



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN.**

**“DETECCIÓN DE ANTÍGENO DEL VIRUS DE ARTRITIS ENCEFALITIS
CAPRINA EN CÉLULAS EPITELIALES DEL PREPUCIO CAPRINO”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
MARÍA DEL CARMEN AGUILAR TAPIA**

**ASESOR: DR. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
COASESOR: M. en C. RICARDO RODRÍGUEZ VILCHIS**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 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 :

"Detección de antígeno del virus de Artritis Encefalitis Caprina en células epiteliales del prepucio caprino"

que presenta la pasante: María del Carmen Aguilar Tapia
 con número de cuenta: 08308532-7 para obtener el título de :
Médica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 2 de Abril de 2009

PRESIDENTE	<u>Dra. Virginia Citlali Hernández Valle</u>	
VOCAL	<u>MC. Arturo Angel Trejo González</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. H. Alejandro Martínez Rodríguez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M/Z. María de Lourdes Jara Ramírez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Oscar Chávez Rivera</u>	

Agradecimientos:

Este trabajo esta dedicado en primer lugar a mi padre José Aguilar Ayala, quien fue mi ejemplo, mi guía, la persona a la que más he admirado y querido: papá; fuiste mi maestro, me diste el cariño que me hacia falta, me enseñaste a ser honesta, a mostrar orgullo y no darme por vencida. Siento que no te di las gracias lo suficiente ni te dije lo mucho que te quería, tanto como debí; aunque se que lo sabias. Gracias por darme la vida, por haberme educado, por ser mi padre y por todo tu cariño, muchas gracias.

Dedico también este trabajo a mi hermana Teresa Cinthya Aguilar Tapia, quien me ha otorgado su cariño y apoyo desde su primer día de vida, gracias por tu fe en mi y por todo, tu sabes lo mucho que te quiero.

A mis Hermanos José Román Aguilar Tapia y Enrique Aguilar Tapia y a sus esposas Luz María Zugarazo Alcantar y Yolanda Jasso Alvarez ya que sin su apoyo no habría podido continuar.

A mi madre Teresa Tapia Larios quien me dio la vida y a se marchó muy pronto de la misma.

A mi tía Guadalupe Aguilar Ayala quien batallo con nosotros al faltar mi madre y querernos sin ser su responsabilidad, Dios la tenga en su gloria.

A mi asesor el Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez quien a demás de su asesoría, también nos brinda su amistad. Dok; gracias por su guía y su comprensión.

A los MC. Alejandro Buendía y Gerardo Arcila por su valiosa asesoría y amistad.

A mis compañeros y amigos: Alejandra, Rosaura, Alonso, Israel, Rocío, Sonia, Flor, Ana, Itzel, Oscar, Adriana, Neri, Mauricio, Fabián, Lorena, Laura, Herendira, Columba, Víctor, Estefanía, Aurora, Luis, Alberto, Roberto, Rubén, Gaby, Jesús, Francisco, Fabiola, Jazmín, Richi, Eduardo, Emanuel, Jehieli, Karina, Dulce, Ariel, Angélica, Paulina, German, Magdalena, Amelia, Maricela, Cecilia y Enriqueta. Gracias por su apoyo y su amistad.

A todos mis profesores entre los cuales se encuentran mis sinodales; por todas sus enseñanzas y amistad.

A la UNAM y de manera particular a la FES Cuautitlán por todo el apoyo brindado a los estudiantes sin distinción alguna.

INDIGLE

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Generalidades del virus.....	5
1.2. Características del virus.....	6
1.3. Ciclo viral.....	7
1.4. Patogenia.....	10
1.5. Signos clínicos.....	11
1.5.1. Artritis.....	11
1.5.2. Mastitis.....	12
1.5.3. Leucoencefalomielitis.....	12
1.5.4. Bronconeumonía intersticial.....	13
1.6. Transmisión.....	14
1.7. Células epiteliales.....	17
1.8. Funciones.....	18
1.8.1. Macrófagos.....	18
1.9. Diagnóstico.....	19
1.9.1. Papanicolaou.....	19
1.9.2. Inmunocitoquímica.....	20
1.10. Diagnóstico diferencial.....	20
1.11. Prevención.....	21
1.12. Control.....	21
1.13. Vacunación.....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
4. HIPÓTESIS.....	26
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	28
5.1. Obtención de células epiteliales.....	29
5.2. Técnica Papanicolaou.....	29
5.2.1. Procedimiento para la realización de la tinción de Papanicolaou.....	30
5.3. Pruebas Inmunocitoquímicas.....	31
5.3.1. Inmunocitoquímica.....	31
5.3.2. Procedimiento utilizado para la técnica inmunocitoquímica.....	32

6. RESULTADOS.....	33
6.1. Células prepuciales.....	34
6.2. Inmunocitoquímica.....	39
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIÓN.....	46
9. BIBLIOGRAFÍA.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura lentivirus.....	6
Figura 2. Genes retrovirales.....	8
Figura 3. Ciclo viral.....	9

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Mastitis indurativa.....	11
Imagen 2. Artritis.....	12
Imagen 3. Leucoencefalomielitis.....	13
Imagen 4. Bronconeumonía intersticial.....	14

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Células epiteliales sometidas a la técnica de Papanicolaou.....	34
Foto 2. Macrófagos y neutrófilos sometidos a la técnica de Papanicolaou.....	34
Foto 3. Tonalidades adquiridas bajo esta técnica.....	35
Foto 4. Proporción de neutrófilos y macrófagos.....	35
Foto 5. Células intermedias sometidas la técnica de inmunocitoquímica.....	39
Foto 6. Células epiteliales de un animal positivo.....	39
Foto 7. Contraste de coloración entre una célula positiva y una célula negativa.....	40
Foto 8. Célula intermedia con marcaje positivo.....	40
Foto 9. Células epiteliales de un animal negativo.....	40
Foto 10. Ausencia de reacción Ag-Ac en un animal negativo.....	41

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Promedio de células parabasales.....	36
Gráfica 2. Promedio de células intermedias.....	36
Gráfica 3. Promedio de células superficiales.....	36
Gráfica 4. Promedio de neutrófilos.....	37
Gráfica 5. promedio de linfocitos.....	37
Gráfica 6. Promedio de macrófagos.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índice de varianza.....	38
Tabla 2. Conteo promedio de células epiteliales marcadas.....	41

RESUMEN.

El objetivo principal del trabajo fue determinar el tipos de células prepuciales (CP) de animales seropositivos y seronegativos al virus de artritis encefalitis caprina (AEC) e identificar en que tipo células se puede encontrar antígeno viral. Para lo cual se trabajo en el modulo caprino y en el laboratorio de genética viral y biología molecular FES Cuautitlán UNAM, trabajando con seis animales machos; tres de la raza Toggenburg seronegativos (-) (> de 7 meses al inicio de la investigación) y tres Alpinos seropositivos (+) (> de 1 año) a la prueba de ELISA indirecta, la investigación se realizo durante un período de 12 meses. Para esto se realizaron lavados prepuciales con solución de Hank's cada 30 días, las células colectadas fueron fijadas con acetona y metanol para posteriormente ser teñidas por la técnica de Papanicolaou. Encontrándose en los animales seropositivos (+) células parabasales en un 9%, intermedias 39% y superficiales 51%, además de neutrófilos 90%, linfocitos 6% y macrófagos 4% y en el caso de los animales seronegativos (-) células parabasales en un 15%, intermedias 38%, superficiales 47%, neutrófilos 90%, linfocitos 6% y macrófagos 4% respectivamente. Por otro lado al análisis estadístico no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre animales seropositivos y seronegativos con respecto a las proporciones de los tipos de células estudiadas.

Paralelamente a los frotis fijados con acetona se les realizó un análisis inmunocitoquímico con anticuerpos monoclonales que detectan la proteína p28 del virus de AEC. Encontrándose un marcaje característico en el citoplasma de las células intermedias y superficiales del epitelio prepucial en los machos positivos.

1. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Artritis Encefalitis Caprina fue descrita por primera vez en el año de 1974 (Pawlish and Maes, 1984; James, 1990; Pudney and Montelaro, 1990) sin embargo en ese entonces fue denominada como *Síndrome de Meningoencefalitis* en cabritos menores de 4 meses y no fue sino hasta el año de 1979 cuando se aisló el virus por primera vez y se le denominó como Artritis Encefalitis Caprina (Crawford, *et al*, 1980); es un virus persistente que al igual que Maedi Visna, frecuentemente cruza la barrera interespecie (caprinos – ovinos) (Banks, *et al*, 1983; Shash, *et al*, 2004^{a, b}), el primer reporte de la enfermedad en México se realizó en 1983 (Nazara, *et al*, 1983) y fue identificada hasta 1998 por la técnica de inmunodifusión radial y pruebas histopatológicas e inmunohistoquímicas (Leyva, 1994; Leyva, *et al*, 1998). La enfermedad tiene una distribución mundial aunque presenta una mayor incidencia en países desarrollados como lo es Estados Unidos donde presentó entre el 31 y el 81% de incidencia en estudios serológicos (Crawford and Adams, 1981; Cutlip, *et al*, 1992).

La Artritis Encefalitis Caprina (AEC) es una enfermedad del ganado caprino provocada por un virus el cual es caracterizado por la producción de lesiones inflamatorias crónicas divididas en diversos cuadros clínicos (Bruguere –Picoux, 1984; Dawson and Wilesmith, 1985; Kennedy, *et al*, 1985; Avalos, *et al*, 1992).

- a) Poliartritis proliferativa (Crawford, *et al*, 1980).
- b) Neumonía intersticial crónica (Callapiña y Rivera, 2002).
- c) Mastitis indurativa en cabras adultas por lo tanto hay una disminución de la producción láctea y pérdida de peso progresiva (Smith and Sherman, 1994).
- d) Cuadro de encefalomiелitis proliferativa en cabritos de dos a cuatro meses de edad (Dawson and Wilesmith, 1985; Nazara, *et al*, 1985; Grewal, *et al*, 1986; Jackson, *et al*, 1991).

1.1 Generalidades del virus.

El virus de AEC pertenece a la familia: *Retroviridae*, subfamilia: *Orthoretrovirinae*, género: *Lentivirus* ([ICTV](#) 2004). Es un virus envuelto, con pequeñas proyecciones en la superficie denominadas peplómeros (Murphy, *et al*, 1999), AEC es un virus ARN, presenta cápside, nucleocápside, nucleoide y una matriz proteica. Los viriones van de esféricos a pleomórficos, miden de 80 a 100 nm de diámetro. Sus proyecciones de superficie son densas, pequeñas y se encuentran dispersas por toda la superficie, dichas proyecciones miden 8nm de largo (Amorena, *et al*, 2003; Bertoni, 2007). El nucleoide es concéntrico. El centro es en forma de bastón, o como un cono cortado. Contiene glicoproteínas en una densidad de 1.13 -1.18 g cm³, su cápside contiene 35% aproximadamente de lipoproteínas; el cual consigue de la membrana celular infectada, además de contener un complejo ribonucleoproteico que se encuentra a su vez envuelto por proteínas. En el interior del virus, el genoma esta compuesto de transcriptasa reversa de transferencia de la lisina (ARNt – lisina que es utilizada para iniciar la acción de la polimerasa) y proteínas estructurales; es sensible al medio ambiente, al calor, los detergentes y el formaldehído, su infectividad no se ve afectada por la radiación (Hötzel and Cheevers, 2003; Bertoni, 2007). El virus se integra al ADN celular por acción enzimática, siendo su principal célula blanco los monocito-macrófago en donde se presenta en forma de provirus (Simard, 2002). Estas células infectadas actúan como “caballo de Troya” capaces de propagar el virus en diferentes órganos, mientras eluden la respuesta inmune del animal (Peterhans, 1999; Le Jan, *et al*, 2000; Lerondelle, *et al*, 1999; Rosadio, 1998; Amorena *et al*, 2003; Hötzel and Cheevers, 2003) el virus de leucemia humana se replica en las mismas células y puede permanecer dentro de la célula hasta por 7 años (Shehu-Xhilaga, *et al*, 2007). Además se ha demostrado que las células epiteliales del oviducto, células embrionarias, médula ósea y células dendríticas foliculares del tejido linfóide actúan a modo de reservorio; las cuales son altamente permisivas al virus, por lo que de manera importante juegan un papel relevante en la transmisión del virus (Hötzel and Cheevers 2003, [Bertoni](#), 2007). (Figura 1).

