírez A H., Tortora P J., Aguilar S A., Garrido F G I., Montaraz C J A. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en aparato reproductor de machos caprinos. *Vet Méx* 2005; 36 (2) 159-176.

42. Mc Guire T.C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine arthritis- encephalitis virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1987; 17: 465-470.
43. Mc Guire TC, Adams DS, Johnson GC, Anderson PK, Barbee DD, Gorham JR.j Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. *Am J Vet Res* 1986; 47(3):537-540.
44. Miller CJ, Vogel P, Alexander NJ, Dandekar S, Hendrikx AG, and Marx PA. Pathology and localization of simian immunodeficiency virus in the reproductive tract of chronically infected male *rhesus macaques*. *Lab Invest* 1994;70:255-266
45. Morin T, Guiguen F, Bouzar BA, Villet S, Greenland T, Grezel D, Gounel F, Gallay K, Garnier C, Durand J, Alogninouwa T, Mselli-Lakhal L, Mornex JF, and Chebloune Y. Clearance of a Productive Lentivirus Infection in Calves Experimentally Inoculated with Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. *J Virol* 2003; 77(11): 6430–6437.
46. Narayan O, Clements J. E., Strandberg J. D., Cork L. and Griffin D.E. Biological characterization of the virus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. *J Gen Virol* 1980; 50: 69-79.
47. Narayan O., S. Kennedy-Stoskopf, Sheffer D., Griffin D. E., and Clemens J.E., Activation on caprine arthritis encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect, Immunol.* 1983; 41:67-73.
48. Narayan O. y Cork L. Caprine Arthritis – Encephalitis virus. Vol. 3.In: *Virus infection of ruminants*. New York. USA: Elsevier Amsterdam, 1990: (41): 441-452

49. Narayan O, Zink MC, Gorrell M, Mc Entec, Sharma D, Adams R. Lentivirus induced arthritis in animals. *J Rheumatol* 1992; (supplement 32) 19: 25-32.
50. Nazara CS De J, Trigo FJ, Suberbie E, Madrigal V. Estudio de la artritis encefalitis caprina en México (tesis de maestría). México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1991
51. Nazara S.J., Trigo F. J., Suberbie E, Madrigal V. Estudio serológico de la artritis-encefalitis caprina en México. *Tec Pecu Méx* 1985; 48: 98-101.
52. OIE 2003. HANDISTATUS II. Organización mundial de Sanidad Animal (<http://www.oie.int/hs2>). Último acceso 13 de mayo de 2003.
53. Olvera AMA, Revisión bibliográfica sobre la enfermedad de artritis encefalitis caprina de 1980-1992 (tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México UNAM, 1994
54. Pawlisch RA, Maes RK. Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats. *Am J Vet Res* 1984; 45 (9): 1808-1811.
55. Péretz G, Cimarosti I. Consequenses de l'arthrite-encephalite caprine sur la production laitiere. 41 Reunion Anualle de la Fédération Européenne de Zootechnic: Juillet 9-12; Toulouse, France, 1990:1-9.
56. Péretz G, Le C.A.E.V. : Revue des connaissances actuelles et conséquences practiques. *Revue Med Vet* 1993; 144(2): 93-98.
57. Perrin GG. L'arthrite encéphalite caprine. *Poin Vét* 1991; 23: 713-718.

58. Perrin GG, Polack B. L'arthrite encéphalithe caprine. Bull Acad Vet France 1987;60: 125-136.
59. Pétursson G, Andrésdóttir OS, Georgson G, Pálsson PA, Rafnar B, Torsteinsdóttir S. Lentivirus diseases of sheep and goats:Maedi visna and Caprine Arthritis-Encephalitis. In Progress in sheep and goat research. Oxford: Speedy,A.W, 1992:107-129.
60. Pétursson G. Maedi- Visna and related diseases. Vol.3. In: Virus infections of ruminants New York. USA: Elsevier Ámsterdam, 1990:431-440.
61. Piojan P., Tórtora J. Principales enfermedades de los ovinos y los caprinos. México, 1986.
62. Putney SD, Montelaro RC. Lentivirus. In: Regenmortel; MHV, Neurath AR, editors. Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines: Science Publishers B. V. Elsevier 1990: 307-344.
63. Ramírez AH. Utilización de células de membrana sinovial de feto caprino para la producción de antígeno del virus de Artritis Encefalitis Caprina en México (tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México. UNAM, 1998.
64. Ramírez AH. Evaluación "*in vitro*" de proteínas antigénicas de un virus de Artritis Encefalitis Caprina (AEC) aislado en México, usando las técnicas de ELISA e inmunoelectrotransferencia (Western Blot) (tesis de maestría). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, México: UNAM, 2002.
65. Robinson W. F., Ellis T.M., Caprine arthritis-encephalitis virus infection : From recognition to eradication. Aust Vet J 1986; 63 (8): 237-241.

66. Rosati S., Pittau M., Tolari K., Erre G., Kwong J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (Caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Vet Microbiol* 1995;45: 363-370.
67. Rowe JD. y East NE. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Food Animal Retroviruses* 1997; 13 (1):35- 53.
68. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, De Rock E, Pedersen NC. Delayed seroconversion Following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res.* 1993; 54 (11):1858-1862.
69. Saunders M. Arthrite encéphalite caprine à virus : aspects épidémiologiques et importance en production caprine. *Point Vét.* 1998, 29 (194) 829-837.
70. Shah C, Huder J B, Böni J, Schönmann M, Mühlherr J, Lutz H, and Jörg Schüpbach J. Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *J Virol* 2004 ; 78(14): 7518–7522.
71. Smith MC y Sherman DM. *Goat Medicine USA: Lea & Febiger, 1994.*
72. Travassos C, Benoit C, Valas S, da Silva A, Perrin G. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boues infectés expérimentalement. *Vet Res* 1998; 29: 579 – 584.
73. Travassos C, Benoit C, Valas S, da Silva A, Perrin G. Caprine arthritis- encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum Res* 1999; 32: 101-106
74. Trigo Tavera, F.J. y cols; *Patología sistémica veterinaria; Ed. Mc Graw- Hill Interamericana. 1998; 295-296*

75. Trigo JF. La artritis-encefalitis caprina. *Ciencia Veterinaria* 1991; 5: 49-66
76. Van Voorhis B. J; Martinez A. Mayer K and Anderson D.J.1991 . Detection of Human immunodeficiency virus type 1 in semen from seropositive men using culture and polimerasa chain reaction deoxyribonucleic acid amplification techniques. *Fertility and Esterility* 1991; 55 (3): 588-589
77. Vitu, C., Russo, and P.,Vignoni, M. Arthrite Encephalite Caprine: Essai D'une preparati3n vaccinale adjuvee-II.Etude de la reponse anticorps. *Comp Imm Microbiol Infect Dis* 1993 ;16,2 :137-144
78. Werling D, Langhans W, Geary N. Caprine arthritis encephalitis virus infection changes caprine blood monocyte responsiveness to lipopolysaccharide stimulation in vitro. *Vet. Immunol Immunophatol* 1994; 43: 401-411.
79. www.sagarpa.gob.mx
80. Zink MC, Narayan O, Kennedy PGE, Clements JE. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis encephalitis: New leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflamation. *Vet. Immunol Immunophatol* 1987; 15: 167-18
81. Zink MC, Narayan O. Lentivirus- induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol* 1989;63 (6):2578-2584.