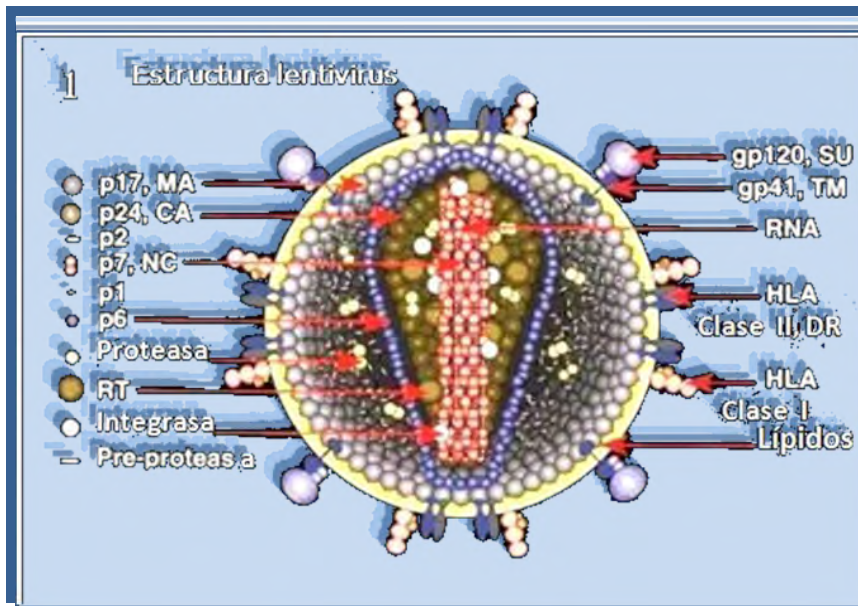


Figura 1. **Estructura lentivirus.** (modificada de www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/VIRTARG.HTM). En la figura se aprecia la estructura lentiviral.

Los virus de inmunodeficiencia humana y del simio (VIH y VIS) infectan a linfocitos CD4 lo que produce una importante inmunodeficiencia y otros como el virus de inmunodeficiencia felina (VIF), infectan a los linfocitos B y CD8. En los pequeños rumiantes existe replicación en células no linfoides como las epiteliales dicha replicación es específica de cada tejido y depende de la maduración de los macrófagos (Clements and Zinc, 1996; Hötzel and Cheever, 2003). En ovejas se presenta la enfermedad conocida como Maedi-Visna (MV) (De la Concha, 1999), la cual también tiene como células blanco a los macrófagos.

1.2. Características del virus de AEC.

Presenta un ARN de cadena sencilla segmentada en 2 bandas (Narayan and Clements, 1989; Pudney and Montelaro, 1990), posee un genoma complejo con la presencia de los genes estructurales esenciales *gag*, *pol* y *env*; complementados por genes regulatorios-accesorios tales como *tat*, *rev* y *vif*. El gen *gag* se encarga de la codificación de antígenos (Ag) estructurales internos o grupales; *pol* codifica enzimas como la transcriptasa reversa (TR) y *env* que produce las proteínas de la envoltura viral (Rosadio, 1998) (Figura 2).

Además posee las terminales largas repetidas (LTR) donde se acoplan los genes antes mencionados, estas terminales además, de ser componentes importantes en el proceso de integración en el ADN (provirus), contienen secuencias utilizadas para la adherencia e iniciación de la síntesis de la cadena negativa del ADN proviral, con sitios de uniones complementarias específicas para el ARN de transporte de la lisina (ARNt-lisina). Ya integrados en el genoma celular, los LTR se convierten en promotores de la transcripción viral ya que contienen secuencias de adherencia para la transcriptasa viral ya que son sitios de uniones complementarias específicas para el ARN de transcripción de lisina (ARNt lisina) y adoptan características de verdaderos promotores para la transcripción debido a que contienen secuencias potenciadoras y secuencias de adherencia para la transcriptasa viral (Clements and Zinc, 1996; Bertoni, 2007), secuencias potenciadoras que ayudan al propio genoma de AEC el cual es similar al ARN mensajero (ARNm) de las células eucariotas, que es modificado en la fase posterior a la transcripción adicionándose una estructura metilada en un extremo (denominado 5') por medio de "capping" (encapsulados) (Hötzel and Cheevers, 2003; Bertoni, 2007), la cual es importante para la unión en los ribosomas celulares necesarios para la traducción genómica. Simultáneamente en el otro extremo se adiciona una "cola" de nucleótidos de adenosina poliadenilada (Poli A), que confiere estabilidad y previene la degradación del ARN viral. El genoma puede producir nueva progenie utilizando los marcos de lectura abierta (Open Reading Frames ORFs) que producen varias proteínas virales.

1.3. Ciclo viral.

Para que la replicación viral se realice de manera eficiente se requiere de la presencia del gen *tat* su ausencia produce un salto durante el transporte de RNA en citoplasma y por lo tanto es indispensable para una replicación eficiente. Los genes regulatorios están encargados de la producción de proteínas no estructurales pero necesarias para la replicación viral. El gen *tat* del AEC es similar al gen *tat* de VIH describiendo la activación transcripcional actuando en las repeticiones de las terminales largas del virus, codifica proteínas de la cápside (CA), matriz (MA o p16) y la nucleocápside (NC o p14).

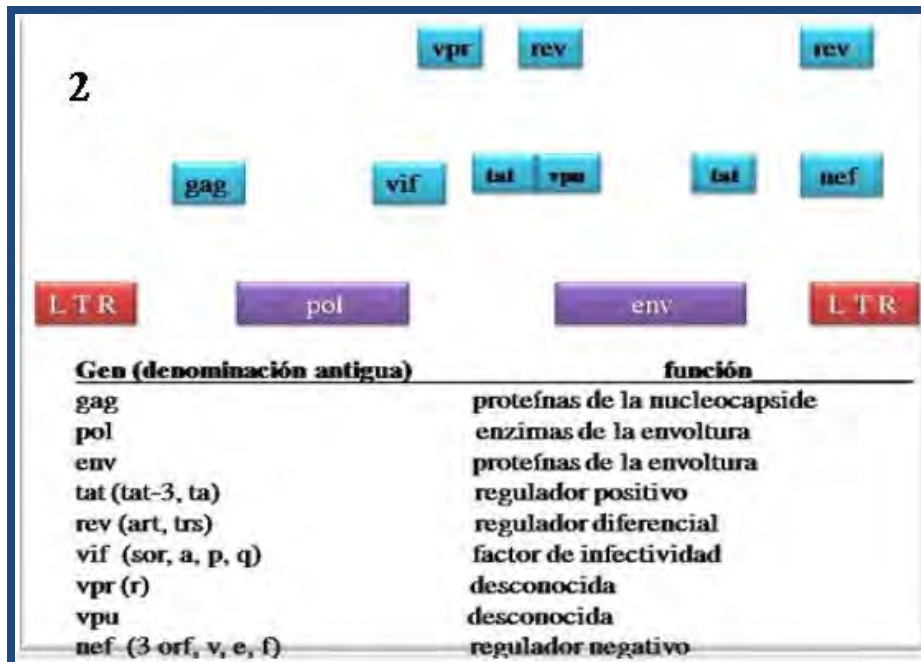


Figura 2. **Genes retrovirales.** (Modificado de Cabrera, 2001). Genes comunes para todos los retrovirus ubicados en secuencias de terminales repetidas (LTR) que no codifican proteínas, solo expresan otros genes; *gag*, *pol* y *env* codifican componentes virales (Aguilar, *et al*, 2003; Rosadio, 1998)

Otros estudios, sin embargo modifican esa interpretación y muestran que el gen *tat* se encuentra presente en dos partes del genoma el virus posee funciones como la capacidad de bloquear el proceso del ciclo celular en G2 (etapa donde comienza la condensación de los cromosomas y el ensamblado de las estructuras especiales requeridas para la mitosis) además de amplificar la replicación a través de la proteína p14 que ejerce sus funciones en una región específica del LTR estimulando entre 500 y 1000 veces la replicación génica, de manera similar con el gen *vpr* del VIH; el gen *rev* factor de regulación selectiva con efectos diferenciales, su presencia o ausencia controla la expresión de los otros genes reguladores si no se produce esta proteína el virus produce selectivamente proteínas reguladoras inhibiendo consecuentemente la producción de genes estructurales; en presencia de dicha proteína bloquea la producción de proteínas regulatorias permitiendo la producción de viriones (Jackson, *et al*, 1991). Finalmente, el gen *vif* el cual se encuentra dividido en dos subunidades y se ubica entre los genes *pol* y *env* posee una esencial eficiencia en la replicación viral *in vitro* y especialmente *in vivo*; otros estudios muestran que interactúa con proteínas celulares, sugiriéndonos actividades similares en otros retrovirus actuando paralelamente con su equivalente, la ausencia de

este gen produce la pérdida de la capacidad citopática cuando se le trabaja *in vitro* en el laboratorio (De la Concha, *et al*, 1996). (Figura 3).

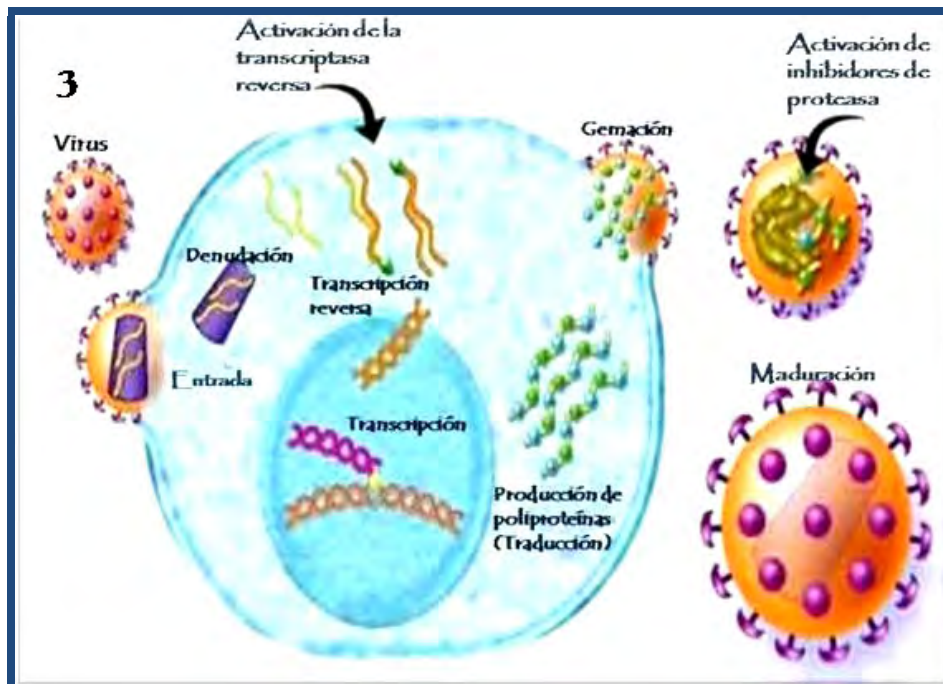


Figura 3. **Ciclo viral.** (Modificado de: <http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/RSantaol>). Replicación desde su entrada a la célula pasando por la transcripción y la traducción, hasta la maduración.

La replicación viral puede dividirse en 2 etapas:

- a) Etapa temprana inicia al unirse a los receptores específicos celulares valiéndose de la glicoproteína de superficie. Las membranas vírica y celular se fusionan (*env* codifica dos proteínas externas del virus denominadas de superficie (SU) y transmembranal (TM) y realizan un papel importante en la internalización del virus)(De la Concha, 1999) permitiendo la entrada de la nucleocápside en un proceso denominado como denudación, las enzimas víricas se asocian al ARN del huésped esta fase constituye un periodo de latencia que se mantiene hasta que un estímulo externo activa la expresión y replicación viral (Cabrera, 2001).
- b) La etapa tardía inicia con la transcripción de ARN viral a partir del ADN viral integrado en la célula huésped donde se incluyen las LTR (Cabrera, 2001), se genera una copia por medio de la TR, se activa ARNasa hebra (H) de la TR la cual degrada la hebra de ARN y casi simultáneamente emplea la del ADN cíclico

(ADNc) como molde para sintetizar una segunda hebra de ADN, convirtiéndolo en bicatenario. Se une al complejo núcleo-proteico, pasando al núcleo celular y, mediante la Integrasa (IN), el ADN viral se integra (provirus) en el genoma celular, donde puede permanecer por un tiempo indefinido (Clements and Zinc, 1996). La fase de transcripción genética, origina ARN utilizado como genoma del nuevo virión y ARNm para las poliproteínas. Las proteínas de *gag* y *pol* se asocian con el ARN viral formando un núcleo “core” intracelular, las proteínas de *env* se insertan en la membrana plasmática de la célula para su posterior salida de la célula por gemación, durante la cual el virus adquiere una doble capa lipídica en su superficie. (Rosadio, 1998).

1.4. Patogenia.

Las lesiones articulares a nivel de carpos producidas por AEC manifiestan inflamación periarticular por acumulación de líquido sinovial y en casos severos mineralización de tejidos, hilos de fibrina y destrucción macroscópica articular. Histopatológicamente la membrana sinovial presenta hiperplasia, notoria hipertrofia de las microvellosidades sinoviales; infiltración masiva de células mononucleares en la túnica íntima y subintima de los vasos sanguíneos y angiogenesis; también se produce una infiltración ectópica de células mononucleares en tejido linfoide deformando los centros germinales de linfocitos B y activando los mantos de linfocitos T. Ocurre gran expresión de células plasmáticas y linfocitos B alrededor de los folículos que se dispersan por las vellosidades inflamadas de la membrana sinovial (Crawford and Adams, 1981; Milhau, et al, 2005).

Las pruebas hematológicas revelan linfopenia en cabras con afecciones crónicas y no así en animales con manifestaciones tempranas donde no se observan variaciones significativas en el conteo sanguíneo. En el líquido cefalorraquídeo se observa una marcada pleocitosis, el líquido sinovial se observa opaco, de color pardo y viscoso; y presenta cuentas irregulares de células (entre 100 a 20,000 células/mm³) donde más del 90 % de éstas eran células mononucleares (Trigo, 1991).

Los niveles de anticuerpos alcanzan su punto más alto a partir de los días 21 y 35 post infección hasta alcanzar un máximo entre los días 49 y 77 para luego tener un descenso hasta el día 271 (Trigo, 1991).

1.5. Signos clínicos.

1.5.1. Artritis.

La manifestación mas evidente es la forma artrítica que se manifiesta en animales mayores al año de vida, con perdida progresiva de peso, pelo escaso en la zona de afección, pueden sufrir abscesos, ulceraciones, dermatitis, aumento de volumen considerable de las articulaciones carpianas y osteomielitis por permanecer postradas; lo que trae como consecuencia disminución de la movilidad (Castillo y Hernández, 2004), dicha articulación se encuentra blanda en las etapa iniciales y a medida que la enfermedad progresa puede ser debilitante, acompañada de perdida de progresiva de peso; el tejido periarticular al igual que la capsula sinovial se mineraliza dando como consecuencia el endurecimiento de los miembros esta afección se presenta de forma bilateral en la mayoría de las ocasiones; esta afección puede alcanzar a ligamentos y tendones y se puede llegar a encontrar osificación (anquilosis). Las articulaciones se tornan rugosas e irregulares y endurecen las articulaciones (Trigo, 1991).

En orden de importancia y frecuencia las articulaciones carpianas son las más afectadas, seguidas de las metatarsianas y las femorotibiorotulianas (Trigo, 1991). (Imagen 2).



Imagen 1. **Artritis.** (Imagen proporcionada por el Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez). En la imagen se aprecia la articulación carpiana con una marcada inflamación en el miembro izquierdo.

1.5.2. Mastitis.

La mastitis indurativa es una manifestación clínica importante en AEC, la cual se conoce como enfermedad de las ubres duras lo que es semejante a la bolsa dura en MV la que afecta a ovejas; dicha afección se manifiesta en las cabras seropositivas en animales mayores de 12 meses. Su manifestación inicia entre el 1º y el 3º día postparto (Castillo y Hernández, 2004), se detecta cuando a la palpación son localizados nódulos de consistencia dura, lo que se denomina como mastitis intersticial por infiltración en glándula mamaria con leucocitos y células mononucleares, lo que ocasiona un descenso en la producción y en la calidad de la leche hasta del 15%, o una agalactia total sin regreso a las condiciones normales (Crawford and Adams, 1981). Aunque el principal problema de esta manifestación es el contagio del virus por la vía lactogénica (calostro y leche) a las crías (Imagen 1).



Imagen 2. **Mastitis indurativa.** (Caparros, *et al*, 2005) en este animal se aprecia un animal con mastitis aun más marcada en el medio derecho.

1.5.3. Leucoencefalomielitis.

Se presenta en cabritos de entre 2 y 4 meses de edad, inicia con cojera y ataxia, seguido de debilidad en los miembros, parálisis, opistótonos e hiperestesia; el animal mantiene el apetito; posteriormente, arquea el cuello, con movimientos en círculo, pedaleo, la fiebre solo se presenta cuando interviene un agente bacteriano secundario, por lo general el animal muere y si sobrevive presenta secuelas neurológicas (Trigo, 1991). (Imagen 3).



Imagen 3. **Leucoencefalomielitis.** (Donada por el Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez). En esta imagen se muestra a un cabrito con problemas nerviosos.

1.5.4. Bronconeumonía intersticial.

De manera inicial la neumonía intersticial linfocítica multifocal se asocia su manifestación nerviosa en animales jóvenes y adultos. Cuando afecta otros órganos, como el tejido pulmonar, daña de manera especial los lóbulos caudal y craneoventral, los bronquios presentan inflamación y proliferación de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Castillo y Hernández, 2004; Trigo, 1991). Los animales se vuelven lentos; al desplazamiento continuo su respiración aumenta y su frecuencia es más notoria, al progresar la infección; la respiración se vuelve más difícil, a pesar de que los animales siguen comiendo hay emaciación progresiva, pueden presentarse infecciones secundarias por bacterias; en estos casos los animales presentan fiebre y el animal puede morir debido a la anorexia y las infecciones secundarias; pero esta no es la afección más frecuente en el ganado caprino y si lo es para el ganado ovino en MV. Del pulmón afectado de las cabras, en especial los macrófagos que se obtienen de un lavado representan un importante sitio de replicación viral *in vivo* (Crawford and Adams, 1981; De la Concha, *et al*, 1996) (Imagen 4).



Imagen 4. **Bronconeumonía intersticial.** (Imagen donada por el Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez). Nótase el grado de emaciación en un animal que ha padecido la enfermedad de manera crónica.

En el VIH, la infección y la posterior expresión del virus muestra que es capaz de reactivarse en contacto con leucocitos en sangre; los pacientes con VIH presentan vasculitis y lesiones del endotelio, lo que nos dice que las células endoteliales son reservorio para el virus. En AEC estas células no son un reservorio pero su infección contribuye a la diseminación en tejido mamario (Lechat, *et al*, 2004; Yasunaga and Matsuoka, 2007), se ha reportado la transmisión del virus de MV de ovejas a cabras de manera artificial inoculando el virus de AEC de manera intra-articular en ovinos provocando artritis y recuperando el virus de articulaciones tanto inoculadas como no inoculadas hasta por cuatro meses y también se han observado saltos oveja-cabra en rebaños mixtos (Banks *et al*, 1983; Shah, *et al*, 2004^{a, b}; Bertoni 2007; Gjerset, *et al*, 2007), lo cual también se ha obtenido de manera experimental *in vivo* por Morin, *et al*, 2003.

1.6. Transmisión.

El virus de AEC se transmite principalmente a través de la ingesta de calostro y/o leche (de hembras infectadas) por el cabrito (Crawford and Adams, 1981), existe también la vía horizontal que se da por el contacto directo prolongado de animales infectados a otros animales susceptibles a través de fómites y maquinas de ordeño (Crawford and Adams,

1981; Lerondelle, 1989), se ha observado el potencial riesgo de transmisión por el manejo inadecuado de material infectado con sangre (Narayan, *et al*, 1983) y no se descarta la transmisión sexual, debido a que aun siendo detectado el virus en el aparato reproductor de machos caprinos y semen (Martínez, 2003), no se ha demostrado que los animales presenten lesiones (Trujillo, *et al*, 2004a) por lo que pudieran considerarse como animales sanos y utilizarse como sementales.

AEC provoca una enfermedad persistente en cabras y al igual que MV (De la Concha 1999), frecuentemente cruza la barrera ínterespecies ovejas-cabras, el virus de AEC esta referido a pequeños rumiantes y su vía de transmisión más frecuente es la vertical (Amorena, *et al*, 2003; Clements and Zink, 1996). La vía de infección sexual no debe ser descartada, aun cuando no existen estudios de la detección del virus en células prepucciales, pero si en el semen de caprinos infectados (Amorena, *et al*, 2003), al igual que otros lentivirus como el VIH; donde su principal vía de transmisión es la sexual habiéndose detectado en próstata, vesículas seminales y uretra (Crawford and Adams, 1981; Yasunaga and Matzuoka, 2007); así como en la inmunodeficiencia del simio y la inmunodeficiencia bovina, se ha comprobado su transmisión por vía sexual (Hötzel and Cheevers, 2003).

Los lentivirus poseen una alta sensibilidad en cuanto a la selectividad de células blanco, permanecen indefinidamente en sus hospedero y tienen especificidad de especie. Utilizan a las células hospedero para producir sus proteínas contenidas en el DNA viral. Sin embargo las células blanco difieren en cada familia viral; los lentivirus prefieren células indiferenciadas, como monocitos y linfocitos.

En los rumiantes los lentivirus se sitúan en los monocitos sanguíneos de manera latente y solo se expresan en la maduración a macrófago en los distintos tejidos del organismo como pulmón y glándula mamaria causando lesiones en estos. El tropismo viral a éstas células es el punto débil de los lentivirus. Para la transmisión de la infección se requiere de la presencia del antígeno en la sangre para que circule por el organismo tomando en cuenta que este tipo de células migran a través de vasos sanguíneos y atraviesan endotelios en procesos patológicos (Lechat, *et al*, 2004); esta característica permite la única oportunidad de controlar la enfermedad, adoptando un adecuado protocolo para evitar la transmisión entre los animales (Shehu-Xhilaga, *et al*, 2007). En el VIH el riesgo de una infección se puede esta presente durante la relación sexual con un compañero

infectado; el virus puede introducirse en el cuerpo en las paredes de la mucosa vaginal, vulva, pene o recto (Amorena, *et al*, 2003; **Meiring and Linial, 2001**; Calattini, *et al*, 2006). Las lesiones prepuciales o las del tracto genital incrementan la cantidad de células inflamatorias que pueden portar el virus y pueden favorecer la diseminación de la enfermedad por vía venérea, por lo que es posible que la convivencia de los machos con un comportamiento sexual activo actúe como un mecanismo potencial de difusión de la enfermedad (Jackson, *et al*, 1991). El (VIS) y el virus de inmunodeficiencia simio/humano (VISH) han mostrado reacción positiva a anticuerpos en testículos y epidídimo; lo cual sugiere infección en el tracto genital del macho; también fueron localizados linfocitos T y macrófagos en intersticio testicular al incremento de la espermatogénesis y se detecto (VIS y VISH) en los mismos sitios en machos prepúberes infectados y con insignificante infiltración de células mononucleares (Shehu-Xhilaga, *et al*, 2007); en estos retrovirus la célula blanco son los macrófagos al igual que en AEC donde se detecto su la presencia del antígeno en los mismos sitios.

Algunos lentivirus muestran capacidad para replicarse en células epiteliales de diferentes órganos, inclusive las del tracto reproductor de hembras, el intestino y el colon; además de que el virus de AEC no solo infecta monocitos, sino que también puede replicarse en células epiteliales de glándula mamaria de la cabra y otros sitios, con ausencia de lesiones, lo que puede ocasionar que animales infectados pasen desapercibidos y continúen transmitiendo la enfermedad. Se ha demostrado la presencia del antígeno viral en vesícula seminal, ámpula y glándula bulbo uretral (Martínez, *et al*, 2005), lo que sugiere que puede estar presente en otros sitios del aparato reproductor. En estudios recientes se ha demostrado la presencia en semen de forma intermitente lo que sugiere que existen efectos estacionales (Trujillo, *et al*, 2004b) La frecuencia de la enfermedad depende de las diferentes razas de cabras, lo que es de gran importancia genética (Lechat, *et al*, 2004), las cabras infectadas con AEC presentan anticuerpos IgG1 de manera predominante en respuesta a las glicoproteínas de superficie del virus, a diferencia de las cabras asintomáticas que presentan IgG2. Las cabras crónicamente infectadas desarrollan anticuerpo IgG1 (Cheevers, *et al*, 1997; Amorena, *et al*, 2003) el cual actúa durante la fase preclínica de la infección de artritis, las cabras que desarrollan la fase inflamatoria preclínica unida a las lesiones de la fase inicial lo que puede suprimir la respuesta de los anticuerpos; por lo que el virus es predecible por la respuesta inmune a las glicoproteínas de superficie del virus de AEC, lo que indica que el desarrollo de la enfermedad depende

de linfocitos Th2 inmunes a AEC y la respuesta inmune obedece a las respuestas preventivas al progreso de la enfermedad. El progreso de la enfermedad depende de la fuerza de la respuesta inmune de Th2.

Otros estudios demuestran que 70% de los infiltrados en lesiones inflamatorias contenían IgG1 y células plasmáticas. (Trujillo, *et al*, 2004a). Al inocular el anticuerpo se da una activación de los monocito-macrófago, complemento y la producción de una respuesta inflamatoria por citocinas e interleucinas, que contribuyen a la activación de linfocitos T y B, la degradación de los componentes de tejidos suaves incrementa la producción de las inmunoglobulinas antiglicoproteínas de superficie (Trujillo, *et al*, 2004a).

1.7. Células epiteliales.

En general conforman el tipo más diverso de células del organismo en cuanto a funciones como: primera barrea de defensa, soporte del organismo, secreciones endocrinas, exocrinas, absorción y catabolismo gastrointestinal; excreción hepato-renal y funciones neurosensoriales (García, *et al*, 2007).

Varían en tamaño y forma dependiendo de su localización anatómica y su función. (Appendini, *et al*, 1993).

De estas nos enfocaremos en el tipo de epitelio estratificado plano, el cual se caracteriza por poseer varias capas celulares donde la más externa manifiesta una forma aplanada (García, *et al*, 2007).

De este tipo de epitelio se encuentran tres variedades:

- 1.- no queratinizado
- 2.- queratinizado
- 3.- paraqueratinizado

El tipo de células en las que se enfoco el estudio fueron las del epitelio no queratinizado. El cual posee una función de protección, se ubica en superficies húmedas como la región vestibular de la cavidad nasal, la cavidad bucal, el esófago, la córnea, el tejido conjuntivo y regiones externas del aparato genital del macho y de la hembra y tejidos urinario y digestivo (cabe mencionar que el epitelio traqueal y pulmonar es del tipo pseudoestratificado cilíndrico con células caliciformes lo que quiere decir que es un epitelio simple) (García, *et al*, 2007).

Este tipo de epitelio esta dividido en 4 estratos:

- a.- **Estrato de células basales:** Son células poliédricas de núcleo voluminoso con gran actividad de células en mitosis.
- b.- **Estrato de células parabasales:** Son varios estratos de células poliédricas con núcleo ligeramente menor.
- c.- **Estrato de células intermedias:** Son de mayor tamaño y más aplanado que las anteriores, con pocos organelos, abundancia de glucógeno y gránulos de queratohialina.
- d.- **Estrato de células superficiales:** Son aplanadas, con núcleo picnótico o en cariorrexis y con pocos organelos y glucógeno (García, *et al*, 2007).

1.7.1. Funciones.

Protección: Revisten o recubren a distintos órganos protegiéndolos del medio externo y/o interno. A la desecación; como en el caso de la piel, para evitar la pérdida de humedad y que el organismo absorba agua, los epitelios estratificados queratinizados protegen de forma mecánica, física, antibacteriana y contra las radiaciones solares y las sustancias químicas, dan protección contra el desgaste; como en el esófago. **Absorción:** Incorporación activa o pasiva de sustancias hacia los líquidos tisulares y vasculares. **Transporte:** Esta función la ejercen los epitelios ciliados. **Secreción:** Elaboran sustancias que recubren la superficie epitelial. **Intercambio:** Esta función está reservada al epitelio plano simple alveolar. **Sensorial:** en los órganos de los sentidos (García, *et al*, 2007; Appendini, *et al*, 1993).

1.8. Macrófagos.

El monocito posee capacidad fagocítica y un sistema lisosomal desarrollado de manera normal, no posee capacidad de replicación. El monocito en el torrente sanguíneo puede estar regulado por las necesidades del organismo (inflamación, isquemia, necrosis, apoptosis, etc.) lo que reduce la circulación, facilitando a su vez la extravasación de los monocitos en el sitio de interacción, es en este sitio donde madura a macrófago, lo que conlleva a un incremento en el tamaño celular y un mayor desarrollo del sistema lisosomal y del contenido enzimático además de un incremento mitocondrial y metabólico. Su vida media puede ser larga (meses–años) dependiendo de las necesidades, si no hay actividad mueren por apoptosis (Abbas, *et al*, 1991; Celada, 1994). Los

macrófagos fagocitan y eliminan microorganismos (bacterias, virus, parásitos), macromoléculas y células dañadas o muertas evitando que viertan su contenido citotóxico; pueden también eliminar células tumorales mediante la secreción de perforina y granzima, citocinas como el factor necrosante de tumores alfa (TNF- α). Durante la respuesta inmune adquirida mediada por células, los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno y participan en la eliminación de antígenos extraños durante la respuesta inmune (Comalada, 2002); sin embargo, el virus de AEC permanece en el ADN celular en forma de provirus (Abbas, *et al*, 1991; Travassos, 1998).

1.9. Diagnóstico.

Se basa en los signos clínicos de la enfermedad, estudios radiológicos que permiten identificar la mineralización y erosión de las superficies articulares (Simard, 2002), pruebas de serología como: Inmunodifusión en agar gel, ELISA, Inmunotransferencia y, pruebas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR o RT-PCR) la cual detecta ADN proviral, dichas pruebas sirven también para la detección de la mastitis subclínica ocasionada por AEC.

Histológicamente se detectan lesiones inflamatorias en cerebro, médula espinal y meninges. De manera perivascular se localizan linfocitos, macrófagos y células plasmáticas con infiltración adicional en medula blanca y con proliferación en células gliales, a nivel de glándula mamaria se observa una infiltración intralobular extensiva e hiperplasia linfoide adyacente a los ductos lactíferos (Trigo, 1991).

1.9.1. Papanicolaou.

La técnica de Papanicolaou se utiliza principalmente para el diagnóstico clínico del virus del papiloma humano, debido a las diferentes coloraciones que se pueden presentar entre estructuras, pero esta prueba no se limita solo a la detección de este virus o a tumoraciones.

Para la realización de dicha prueba se utilizan tres colorantes (la hematoxilina de Harris que se utiliza para teñir núcleos y citoplasma, EA y OG 6 las cuales se utilizan para teñir citoplasma otorgándole tonos desde el naranja hasta el rosado violáceo).

1.9.2. Inmunocitoquímica.

Esta técnica permite la identificación sobre muestras tisulares o citológicas de uno o más segmentos provirales como la proteína p28 (Buendía, *et al*, 2005) característicos de distintos retrovirus para su diferenciación (Delgado, *et al*, 2007; Muñoz, *et al*, 2004; Quezada, *et al*, 2004). La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones celulares permite la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial en muchos casos. Esta técnica se ha utilizado para el diagnóstico de diversas etiologías con una gran precisión como MV (Storset, *et al*, 1997; Benavides, *et al*, 2006) y VIS (Miller, 1998).

1.10. Diagnóstico diferencial.

Las distintas manifestaciones de la enfermedad se deben distinguir de entre un cuadro amplio de otras afecciones:

La Mastitis inducida por AEC se debe diferenciar de otras causas de mastitis crónica, como las ocasionadas por heridas o por una infección bacteriana que invade la glándula mamaria. Entre las bacterias que suelen ser causantes de mastitis en ovejas y cabras pueden citarse los siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactia*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus disgalactea*, *Mannheimia haemolytica*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Mycoplasma sp*.

La artritis se debe diferenciar de la ocasionada por Mycoplasma, clamidias, brucelosis y afecciones por heridas o el manejo inapropiado de los animales (De la Concha, *et al*, 1996).

La leucoencefalomielitis se debe de diferenciar de Listeriosis, poliencfalomalacia y deficiencia de cobre. En sus estadios iniciales, las formas neurológicas de AEC se pueden confundir con abscesos en el sistema nervioso, traumas, lesiones por migración parasitaria aberrante y degeneración axonal. Este cuadro también se debe diferenciar de scrapie en cabras por medio de examen histopatológico del cerebro (Trujillo, *et al*, 2004; Sofianidis, *et al*, 2006; Acutis, *et al*, 2006).

La forma pulmonar de AEC se debe diferenciar de otras enfermedades respiratorias crónicas tales como abscesos pulmonares y mediastínicos causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, neumonía supurativa crónica, neumonía verminosa, neumonía

enzootica ovina y adenomatosis pulmonar ovina (Jaagsiekte). (Trujillo, *et al*, 2004; De la Concha, 1996).

1.11. Prevención.

Separar a los recién nacidos de las hembras positivas antes de que ingieran calostro y suministrar calostro de bovinos o de hembras negativas no utilizar semen de machos positivos a la enfermedad, no mezclar edades, no se debe reutilizar el material contaminado con sangre (Robles, *et al*, 2003; Trigo, 1991; Dawson and Wilesmith, 1985).

1.12. Control.

Se puede realizar el reemplazo de animales positivos (lo que representa la tercera parte del rebaño), separar a los animales sospechosos, realizar pruebas serológicas a los animales de reciente introducción y se recomienda realizar pruebas serológicas a las crías de cabras positivas y a todos los animales del hato cada seis meses.

1.13. Vacunación.

Recientemente se ha probado una vacuna que produce una inmunidad cruzada utilizando un monómero de la envoltura de superficie (SU). En esta vacuna utilizaron la glicoproteína gp135 de SU, recombinante uniendo anticuerpos homólogos y heterólogos de suero caprino (Trujillo, *et al*, 2004b). En otro estudio Cheevers, *et al*, 2003 utilizando plásmido con DNA *env* expresado de AEC inducido a las células (Th1) T “helpers” 1 obtuvo un incremento en la viremia con notable aumento de lesiones asociadas. Se han obtenido resultados mas prometedores con una vacuna basada en una dilución de AEC-CO *env* (plásmido con el gen *env* imperfecto insertado); esta vacuna no inmuniza pero baja los niveles de antígenos encontrados en sangre en la mayoría de los animales vacunados de un hato; pero puede volver a la virulencia induciendo artritis de manera exacerbada en los animales infectados (Hötzel and Cheevers, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN.

Es posible que el macho como semental, juegue un papel fundamental en la diseminación del virus de AEC, sin embargo, los estudios que se han hecho son en su gran mayoría en hembras, restándole importancia al macho. De ahí la importancia en la detección del virus de AEC en las células epiteliales del prepucio, ya que se sabe que las células epiteliales no solo son reservorio del virus sino que también hay replicación de retrovirus como son el de VIH, VIS y VISH en células epiteliales del tracto reproductor.

8. OBJETIVOS.

- a) Obtener células epiteliales del prepucio caprino, para identificar, diferenciar y cuantificar por medio de la tinción de Papanicolaou el tipo de células que se presentan.
- b) Detectar en el citoplasma de células epiteliales el antígeno del virus de Artritis Encefalitis Caprina mediante la técnica de inmunocitoquímica.

4. HIPÓTESIS.

Las células epiteliales del prepucio son permisivas al virus de Artritis Encefalitis Caprina, siendo posible detectar antígeno viral en estas células.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Obtención de células epiteliales.

Se utilizaron tres machos caprinos adultos seropositivos (n=3) de la unidad caprina de la FES-C, UNAM y tres seronegativos (n= 3) los cuales se encuentran ubicados en el modulo asignado al M en C. Arturo Ángel Trejo González, de razas Alpino y Toggenburg respectivamente e inicialmente evaluados por la prueba de ELISA indirecta utilizando el equipo de diagnóstico del Instituto Pourquier de Francia.

Para muestrear a los machos se les realizó una limpieza y desinfección de la zona del prepucio utilizando métodos de sujeción sin tranquilizante. La obtención de células prepuciales fue por medio de la introducción de 10 ml de solución de Hank's estéril sin glucosa con antibiótico en el orificio prepucial, con un pH de 7.2, con una pipeta estéril de 30 cm. de largo, se dejó la solución de 15 a 20 segundos para la recolección de la mayor cantidad de líquido. La solución recolectada se depositó en tubos de plástico de 15 ml estériles. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante, el contenido celular se fijó en portaobjetos con alcohol metílico durante 10 minutos y se secaron al aire.

5.2. Técnica Papanicolaou.

Se utilizó la tinción de Papanicolaou y posteriormente se identificaron, diferenciaron y cuantificaron las células obtenidas, a razón de tres muestras por macho por vez. El muestreo se realizó cada 30 días por un periodo de 12 meses.

De los resultados se obtuvo un promedio por tipo de células y por número de muestreos y se graficaron los resultados, posteriormente se les realizó una evaluación mediante la prueba de varianza analizando: seropositividad, el tipo de células y el tiempo transcurrido a partir del primer muestreo (SPSS 12.0).

5.2.1. Procedimiento para la realización de la tinción de Papanicolaou.

- a) Las laminillas se fijaron con OH metílico por 10 min y se secaron al aire.
- b) Se rehidrataron con agua destilada por 1 minuto.
- c) Se tiñeron con hematoxilina por 1 min y posteriormente se eliminó el exceso con agua corriente.
- d) Se aplicaron 2 lavados con OH etílico al 96% por 2 min cada uno.
- e) Se sumergieron en una solución de OG6 (orange Gal 1% en OH al 96%) por 2 minutos.
- f) Se aplicaron 2 lavados con OH al 96% por 2 minutos.
- g) Se sumergieron en una solución de EA (eosina al 0.5%, pardo Bismark al 0.5% y verde brillante al 0.5%) por 3 minutos.
- h) Se aplicaron 2 lavados con OH al 96% por 5 minutos.
- i) Se aplicó un lavado con OH absoluto por 2 minutos.
- j) Se sumergieron en una solución de OH absoluto con xilol en una proporción de 50/50 por 2 minutos.
- k) Se sumergieron después en xilol, 2 baños por 2 minutos.
- l) Se montaron con resina y se dejaron secar para su posterior observación.

5.3. Pruebas Inmunocitoquímicas.

5.3.1. Inmunocitoquímica.

La técnica de Inmunocitoquímica se realiza mediante el bloqueo previo de la peroxidasa endógena y de proteínas utilizando para esto suero fetal caprino, suero anti ratón- anti conejo (los cuales pudieran interferir en la lectura) para este estudio se utilizó el antígeno (anti p28 para la detección de AEC) marcado con peroxidasa, y la adición del complejo avidina-biotina para potencializar la unión antígeno-anticuerpo, posteriormente se adiciona un cromógeno (diamino-bencidina) para la detección del provirus, manifestándose de con una coloración marrón, a continuación se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris para una mejor observación. Debido a que es una tinción permanente, puede contrastarse y evaluarse al microscopio de luz; por lo que, el material puede archivar por años y la intensidad de la reacción permanece constante. Al utilizar anticuerpos monoclonales se logra una mejor especificidad (Coll, 1993).

El antígeno viral de AEC se ha detectado en tejidos de diferentes órganos (pulmón, cerebro, medula espinal, glándula mamaria y medula ósea) en estudios realizados en animales asintomáticos los cuales resultaron ser positivos al virus, por métodos similares de inmunohistoquímica y en cultivos celulares por medio de inmunocitoquímica con el antígeno monoclonal recombinante p17, p28 (Storset, *et al*, 1997; Milhau, *et al*, 2005; Grossi, *et al*, 2005), además de haber detectado el antígeno por medio de la técnica de Western blott, la presencia del virus se ha comprobado por medio de la técnica de PCR realizada por Rodríguez, 2008, durante otro estudio a los mismos animales resultando positivos.

5.3.2. Procedimiento utilizado para la técnica inmunocitoquímica.

- a) Se fijaron las muestras en acetona por 10 min.

- b) Se hidrataron con solución buffer fosfatada (PBS) por 5 min
- c) Se bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% por 30 min a T° ambiente.
- d) Se lavaron con PBS 3x5 min
- e) Se bloquearon receptores inespecíficos con suero fetal caprino en relación 1:20 (1 parte de suero por 20 partes de PBS) por una hora.
- f) Se lavaron con PBS 3x5 min.
- g) Se agrego el monoclonal anti AEC > 1:200 (1 parte de monoclonal por 200 partes de PBS-BSA (albumina sérica bovina)) = 1:10 =(1μl monoclonal anti p28 + 9μl PBS – BSA 0.1%); > 50 μl (1:10) + 950μl PBS –BSA al 0.1% por 2 h.
- h) Se lavaron con PBS 3x5 min.
- i) Se adiciono Link (anti ratón- anti conejo) 10 min.
(mouse/rabbit immunodetector HRP/DAB Detection System. Bio SB CA.USA)
- j) Se lavaron con PBS 3x5 min.
- k) Se agregó Avidina-Biotina por 10 min.
- l) Se lavaron con PBS 3x5 min.
- m) Se reveló en el microscopio con diamino-bencidina (DAB) 20 μl > cromógeno DAB.
- n) Se inactivaron con agua.
- o) Se contra tiñeron con Hematoxilina por 1 min.
- p) Se retiro el exceso con agua corriente, dos lavados.
- q) Se sumergieron en carbonato de litio por 1 min.
- r) Se lavaron con agua 1 vez.
- s) Se sumergieron en OH 90% por 2 min.
- t) OH 96% 2min.
- u) OH 100% 2 min.
- v) OH 100% + Xilol 50 / 50 2 min.
- w) Sumergieron en Xilol por 2 min.
- x) Sumergieron en Xilol hasta montar con resina.

6. RESULTADOS.

6.1. Células prepuciales.

Las muestras de los lavados prepuciales se realizaron de acuerdo a lo planteado en el punto 5 solo que en el muestreo VII, se perdió uno de los animales positivos por muerte natural. Los conteos se realizaron con 2 observaciones mensuales en ambos grupos. Así el tipo de células que se obtuvo fue un promedio por tipo celular tomando en cuenta animales seronegativos y seropositivos: así seronegativos parabasales 15%, intermedias 38%, superficiales 47%; seronegativos neutrófilos 90%, linfocitos 65 y macrófagos 4%; seropositivos parabasales 9%, intermedias 39% y superficiales 51%; seropositivos neutrófilos 90%, linfocitos 6% y macrófagos 4%. Al análisis de varianza utilizando el programa SPSS no se encontró una diferencia significativa entre los tipos celulares ni entre los individuos positivos y negativo. (Fotos 1, 2, 3 y 4).

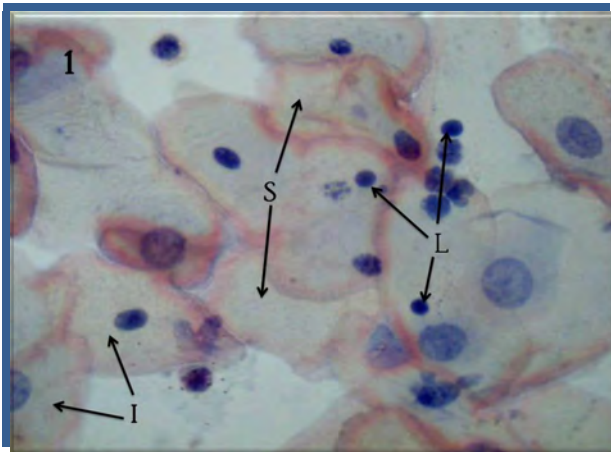


Foto 1. Células epiteliales bajo la técnica de Papanicolaou. En la siguiente imagen se observa un grupo de células propias del epitelio prepucial (I: intermedias, S: superficiales, L: linfocitos. 100 X).

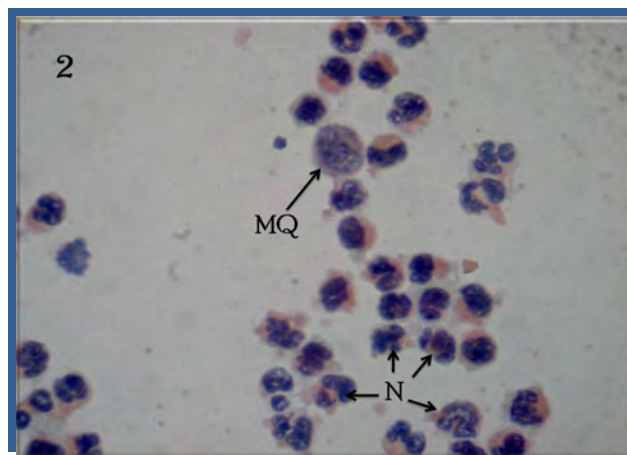


Foto 2. Macrófago y neutrófilos bajo la técnica de Papanicolaou. En la imagen se observa un macrófago (MQ) y un conjunto de neutrófilos (N). 100 X.

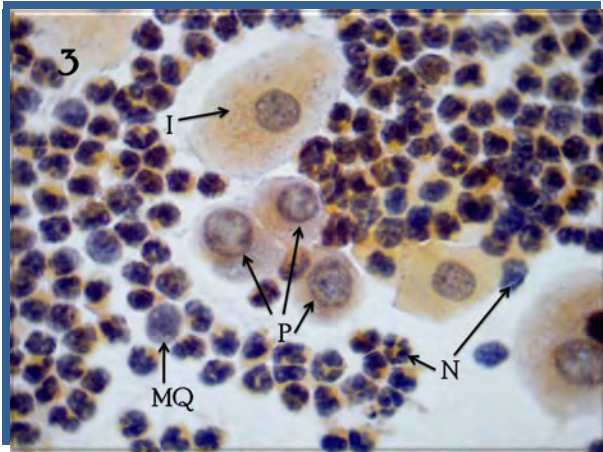


Foto 3. Tonalidades adquiridas bajo la técnica de Papanicolaou. En esta imagen podemos apreciar células intermedias, neutrófilos, macrófagos y células parabasales (P). 100X.

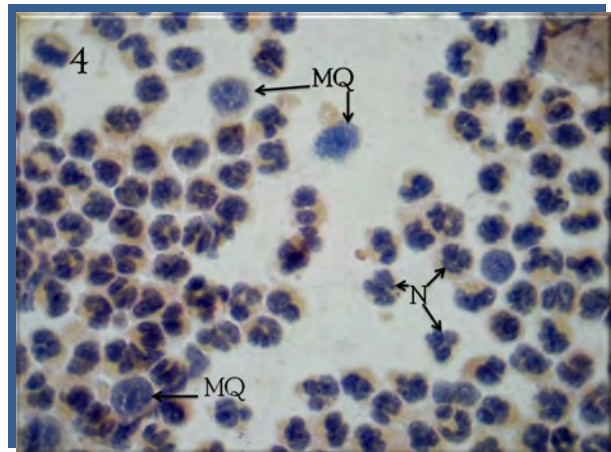
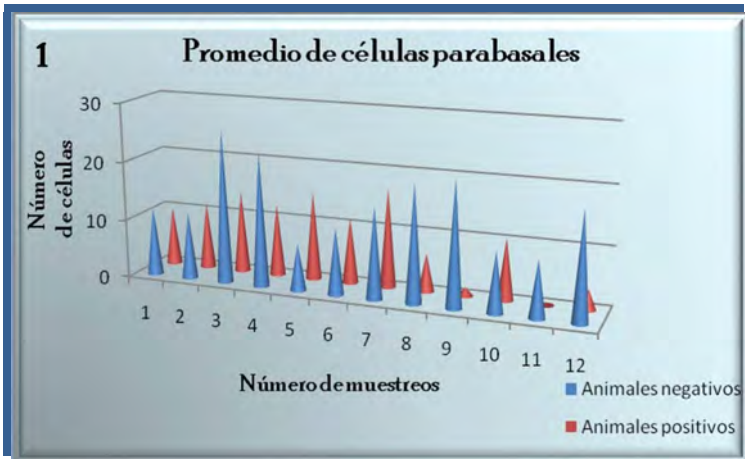
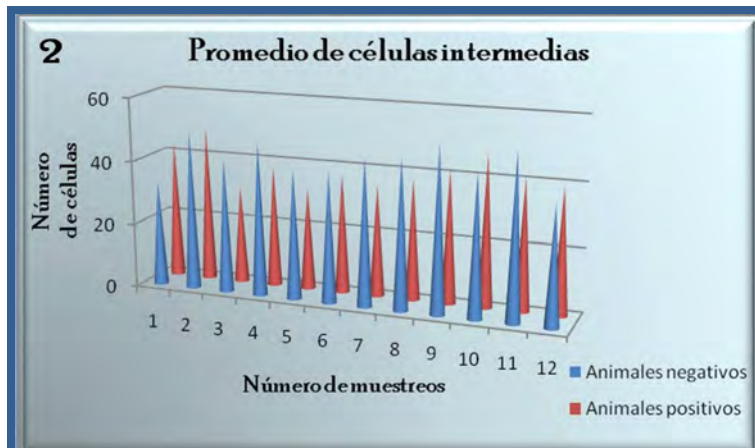


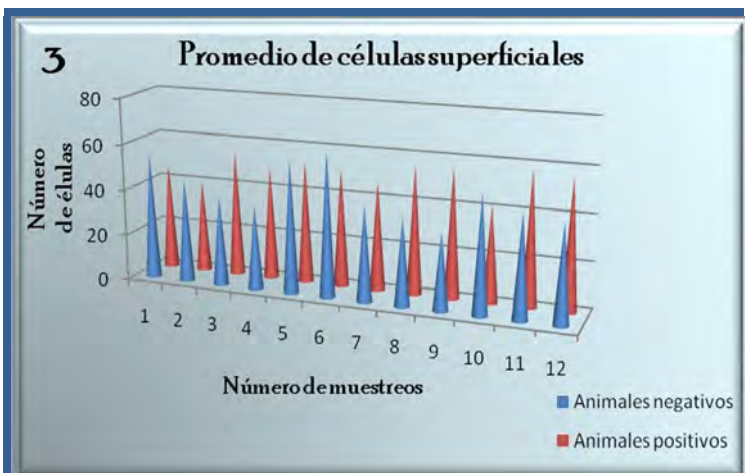
Foto 4. Proporción de neutrófilos y macrófagos. En la imagen observó la proporción de neutrófilos y macrófagos encontrados en los muestreos. 100X.



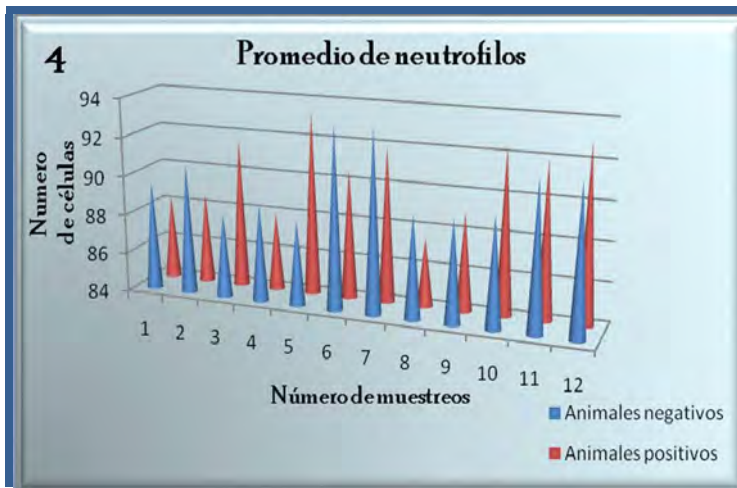
Gráfica 1. Promedio de células parabasales. En la gráfica se aprecia el promedio de células parabasales encontradas en los muestreos realizados durante doce meses. Aún cuando en las gráficas los promedios se observan muy disparados, en algunos conteos, al estudio bioestadístico no hay significancia.



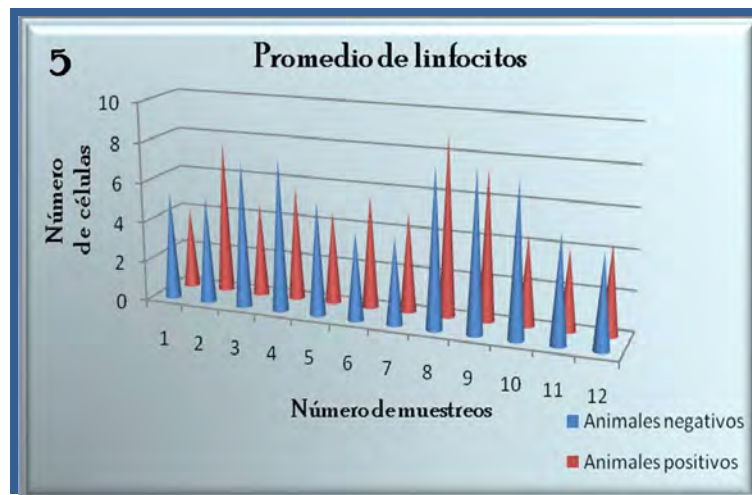
Gráfica 2. Promedio de células intermedias. Células intermedias encontradas en los animales experimentales. De igual manera aquí se observan las proporciones promedio de células intermedias encontradas en los muestreos realizados.



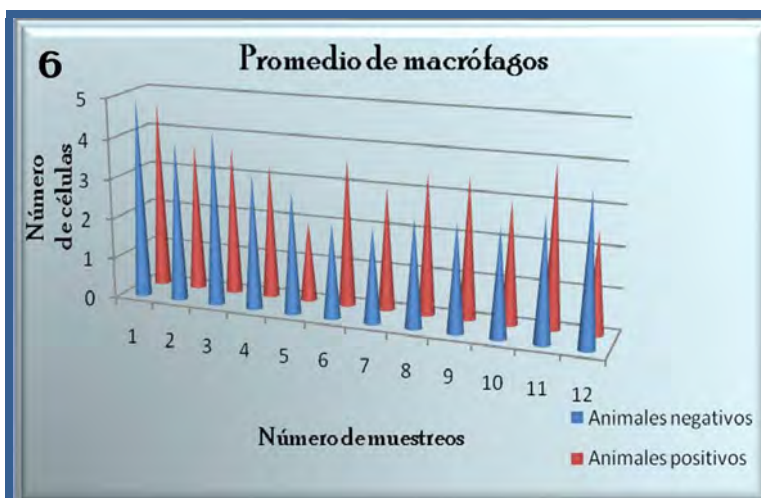
Gráfica 3. Promedio de células superficiales. A medida que las células van madurando el nivel de desprendimiento es mayor y en proporciones más homogéneas entre individuos.



Gráfica 4. Promedio de neutrófilos. En esta gráfica podemos apreciar el promedio de neutrófilos detectados durante los muestreos, observamos una uniformidad en el número de células que se encuentran de manera regular protegiendo el epitelio.



Gráfica 5. Promedio de linfocitos. Aunque en esta gráfica las proporciones entre un muestreo y otro parecen ser inconstantes, el nivel de significancia no fue relevante.



Gráfica 6. Promedio de macrófagos. En esta gráfica al igual que en la de los neutrófilos el número de células es constante en el epitelio.

		Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza de medias		Varianza entre componentes	
				Limite más bajo	Limite más alto		
Leucocitos							
	Total	.02806	.00345	.8972	.9110		
	Modelo	Efectos fijos	.02649	.00326	.8976	.9106	
		Efectos al azar		.00429	.8946	.9135	.00009
Linfocitos							
	Total	.02313	.00285	.0557	.0670		
	Modelo	Efectos fijos	.02209	.00272	.0559	.0668	
		Efectos al azar		.00341	.0538	.0689	.00005
Macrófagos							
	Total	.01338	.00165	.0299	.0365		
	Modelo	Efectos fijos	.01280	.00158	.0300	.0363	
		Efectos al azar		.00196	.0289	.0375	.00002
Parabasales							
	Total	.10043	.01236	.0964	.1457		
	Modelo	Efectos fijos	.09862	.01214	.0967	.1454	
		Efectos al azar		.01342	.0915	.1506	.00039
Intermedias							
	Total	.11017	.01356	.3628	.4169		
	Modelo	Efectos fijos	.10952	.01348	.3628	.4169	
		Efectos al azar		.01395	.3592	.4205	.00015
Superficiales							
	Total	.14908	.01835	.4447	.5180		
	Modelo	Efectos fijos	.15492	.01907	.4431	.5196	
		Efectos al azar		.01907(a)	.4394(a)	.5233(a)	-.00191

Tabla 1. Índice de varianza. Los resultados del índice de varianza muestran que el nivel de significancia es inferior al 0.0 %, lo que indica que la diferencia entre los tipos celulares y los individuos positivos y negativos no es relevante (elaborada con el método estadístico SPSS, Anova).

6.2. Inmunocitoquímica.

A las muestras se les realizó un análisis inmunocitoquímico con anticuerpos monoclonales los cuales detectaron la proteína p28 del virus de AEC para evidenciar la presencia del virus en las células colectadas, manifestándose la coloración marrón característica en el citoplasma de células intermedias y superficiales del prepucio en los animales positivos.

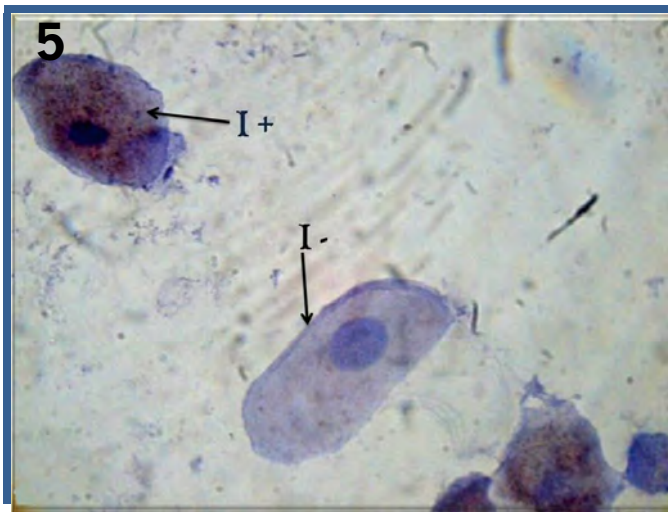


Foto 5. Células intermedias sometidas a la técnica de inmunocitoquímica. En la fotografía se muestran células epiteliales de un animal positivo (I +: intermedia positiva e I -: intermedia negativa). 100X.

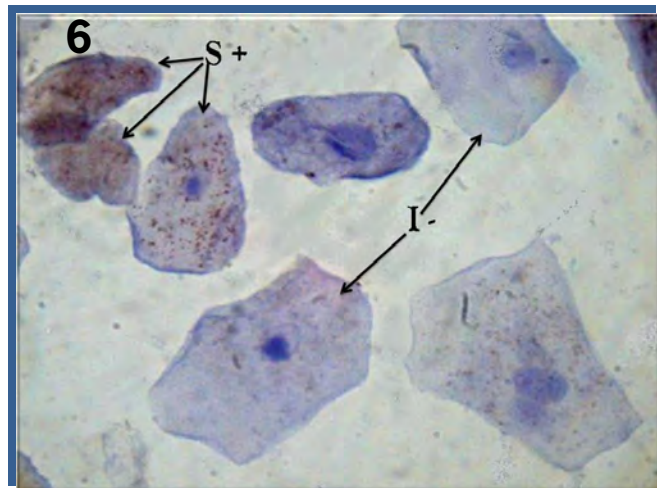


Foto 6. Células epiteliales de un animal positivo. Células epiteliales de un animal positivo bajo la técnica de inmunocitoquímica (S: superficiales). 100X.

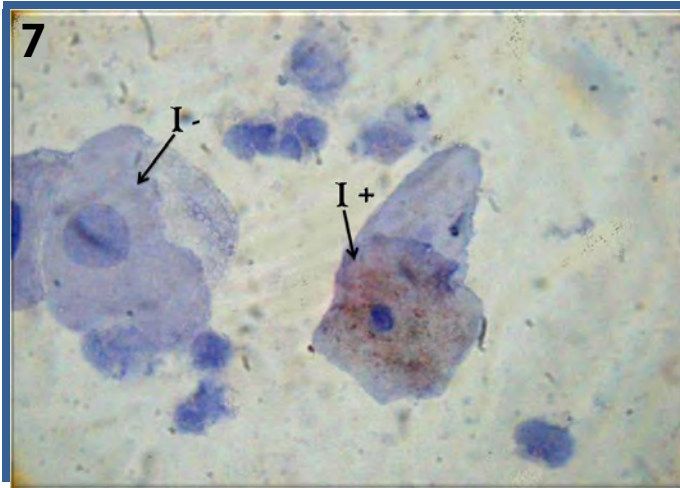


Foto 7. Contraste de coloración entre una célula positiva y una célula negativa. Marcaje específico en célula intermedia por la técnica de inmunocitoquímica 100X

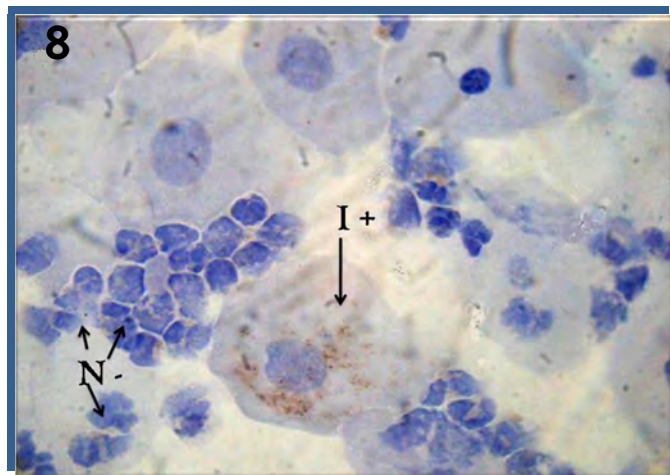


Foto 8. Célula intermedia con marcaje positivo. Al observar los neutrófilos se aprecia que no hubo marcaje inespecífico lo que indica que la prueba se realizó de forma correcta. 1000X.

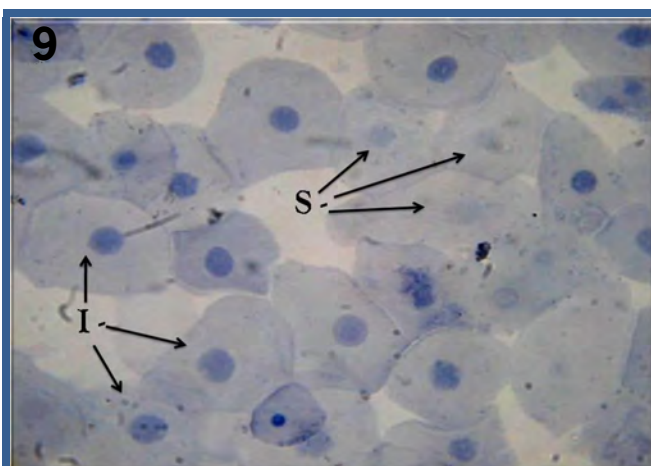


Foto 9. Células epiteliales de un animal negativo. Células epiteliales de un animal negativo en donde no se observa la reacción Ag – Ac de la técnica inmunocitoquímica. 400 X.

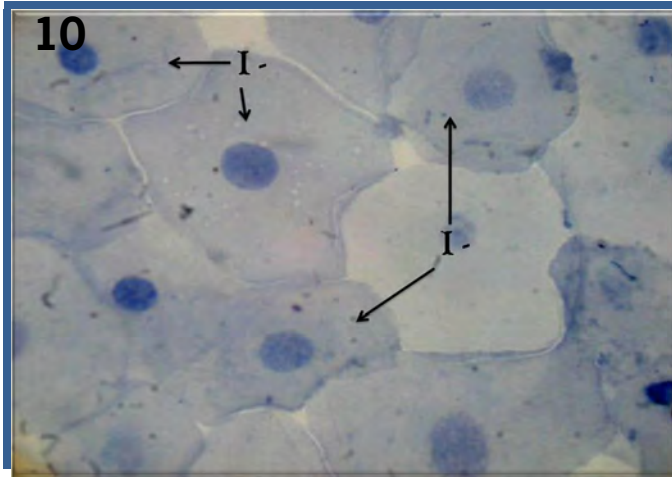


Foto 10. Ausencia de reacción Ag-Ac en un animal negativo. Otro conjunto de células de un animal negativo en donde no se observa reacción Ag-Ac. 100X.

Animales +	Parabasales	Intermedias	Superficiales
4	11.1	6.0	6.2
5	0	2.7	3.9
6	0	3.0	3.9

Tabla 2.- Conteo promedio de células epiteliales marcadas.

Se realizaron conteos de células epiteliales marcadas de los animales positivos a AEC (a la prueba de inmunocitoquímica), efectuándose un conteo de 100 células por muestreo; en cada cuadro se muestran los promedios obtenidos por tipo de célula en el total de los conteos.

7. Discussion.

La descamación de células epiteliales es un proceso normal (Alzola, 2002). Este proceso fisiológico se da en el epitelio del aparato reproductor del hombre y de los animales (Berkovitz, *et al*, 1995), de la misma forma sucede en los pequeños rumiantes (Acosta, 2006). De este modo podemos señalar que los tipos celulares encontrados en las muestras del tracto reproductor de los machos (tanto positivos como negativos) corresponden a los que se encuentran en una citología normal del epitelio prepucial de otras especies como en el humano, el bovino y el ovino (Alzola, 2002); así en este estudio el número de neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células epiteliales de animales seropositivos no mostraron una diferencia estadística significativa en comparación con los animales seronegativos durante todo el periodo de estudio. Existen estudios sobre conteos sanguíneos de células leucocitarias en caprinos de Estados Unidos, el Reino Unido y México, encontrándose mayor concentración de linfocitos a diferencia de otras células, en animales de diferentes edades (Smith and Sherman, 1994); sin embargo en este experimento se denotaban más células epiteliales superficiales y neutrófilos en ambos grupos, siendo que estos últimos están presentes en casos agudos de infecciones bacterianas (ningún animal de este estudio presentó un proceso infeccioso), además de conformar la primera línea de defensa, tal como también se les reconoce a los macrófagos en los tejidos. (Abbas, 1991; Celada, 1994; Comalada, 2002); en otros estudios Acosta 2006 no detectó diferencias significativas en el número de células leucocitarias en distintas partes del tracto reproductor del carnero. Otros investigadores llevaron a cabo estudios en cabras Saanen determinando el número de células leucocitarias durante el día y observando que la concentración cambia en promedio cada 3.5 hrs. durante el día, siendo mayor la concentración en la tarde (Solís, *et al*, 1992), cabe señalar que se toman estas referencias debido a que no existen estudios similares en machos.

La técnica de inmunocitoquímica ha permitido detectar antígenos virales en diferentes enfermedades (Toro y Llombart- Bosch, 2005), este método inmunohistoquímico también a sido factible utilizarlo en aparato reproductor de hembra, con el fin de detectar la proteína L1 del virus del papiloma humano (PVH) en biopsias de cuello uterino. Buendía, *et al*, 2005; utilizando la inmunohistoquímica detectó la p28, en cotiledones de cabras gestantes seropositivas al virus de AEC.

Las técnicas inmunocitoquímicas han resultado ser muy eficientes para la detección de distintos antígenos como lo encontrado en otro estudio inmunohistológico realizado por

Lertora, *et al*, 2003, que con un método semejante detectó el virus de Diarrea Viral Bovina en biopsias de piel, obteniendo resultados positivos al monoclonal; así como también Benavides, *et al*, 2006; realizó pruebas inmunohistoquímicas con Ac monoclonales anti p27 en cortes de pulmón de ovino embebidos en parafina detectando los Ag virales de MV.

El ADN proviral de los lentivirus de pequeños rumiantes es eliminado de manera intermitente en epidídimo por el eyaculado seminal (Peterson, *et al*, 2008). Así mismo Martínez 2003; describe que el virus no parece producir efecto citopático en ámpula, glándula bulbouretral y vesícula seminal, Ali Al Ahmad, *et al*, 2008; Peterson, *et al*, 2008, en diferentes estudios han demostrado la presencia de lentivirus en glándulas accesorias de machos ovinos y caprinos utilizando las técnicas de PCR, RT PCR, Hibridación in Situ y un conteo por Citometría de flujo. En el presente estudio no se encontró la presencia de sincitios ni anormalidades celulares tal como ocurre en tejido sinovial (Trujillo, *et al*, 2004a).

En la literatura no existen estudios parecidos en pequeños rumiante sobre la importancia de las células epiteliales (parabasales, intermedias y superficiales) del prepucio caprino; por lo que, se hicieron los comparativos con lo estudiado en hembras, lo reportado de otras especies como el ovino.

Así el antígeno viral de AEC se logró detectar en las células intermedias y superficiales del prepucio. El hecho de no observar lesiones ni producir alteraciones en las células epiteliales, puede contribuir a la diseminación del virus por animales con infección subclínica (Yasunaga, *et al*, 2007; Shehu-Xhilaga, *et al*, 2007; Ali *et al*, 2007). Así mismo Martínez, *et al*, 2005; Arcila *et al*, 2007 en diferentes estudios demostraron la presencia de antígeno viral de AEC en vesículas seminales por inmunocitoquímica, además de que no encontraron lesiones por este virus, confirmando lo realizado en el presente trabajo.

Al estudio inmunocitológico se detectó el patrón marrón en el citoplasma de las células epiteliales en los animales positivos con la técnica de inmunocitoquímica apoyada con anticuerpos, monoclonales contra la proteína p28 (Buendía, *et al*, 2005). Esta misma

proteína ya fue detectada con anterioridad en tejido epitelial del aparato reproductor de hembra (Ali Al Amhad, *et al*, 2007), no así en el tejido epitelial del prepucio.

8. Conclusiones.

- a) Se logro obtener células epiteliales del prepucio caprino mismas que se logro identificar. Así mismo se identificaron las diferentes morfologías y estadíos de las células prepuciales por medio de la técnica de Papanicolaou. No se encontró diferencia significativa en el conteo leucocitario de animales positivos (serológicamente) a AEC y animales negativos; por lo que podemos concluir que la técnica de Papanicolaou es efectiva para las pruebas de diferenciación e identificación celular.

- b) Se detectó la presencia de antígeno viral por inmunocitoquímica en células epiteliales intermedias y superficiales del prepucio caprino; por lo tanto esta prueba es un método importante para la detección del provirus, aunque sus costos la hacen poco accesible y solo puede ser utilizada con fines de investigación.

9. BIBLIOGRAFIA

Abbas A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. Capítulo. “Cells and tissues of immune system”. *En Cellular and Molecular Immunology*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders, 1994; 240-260.

Acosta D. J. P. *Patología y respuesta inmune en el aparato reproductor del carnero en la infección experimental con Actinobacillus seminis*. TESIS. DOCTORAL FESC-UNAM, 2006.

Acutis P. L., Bossers A., Priem J., Riina M. V., Peletto S., Mazza M., Casalone C., Forloni G., Ru G. and Caramelli M. *Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks*. Society for General Microbiology. J Gen Virol **87** (2006), 1029-1033; DOI 10.1099/vir.0.81440-0

Aguilar S. A., Tesoro C. E., Hernández G. R., Martínez R. H.A., Ramírez Á. H., Trujillo O. M. E., Kretschmer S. R. *Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelectrotransferencia*. Vet Méx. 2003: vol. 34 No. 2 118- 127.

Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Pellerin J.L., Guiguen F., Cherel Y., Chatagnon G., Bouzar A.B., Chebloune Y. *Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis* www.sciencedirect.com Theriogenology. 200869 (2007) 473–480.

Alzola R. *Curso de histología, embriología y teratología. Guía de estudio: tejido epitelial*. Facultad de Ciencias Veterinarias Departamento de Ciencias Biológicas. Argentina 2002.

Amorena B., Reina R., González B., Pérez M., Luján L., De Andrés D. *Tropismo y respuesta inmune en infecciones por el virus de la artritis encefalitis caprina*. Ovis, ISSN 1130-4863; 87, 2003: 45-57

Appendini T. C. M., Cornejo C. M. A., Ramos F. G. *Introducción a la citología y embriología*. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, UNAM. 1993.

Arcila L.-T. G., Tórtora P. J., Martínez R. H. A. *Anticuerpos contra lentivirus de pequeños rumiantes (lvpr) en fetos ovinos y caprinos*. XXII Reunión Nacional Sobre

Caprinocultura. Zacatecas, Zac. México. Universidad Autónoma de Zacatecas. 2007. 86-88.

Avalos R., Ramírez R., García J., Zapata P., Cervantes R. y Lehmkuhl H.: *Seroprevalencia del Virus de la Artritis Encefalitis Caprina en el Estado de Nuevo León*. IX Congreso Nacional Caprino. Monterrey, N.L., México. Facultad de Agronomía U.A.N.L. 1992: 11- 14

Banks K. L., Adams D. S., McGuire T. C., Carlson J. *Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus*. 1983. Am. J. Vet. Res. 44(12), 2307-2311.

Benavides J., García-Pariente C., Gelmetti D., Fuertes M., Ferreras M.C., García-Marín J.F., Pérez V. *Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples*. Journal of Virological Methods 2006. Doi; 10 1016/j.inviromet 2006.07.009.

Berkovitz B. K. B., Holland G. R., Moxham B. J. *Atlas en color y texto de anatomía oral: Histología y Embriología*. 1995. 328 España.

Bertoni G. In: *Recent Advances in Goat Diseases Caprine Arthritis Encephalitis Complex* Tempesta M (Ed.). International Veterinary Information Service, (www.ivis.org): 2007; A0902.0707

Bruguere-Picoux, J. *Le Complexe Arthrite – Encephalite- Caprine (C.A.E.C.)*. Recueil de Medicine Veterinaire. 160 (1984): 319-327

Buendía J. A., Morales Y. N., Martínez R. H. A. *Detección de p28 del virus de Artritis Encefalitis Caprina en cotiledones de cabras alpinas* XX Reunión Nacional Sobre Caprinocultura Culiacán, Sinaloa, México. Octubre 2005. 507-520.

Cabrera N. C. *Inhibición de las etapas tempranas del ciclo replicativo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1): mecanismo de acción y posible estrategia terapéutica*. 2001 Tesis Doctoral, España.

Calattini S., Wanert F., Thierry B., Schmitt C., Bassot S., Saib Ali, Herrenschildt N. and Gessain A. *Modes of transmission and genetic diversity of foamy viruses in a Macaca tonkeana colony* *Retrovirology* 2006, 10.1186/1742-4690-3-23

Callapiña E. E. y Rivera G. H. *Seroprevalencia de artritis encefalitis viral caprina en el noroeste de la provincia de Yauyos, Lima.* 2002. 13(1): 52-60.

Caparrós J. A., Burghi V. H. y Lapeña A. J. *Manejo sanitario del hato caprino.* E.E.A INTA Manfredi, Proyecto Regional Caprino. 2005 Boletín N° 1:3-14.

Castillo V. Y. C. y Hernández F. S. *Prevalencia serológica del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) en los municipios del Rosal y Subachoque (Cundinamarca) mediante la técnica de inmunodifusión en agar gel.* 2004 Tesis, Universidad de Lasalle, Facultad de Medicina Veterinaria. Colombia.

Celada A. En *“Inmunología Básica”*, Labor S. A., Barcelona. 1994. 654.

Coll M. J. *Técnicas de Diagnóstico en Virología.* Ediciones Días de Santos. España. 1993: 227-231.

Clements J. E. and Zink M. C. *Molecular biology and pathogenesis animal lentivirus infection.* *Clin. Microbiol. Rev.* 1996. 9. 100-117

Cheevers W. P., Beyer J. C., y Knowles D. P. *Type 1 and Type 2 Cytokine Gene Expression by Viral gp135 Surface Protein-Activated T Lymphocytes in Caprine Arthritis-Encephalitis Lentivirus Infection.* *JOURNAL OF VIROLOGY* 1997 p. 6259–6263 Vol. 71, No. 8 0022-538X/97

Cheevers W. P. Snekvik K. R., Trujillo J. D., Kumpula-McWhirter N. M., Pretty On Top K. J. and Knowles D. P. *Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis* Elsevier Science (USA). 2003 [doi: 10.1016/S0042-6822\(02\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00044-2)

Comalada V. M. *Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir.* Tesis Doctoral UNIVERSIDAD DE BARCELONA depto. Fisiología. 2002. 407.

Crawford T.B., Adams D.S., Cheevers W.D. and Cork L.C. *Chronic Arthritis in goats caused by a retrovirus*. Science. 1980; 207: 997-999.

Crawford T.B. and Adams P.S. *Caprine Arthritis Encephalitis: Clinical Features and Presence of Antibody in selected goat populations*. Journal of America Veterinary Medical Association, 1981; 178: 713-719.

Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Sacks JM, Weaver AL. *Prevalence of antibody to caprine arthritis – encephalitis virus in goats in the United States*. Am J Vet Med Assoc 1992; 200: 802-805.

Dawson M. and Wilesmith W.: *Serological Survey of Lentivirus (Maedi- Visna / Caprine Arthritis – Encephalitis) infection in British Goat Herds*. Veterinary Record, 117(1985): 86 – 89

De la Concha B. A., Corral S. M., Brodie S. J., De Martini j. C. *Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams*. Am. J. Vet. Res. 1996; 57: 284-688.

De la Concha B. A. *Retrovirus en ovinos y caprinos: maedi/visna y artritis encefalitis caprina*. Primer Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes, Montevideo. Uruguay. Septiembre 23, 1999.

Delgado F., Brihuega B., Venzano A., Funes D., Blanco V. F., Auteri C. *Adaptación de un protocolo de inmunohistoquímica para la detección de Leptospira spp. en muestras de tejido fijado en formaldehído*. Rev Cubana Med Trop [periódico en la Internet]. 2007; 59(1): http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602007000100003&lng=es&nrm=iso

García G. A., Hernández V. S., Ramón M. O., Báez S. A., García C. A. *Biología y patobiología humana del complejo de absorción y transporte epitelial megacubam*. Rev med. 2007; 15 (1): 94 - 104

Gjerset B., Monceyron J. C., Rimstad E. *Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations* Virus Research 125 (2007) 153–161

Grewal A., Greenwood, P., Burton, R., Smith, J., Batty, E. and North, R.: *Caprine Retrovirus Infection in New South Wales: Virus Isolations, Clinical and Histopathological Findings and Prevalence of Antibody*. Australian Veterinary Journal, 1986 (63): 245- 248

Grossi P., Giudice C., Bertoletti I., Cioccarelli G., Brocchi E., Cammarata G. and Gelmetti D. *Immunohistochemical Detection of the p27 Capsid Protein of Caprine Arthritis–Encephalitis Virus (CAEV) in Bone-marrow Cells of Seropositive Goats*. Science direct 2005. Vol.133: 197-200.

Hötzel I. and Cheevers W. P. *Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Envelope Surface Glycoprotein Regions Interacting with the Transmembrane Glycoprotein: Structural and Functional Parallels with Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120*. Journal of Virology 2003 vol. 77 no 21: 11578-11587.

Hötzel I. and Cheevers W. P. *Host Range of Small-Ruminant Lentivirus Cytopathic Variants Determined with a Selectable Caprine Arthritis- Encephalitis Virus Pseudotype System*. J Virol. 2001. 75(16): 7384–7391

Jackson M., Knowles D., Stem T., Harwood W., Robinson, M. and Cheevers P. W.: *Genetic Structure of the pol-env Region of the Caprine Arthritis – Encephalitis Lentivirus Genome*. 180 Virology, (1991): 389- 394

James F. E. *Comparative features of retroviral infections of livestock*. Comp. Immun. Microbiol Infect Dis (1990); 13 (3); 127-136.

Kazmi S. H., Naglik J. R., Sweet S. P., Evans R. W., O'Shea S., Banatvala J. E. and Challacombe S. J. *Comparison of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific Inhibitory Activities in Saliva and Other Human Mucosal Fluids Clinical and Vaccine Immunology, American Society for Microbiology*. 2006, Vol. 13; 10: 1111-1118.

Kennedy S., Narayan O. and Strandberg J.: *The Mammary Gland as a Target Organ for Infection with Caprine Arthritis – Encephalitis Virus*. Journal of Comparative Pathology, 95(1985): 609- 617

Lechat N. E., Milhau P. Brun C. Bellaton T. Greenland J.F. Mornex C. Le Jan. *Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes* * UMR 754, Retrovirus et Pathologie Comparée, INRA/UCBL/ENVL/EPHE, IFR 128 2004: 257-263.

Le Jan C., Greenland T., Gounel F., Balleydier S., Mornex J. F. *Activation of small ruminant aortic endothelial cells after in vitro infection by caprine arthritis encephalitis virus*. Res. Vet. Sci. 2000. 69,225-231.

Lerondelle C., Godet M., Mornex J. F. *Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminants lentiviruses*. Vet. Res. 1999. 30, 467-474.

Lertora J., Paredes E., Reinhardt G., Alberdi A. *Inmunohistoquímica en biopsias de piel tratadas con proteína K y microondas para el diagnóstico en animales persistentemente infectados con el virus de diarrea viral bovina. Inmunohistochemistry of skin biopsies treated with proteinase K and microwave for diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection*. 2003. Med. Vet. XXXV, N° 1: 23-36.

Leyva G. V. H. *Estudio radiológico, hematológico, patológico y al microscopio electrónico de cabras seropositivas al virus de Artritis Encefalitis Caprina*. Tesis licenciatura FES- Cuautitlán. UNAM. 1994.

Leyva G. V. H., Martínez R. H. A., González R. G., Cornejo C. M. A., Rosales M. E., Garrido F. G. *Identificación del virus de Artritis Encefalitis Caprina mediante el estudio histopatológico, inmunohistoquímico y ultraestructural, en tejidos de cabras seropositivas en México* Rev Latinoam Microbiol 1998; 40: 33- 38.

Martínez R. H. A. *Diseminación del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) a partir de machos caprinos infectados experimentalmente y su efecto en el aparato reproductor*. Tesis doctoral. FESC-UNAM 2003.

Martínez H. A., Ramírez H., Tortora J., Aguilar A., Garrido G., Montaraz J. *Efecto del Virus de Artritis Encefalitis Caprina en el Aparato Reproductor de Machos Caprinos.* Vet. Méx. 2005:171-180

Meiering C. D. and Linial M. L. *Historical Perspective of Foamy Virus Epidemiology and Infection.* Clinical Microbiology Reviews, 2001, p. 165-176, Vol. 14, No. 1

Milhau N., Renson P., Dreesen I., Greenland T., Bellaton C., Guiguen F. Mornex J. F. Le Jan C. *Viral expression and leukocyte adhesion after in vitro infection of goat mammary gland cells with caprine arthrititis –encephalitis virus.* Veterinary Immunology and Immunopathology. 103 2005. 93-99.

Miller J. C. *localization of simian immunodeficiency virus- infected cells in the genital tract of male and female Rhesus macaques.* Journal of Reproductive Immunology. 41 (1998): 331- 339.

Morin T., Guiguen F., Bouzar B. A., 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.

Murphy F.A., Gibbs E. P. J. y Horzinek M. C. *Veterinary Virology.* 3ª Edition San Diego, California: Academic Press (1999):193- 196

Narayan O., Clements J. E. *Biology and Pathogenesis of Lentiviruses.* J. Gen Virol, 70 (1989): 1617- 1639

Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Sheffer D., Griffin D. E., Clements J. E. *Activation of Caprine Arthritis Encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages.* Infect. Immun. 1983; 41(1):67-73.

Nazara S., Trigo F.J., Suberbie, E., Madrigal, V. *Informe preliminar sobre la seroprevalencia de la Artritis Encefalitis Caprina en México.* Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México Centro Médico Nacional. México D.F. 1983: 550

Nazara S., Trigo F., Suubertie E. y Madrigal V.: *Estudio Clínico – Patológico de la Artritis Encefalitis Caprina en México*. Vet. Méx, 16 (1985): 91- 100

Pawlich R.A., Maes R.K. *Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats*. Am J Vet Res 1984;45 (9): 1808-1811.

Peterhans H. *Lentivirus of small ruminants: CAE and Maedi- Visna Virus*. CD- ROM world vet congress Vet. Lion. France, sep 1999: 23-26.

Peterson K., Brinkhof J., Houwers D.J., Colenbrander B., Gadella B.M. *Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants*. Elsevier Theriogenology. 2008 1; 69(4):433-42.

Pudney S. and Montelaro R. *Lentivirus In: Regenmortel, MVH Neurath AR, editors. Immunochemistry of Viruses II: The Basis of Serodiagnosis and Vaccines*. Science Publishers B. V. Elsevier, London, (1990): 307- 344

Quezada M., Varas F., Ruiz A. *Detección inmunohistoquímica del antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo (vPRRS) en cerdos inoculados*. Arch. Med. Vet., 2004, Vol. 36, No. 2, pp. 183-195. ISSN 0301-732X.

Robles C. A., Layana J. A., Cabrera R. F., Raffo F. y Cutlip R. *Estudio serológico retrospectivo de Maedi (neumonía progresiva en ovinos) y de Artritis Encefalitis en caprinos de Patagonia, Argentina*. Revista de Med. Vet. 2003. Vol. 84 (3): 96-99

Rodríguez V. R. *Efecto del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) sobre células epiteliales del prepucio caprino in vitro*. 2008. Tesis Maestría. FESC- UNAM.

Rosadio A. R. *Biología y Patogénesis del Retrovirus no Oncogénico (Lentivirus) en Ovinos (Neumonía Intersticial Linfoide, Neumonía Progresiva Crónica, Enfermedad del Maedi/Visna)* Rev. de Investigaciones Pecuarias. Perú 1998; 9 (1):1-19

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 2004a: 78(14): 7518–7522.

Shah C., Boni, J., Huder J.B., Vogt H.R., Muhlherr J., Zanoni R., Miserez R., Lutz H., Schupbach J. *Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade.* 2004b. *Virology* 319 (1), 12–26.

Shearer J. K. & Harris Jr. B. *Mastitis in Dairy Goats.* EDIS Web Site at <http://edis.ifas.ufl.edu>. 2003 University of Florida.

Shehu-Xhilaga M., Kent S., Batten J., Ellis S., Van der Meulen J., O'Bryan M., Cameron P. U., Lewin S. R. and Hedger M. P. *The testis and epididymis are productively infected by SIV and SHIV in juvenile macaques during the post-acute stage of infection.* *Retrovirology* 2007; 4.7:1 -13.

Simard C. *Controle de l' Arthrite Encéphalite Caprine: une approche rentable.* 7^e Colloque sur la chevre. Canada 2002: 13-24.

Smith MC y Sherman DM. *Goat Medicine USA:* Lea & Febiger, USA 1994: 135- 138, 197.

Solís R.J., Escobar M.F., Perea G.V. y De la Colina F.F. *Variación en la razón neutrófilos: Linfocitos durante el día en la cabra.* VIII REUNION NACIONAL DE CAPRINOCULTURA. OCTUBRE DE 1992 OAXACA MÉXICO. pp. 130 – 133.

Sofianidis G., Psychas V., Billinisy C., Spyrouz V. Argyroudisy S., Papaioannou N. and Vlemmas I. *Histopathological and Immunohistochemical Features of Natural Goat Scrapie* *J.Comp.Path.* 2006,Vol.135,116-129.

Storset A. K. Evensen O. and Rimstad E. *Immunohistochemical identification of Caprine Arthritis Encephalitis virus in paraffin embedded specimens from naturally infected goats.* *Vet Pathol* 1997. 34: 180-188.

Toro M., Llombart- Bosch A. *Detección inmunohistoquímica de la proteína L1 de Virus Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo en citologías y biopsias de cuello uterino.* *REV ESP PATOL* 2005; Vol. 38, nº 1: 8-13.

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 1998. 32 (1999) 101-106.

Trigo T. F. J. *La Artritis Encefalitis Ccaprina.* Ciencia veterinaria. 5, 1991; 49- 66.

Trujillo J. D., Ho K. J., Snekvik K. R., and William P. *Antibody response to the surface envelope of Caprine Arthritis-Encephalitis lentivirus: disease status is, predicted by SU antibody isotype.* Elsevier, 2004a. J Virol. 78: 9190-9202

Trujillo J. D., Kumpula-McWhirter N. M., Hötzel K. J., Gonzalez M., and Cheevers W. P. *Glycosylation of Immunodominant Linear Epitopes in the Carboxy-Terminal Region of the Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Surface Envelope Enhances Vaccine-Induced Type-Specific and Cross-Reactive Neutralizing Antibody Responses* JOURNAL OF VIROLOGY, 2004b, p. 9190–9202 Vol. 78, No. 17

Uzal F. A., Delhon G., Fernandez M.E., Miyakawa, Morris W.E., Assis R.A., y Murcia P.R. *ADENOMATOSIS PULMONAR OVINA (Jaagsiekte).* Revista de Medicina Veterinaria, 2001. Vol. 82(5): 260-270. 1.

Yasunaga Jun-ichirou, Matsuoka Masao. *Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Induces Adult T-Cell Leukemia: From Clinical Aspects to Molecular Mechanisms.* Medscape. 2007, Vol. 14, No. 2:133-140.

<http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs02-03/RSantaol>

www.niaid.nih.gov/daids/dtpdb/VIRTARG.HTM

The Universal Virus Database of the International Committee of Taxonomy of Viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm> 2004